

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Activité électrique et courants calciques cardiaques chez
des souris transgéniques déficientes en récepteurs aux
oestrogènes alpha et bêta**

par

Anne-Louise Ménard

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Août, 2007

© Anne-Louise Ménard, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Activité électrique et courants calciques cardiaques chez des souris transgéniques
déficientes en récepteurs aux oestrogènes alpha et bêta

présentée par :

Anne-Louise Ménard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lévesque, président-rapporteur

Céline Fiset, directrice de recherche

Christian Deschepper, membre du jury

Résumé

Il existe des différences entre les hommes et les femmes dans la prépondérance de certaines maladies cardiovasculaires. Plus particulièrement, au niveau électrophysiologique, la durée de l'intervalle QT, indice de la repolarisation cardiaque, est différente entre les hommes et les femmes. La valeur de ce paramètre est identique à l'enfance entre les filles et les garçons et raccourcit chez l'homme au moment de la puberté. Plusieurs études suggèrent que les hormones sexuelles auraient un rôle à jouer dans la modulation de l'intervalle QT. Dans ce projet de maîtrise, la fonction des œstrogènes sur l'activité électrique du myocarde a été étudiée chez un modèle de souris ne possédant pas de récepteur aux oestrogènes fonctionnel alpha (ERKO α) ou bêta (ERKO β). Plusieurs paramètres caractérisant l'activité électrique du cœur ont été étudiés, tels que l'électrocardiogramme de surface en condition physiologique et en mode Langendorff (absence de stimulation du système nerveux autonome) et les courants calciques de type L ventriculaires. L'ensemble de ces études n'a permis d'obtenir de différences statistiquement significatives entre les souris ERKO α , ERKO β et leurs contrôles respectifs. En conclusion, les récepteurs aux oestrogènes alpha et bêta ne semblent pas jouer un rôle prédominant sur l'activité électrique du myocarde ventriculaire de la souris en condition physiologique.

Mots-clés : Électrophysiologie, myocarde, oestrogène, souris transgéniques, récepteurs aux oestrogènes

Abstract

There are differences in the predominance of cardiovascular diseases between men and women. Particularly, at the electrophysiological level, the QT interval, which corresponds to the length of the cardiac repolarisation, is similar during childhood between boys and girls and shortens for boys while at puberty. Different studies suggest that sexual hormones could explain, in part, the modulation of QT interval. The purpose of this project is to identify the role of estrogen on the myocardium electrical activity in a model of transgenic mouse lacking of functional estrogen receptor alpha (ERKO α) and beta (ERKO β). Different characteristic heart electrical parameters have been extensively studied as the surface electrocardiogram in physiological conditions and in Langendorff (lacking of autonomous system) as well as the L type calcium currents. Overall, the results of this study do not show any significant differences between the ERKO α , ERKO β and their respective controls. In conclusion, estrogen receptors alpha and beta do not seem to be implicated in the myocardium electrical activity in the mouse at physiological condition.

Keywords: Electrophysiology, myocardium, estrogen, transgenic mouse, estrogen receptor

Table des matières

1	Introduction	- 9 -
1.1	Œstrogènes	- 9 -
1.1.1	Définition	- 9 -
1.1.2	Production	- 11 -
1.1.3	Récepteurs aux oestrogènes	- 12 -
1.1.4	Distribution des récepteurs aux oestrogènes	- 19 -
1.1.5	Rôles des récepteurs aux oestrogènes	- 20 -
1.2	Impact clinique des œstrogènes sur les maladies cardiaques.....	- 23 -
1.2.1	Études WHI et HERS.....	- 23 -
1.3	Le modèle transgénique	- 27 -
1.4	Électrocardiogramme (ECG)	- 30 -
1.4.1	Caractéristiques électrophysiologiques des cellules cardiaques	- 33 -
1.5	Le courant calcique	- 36 -
1.5.1	Le canal calcique cardiaque de type L	- 36 -
1.5.2	Caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type L.....	- 38 -
1.5.3	Les courants calciques cardiaques	- 39 -
1.5.4	Courant calcique cardiaque, activité électrique et contraction du myocarde..	- 40 -
1.6	But du projet.....	- 43 -
2	Matériel et méthodes	- 45 -
2.1	Génotypage	- 45 -
2.1.1	Extraction d'ADN	- 45 -
2.1.2	Génotypage ERK α	- 45 -
2.1.3	Génotypage ERK β	- 46 -
2.2	Dosage d'œstrogène de type ELISA	- 47 -
2.3	Enregistrement d'ECG sous anesthésie	- 47 -
2.4	Enregistrement d'ECG par télémétrie.....	- 48 -
2.5	Enregistrement d'ECG par Langendorff.....	- 48 -

2.6	Isolation cellulaire de myocytes ventriculaires de souris.....	- 49 -
2.7	Enregistrements électrophysiologiques cellulaires par la technique de patch clamp (voltage imposé).....	- 49 -
3	Résultats	- 52 -
3.1	Caractérisation du modèle.....	- 52 -
3.1.1	Génotypage	- 53 -
3.1.2	Dosage du 17 β -oestradiol.....	- 58 -
3.2	Paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo.....	- 60 -
3.2.1	Enregistrement de l'ECG sous anesthésie.....	- 60 -
3.2.2	Enregistrement d'ECG par télémétrie	- 71 -
3.2.3	Enregistrement d'ECG par Langendorff.....	- 76 -
3.3	Courants calciques	- 79 -
3.3.1	Groupe femelle.....	- 81 -
3.3.2	Groupe mâle.....	- 88 -
4	Discussion	- 93 -
4.1	Efficacité de détection de la technique utilisée pour le génotypage	- 93 -
4.2	Dosage des oestrogènes : efficacité de la technique et implications des valeurs mesurées.....	- 94 -
4.3	Le modèle ERKO : modèle d'étude de la régulation hormonale de la repoliarisation cardiaque par les oestrogènes.....	- 99 -
4.4	Paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo ou l'impact global sur le myocarde d'une stimulation oestrogénique partielle	- 100 -
4.5	Canaux calciques et repolarisation cardiaque	- 102 -
4.5.1	Approche du patch clamp.....	- 102 -
4.5.2	Importance du courant calcique de type L dans le myocarde.....	- 104 -
4.5.3	Conséquences d'une stimulation oestrogénique complète, partielle ou nulle sur le canal calcique de type L.....	- 105 -
5	Conclusion et perspectives.....	- 109 -
6	Bibliographie.....	- 111 -

Liste des figures

Figure 1-1: Synthèse des hormones sexuelles	- 10 -
Figure 1-2: Analyse phylogénétique et alignement de la séquence des acides aminés des récepteurs aux hormones stéroïdiennes.....	- 13 -
Figure 1-3 : Domaines présents dans le récepteur alpha et bêta	- 14 -
Figure 1-4: Mécanisme moléculaire relié à l'action du récepteur aux oestrogènes. -	15 -
Figure 1-5 : Mécanisme d'action génomique de l'œstrogène.....	- 17 -
Figure 1-6 : Mécanisme d'action du GPR30.....	- 19 -
Figure 1-7: Génération des souris ERKO	- 28 -
Figure 1-8 : Électrocardiogramme chez l'humain et électrophysiologie cardiaque-	32
Figure 1-9 Électrocardiogramme chez la souris.....	- 33 -
Figure 1-10: Schéma du cœur et propagation de l'influx.....	- 35 -
Figure 1-11: Sous -unité du canal calcique cardiaque de type L	- 37 -
Figure 1-12: Entrée du calcium à travers le canal calcique de type L et initiation du couplage excitation-contraction	- 42 -
Figure 3-1 : Génotypage des souris ERKO α	- 56 -
Figure 3-2 : Génotypage des souris ERKO β	- 57 -
Figure 3-3: Dosage du 17 β -oestradiol dans des échantillons sériques de souris	- 59 -
Figure 3-4 : Impact de l'absence de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde chez le groupe de souris femelles.....	- 63 -
Figure 3-5 : Impact de l'absence de l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris femelles.....	- 65 -
Figure 3-6 : Impact de l'absence totale de stimulation oestrogénique sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris femelles	- 66 -

- Figure 3-7: Impact de l'absence de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris mâles** - 68 -
- Figure 3-8: Impact de l'absence de l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris mâles** - 70 -
- Figure 3-9 : Enregistrement d'ECG par télémétrie dans le groupe femelle ERKO β - 73**
- Figure 3-10 : Enregistrement d'ECG par télémétrie dans le groupe mâle ERKO β - 75 -**
- Figure 3-11 : Enregistrement d'ECG par Langendorff dans le groupe femelle ERKO β** - 78 -
- Figure 3-12: Effet de l'absence de stimulation oestrogénique partielle ou totale sur la densité des courants calciques de type L mesurés dans le groupe femelle.....- 83 -**
- Figure 3-13 : Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'activation du courant calcique de type L dans le groupe femelle..... - 85 -**
- Figure 3-14: Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe femelle. - 87 -**
- Figure 3-15: Effet de l'absence de stimulation oestrogénique totale sur la densité des courants calciques de type L mesurés dans le groupe mâle - 89 -**
- Figure 3-16 : Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe mâle.- 91**
- Figure 3-17: Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe mâle.- 92**

*Je n'ai pas échoué, j'ai juste découvert 1000
moyens qui ne fonctionnaient pas.*

Thomas Edison

Remerciements

J'aimerais remercier le Dre Céline Fiset pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser ce projet. Son aide et son support m'ont permis de progresser scientifiquement.

J'aimerais remercier mes collègues du laboratoire : Katy Rivard, Scott Grandy, Gracia El Gebeily et Marie-Andrée Lupien pour leurs précieux conseils techniques et scientifiques. De par votre aide toujours au rendez-vous dans les moments importants et votre écoute vous avez contribué à ma réussite et êtes devenus de fidèles compagnons.

J'aimerais aussi remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation. Marc-Antoine Gillis pour ses conseils et sa collaboration pour les expérimentations in vivo et ex vivo ainsi que Denis Chartier pour sa précieuse expertise pour le système d'enregistrement de patch clamp.

J'aimerais finalement remercier mon copain, ma famille et mes amis qui m'ont encouragé à persévérer malgré les difficultés et à toujours donner le meilleur de moi-même.

À vous tous merci de tout cœur!

1 Introduction

1.1 Œstrogènes

1.1.1 Définition

1.1.1.1 Les hormones stéroïdiennes

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles faisant partie de la grande famille des hormones stéroïdiennes. Cette famille d'hormones est synthétisée à partir du cholestérol. La présence de plusieurs cycles aromatiques confère une bonne liposolubilité aux oestrogènes. Cette propriété leur permet de traverser aisément la double couche de phospholipides constituant la membrane cellulaire [1].

Les œstrogènes sont synthétisés par l'enzyme aromatase. Cette enzyme transforme le noyau des hormones androgéniques en un composé aromatique et clive par la suite le méthyl en position C19. Les oestrogènes peuvent être présents sous trois formes. La forme prédominante dans l'organisme est le 17β -oestradiol, molécule obtenue par transformation directe de la testostérone [2]. Les oestrogènes sont aussi présents sous la forme d'oestrone (E1) et sous la forme de l'oestriol (E3). (Figure 1-1)

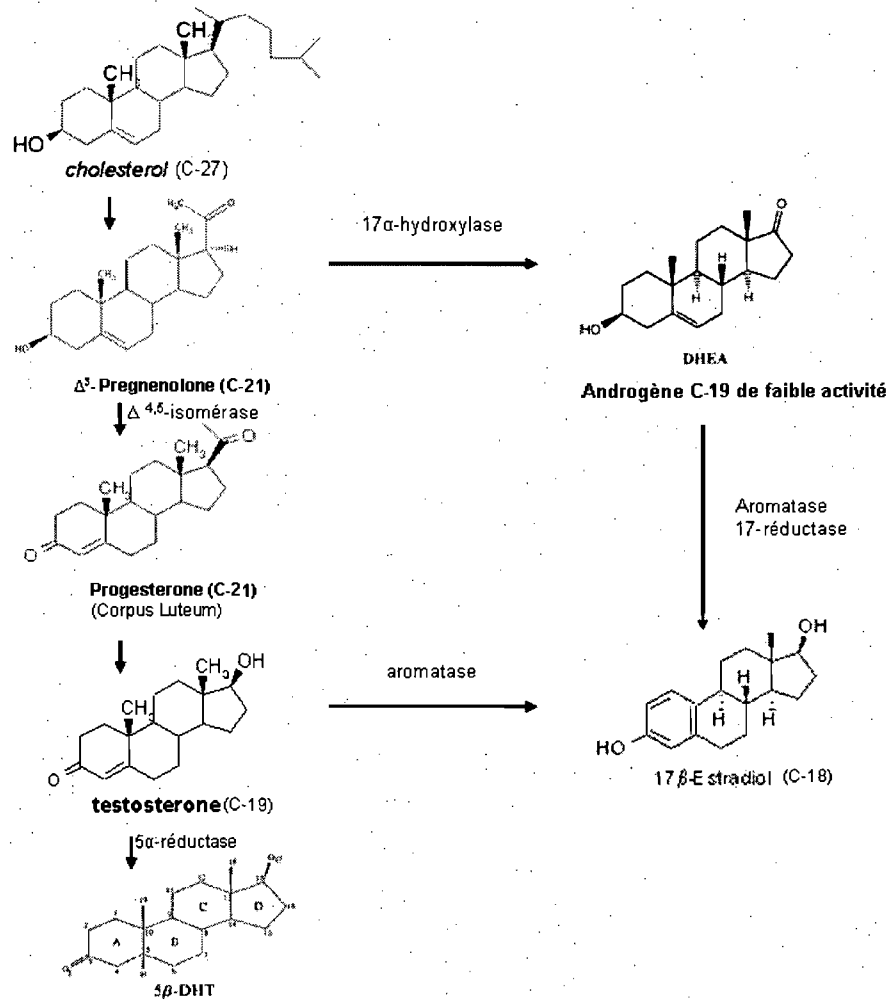


Figure 1-1: Synthèse des hormones sexuelles

Les hormones sexuelles sont synthétisées à partir du cholestérol. La première hormone qui est synthétisée est la pregnénolone (C-21). Suivant un changement de conformation la progésterone (C-21) est obtenue. Grâce à une modification, la testostérone (C-19) est ensuite obtenue. Finalement, le 17-β-oestradiol, forme prédominante de l'œstrogène est synthétisé, suivant l'aromatation de la testostérone par l'aromatase.

La métabolisation des oestrogènes s'effectue via une réaction d'hydroxylation [3].

Les enzymes cytochromes P450 (CYP450) 1A et 1B sont responsables de cette réaction.

Les CYP450 peuvent effectuer plusieurs types de réactions différentes, telles que la

métabolisation du cycle aromatique A ou du cycle aromatique D, ou des réactions de sulfatation ou de glucuronidation. L'ensemble de ces réactions mène à la métabolisation du composé. Cependant, les produits de métabolisation obtenus différeront selon le type de réaction de métabolisation effectuée. Le 2-hydroxyestrone et le 4-hydroxyestrone seront obtenus pour une métabolisation du cycle aromatique A et le 16 α -hydroxyestrone et l'oestriol pour une métabolisation du cycle aromatique D. Finalement, la majorité des produits obtenus des réactions de sulfatation et de glucuronidation seront conjugués, dégradés et éliminés de l'organisme via l'urine ou la bile [2, 4].

1.1.1.2 Concentration physiologique des oestrogènes

Les concentrations d'oestrogènes varieront, chez la femme, à des valeurs précises tout au long de sa vie. Les oestrogènes sont retrouvés à une concentration moyenne de 100 pg/mL chez la femme adulte lors de la phase folliculaire, à une concentration moyenne de 187-804 pg/mL lors de la phase lutéale et de 95-580 pg/mL lors de la phase folliculaire. Les oestrogènes atteindront une concentration moyenne de 600 pg/mL lors de la phase ovulatoire et de 20000 pg/mL lors de la grossesse. Ces niveaux redescendront à des valeurs similaires à celles retrouvées chez l'homme, lors de la ménopause, soit de 5-20 pg/mL [2].

1.1.2 Production

Les oestrogènes sont majoritairement produits dans des organes reliés à la reproduction, cependant, les réponses engendrées par ces hormones sont loin de se limiter uniquement au système reproducteur. Chez la femme, les oestrogènes sont majoritairement

produits par les ovaires [5], lors de la formation du corps jaune et par le placenta. Chez l'homme, les oestrogènes sont majoritairement produits par les testicules. Outre ces sites de production reliés au système reproducteur, les œstrogènes sont aussi sécrétés de façon moins importante par les glandes surrénales et les tissus adipeux.

1.1.3 Récepteurs aux oestrogènes

1.1.3.1 La famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens

Les récepteurs nucléaires agissent comme des facteurs de transcription, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'activer directement la transcription de gènes ciblés suivant leur activation par la liaison du ligand.[6]. Il existe plusieurs groupes de récepteurs nucléaires, tels que les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les récepteurs de l'acide rétinoïque, le récepteur à la vitamine D et les récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Les récepteurs aux oestrogènes appartiennent au groupe des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR). D'autres familles de récepteurs sont classées dans ce groupe tels que les récepteurs aux glucocorticoïdes, les récepteurs aux minéralocorticoïdes, les récepteurs à la progestérone et les récepteurs aux androgènes [7]. Une grande similarité phylogénétique (évolution et parenté des gènes) et structurale caractérise l'ensemble des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Figure 1-2).

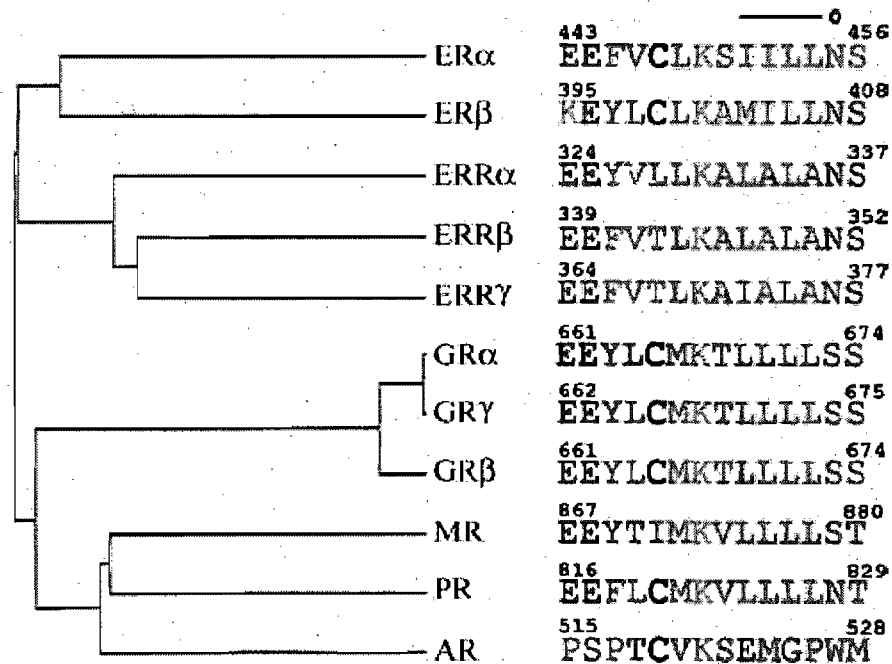


Figure 1-2: Analyse phylogénétique et alignement de la séquence des acides aminés des récepteurs aux hormones stéroïdiennes

Il existe une grande homologie de séquences et un niveau de conservation élevé entre les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs stéroïdiens. La séquence de droite correspond à la portion du gène essentielle pour la localisation et la liaison des récepteurs SHR à la membrane. Adapté de [7]

1.1.3.2 Les isoformes du récepteur aux oestrogènes

Deux isoformes du récepteur nucléaire aux oestrogènes sont connus à ce jour, soit le récepteur alpha (595 acides aminés) et le récepteur bêta (485 acides aminés) [8]. Chacun de ces récepteurs est exprimé par un gène distinct [9-11]. Les deux isoformes du récepteur ont de grande similarité structurale et sont constitués de six domaines (A-F). Chacun de ces domaines possède des propriétés distinctes et essentielles à l'activation du récepteur et à la transcription de gènes cibles (Figure 1-3).

Les domaines A et B sont localisés dans la portion N-terminale du récepteur. Ces domaines sont peu conservés entre l'isoforme alpha et bêta. Ils contiennent le domaine AF-1, responsable de l'activation transcriptionnelle indépendante constitutive du ligand [8, 9]. Le domaine C présente 95% d'homologie de séquences entre les deux isoformes du récepteur, faisant de cette portion, celle étant la plus conservée [5, 9, 12, 13]. Ce domaine est caractérisé par la présence d'un doigt de zinc (motif impliqué dans la formation de séquences liant l'ADN). Le doigt de zinc permet de lier avec spécificité et haute affinité les éléments de réponses aux oestrogènes (ERE).

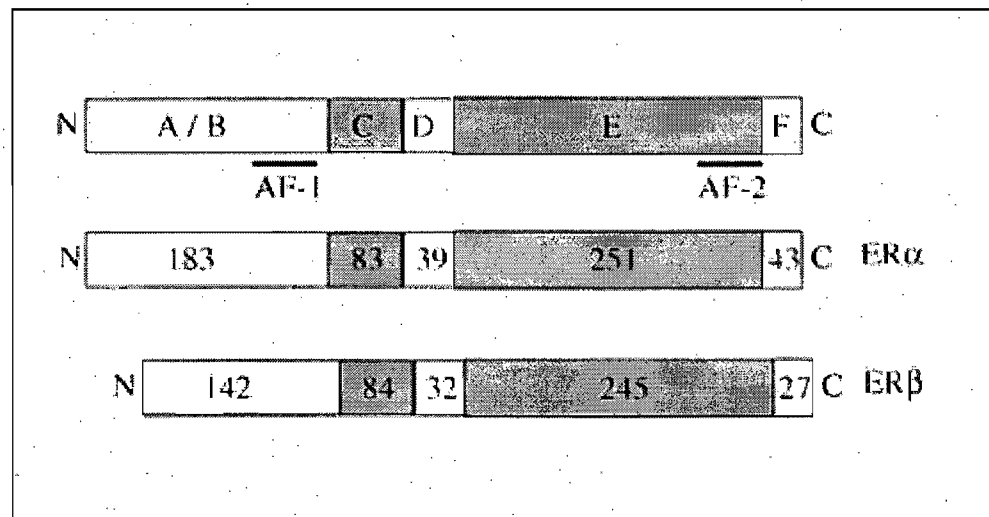


Figure 1-3 : Domaines présents dans le récepteur alpha et bêta

Les deux récepteurs sont constitués de six domaines, soit une portion N-terminale (A/B), un domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation (C), un domaine facilitant la localisation nucléaire (D), un domaine pour la liaison du ligand (E) et un domaine influençant l'activité co-régulatrice (F). Ces domaines possèdent un niveau de conservation variable entre les deux isoformes du récepteur propre à chaque région. Adapté de [14]

Les ERE sont des séquences de palindromes composés de 13 paires de bases (GGTCAnnnTGACC) dont une portion centrale est variable. La composition de la portion variable influencera le type de coactivateurs qui seront recrutés pour interagir avec le complexe ligand-récepteur [15]. Les coactivateurs sont pour la plupart des protéines d'environ 160 kDa, telles que SRC1, TIF2/GRIP1, CBP/p300 [12, 13, 16]. Le domaine D possède 55% d'homologie entre les deux isoformes du récepteur [13]. Il est responsable de la localisation nucléaire du complexe ligand-récepteur. Le domaine E contient une portion AF-2, responsable de l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand [13, 14] et est responsable de la liaison du récepteur avec le ligand. Finalement, le domaine F, conservé à seulement 18% entre les deux isoformes du récepteur, influence l'activité co-régulatrice (Figure 1-4) et la dimérisation du récepteur [8].

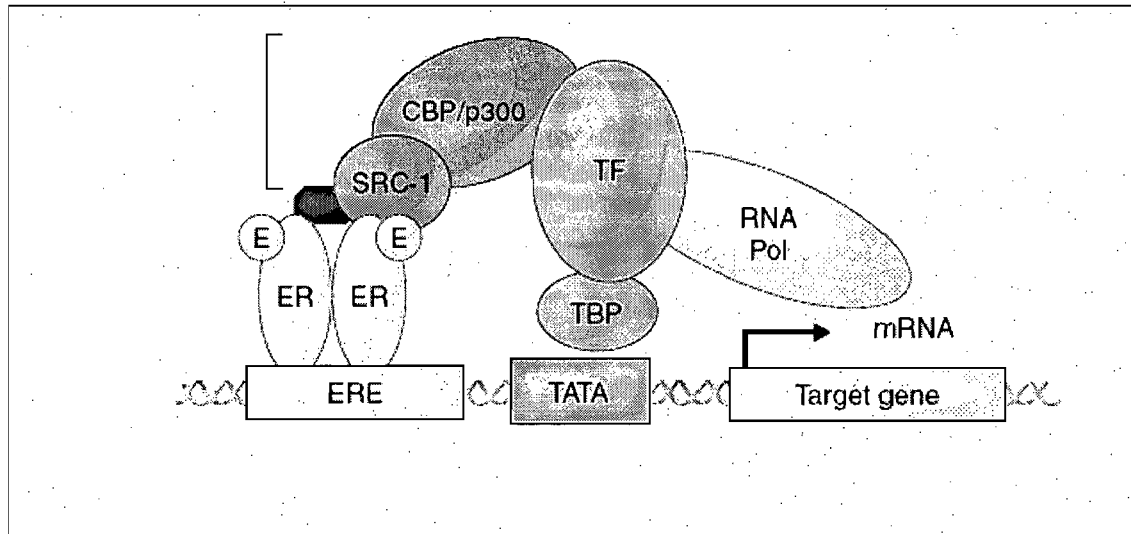


Figure 1-4: Mécanisme moléculaire relié à l'action du récepteur aux oestrogènes.

Suivant l'activation du récepteur (ER) par le ligand (E) le complexe dimérise et transloque au noyau et se lie aux éléments de réponse aux oestrogènes (ERE). Les coactivateurs (CBP/p300 et SRC-1) favorisent cette interaction. Les facteurs de transcription (TF)

peuvent ensuite être recrutés, se lient à leurs promoteurs (TBP, TATA) et activent la transcription de gènes cibles par l'ARN polymérase. Adapté de [17]

1.1.3.3 Modes d'activation des récepteurs nucléaires aux oestrogènes

Suivant la liaison de leur ligand, les récepteurs aux oestrogènes se dimérisent (homodimère ou hétérodimère). Le changement de conformation amené par la liaison du ligand permet le recrutement des coactivateurs. Ces derniers favorisent la liaison aux éléments de réponse ciblés aux oestrogènes (ERE), localisés dans la région promotrice de certains gènes tels que le gène du facteur natriurétique atrial (ANF) ou le gène de la synthétase nitrique oxydative endothéliale (eNOS) [9].

La transcription d'un gène en particulier est déterminée par la séquence de la portion variable des ERE. Il existe une grande variété de séquences variables ce qui rend possible la stimulation de la transcription d'une grande variété de gènes [15]. La transcription des gènes est un processus qui nécessite normalement un délai de quelques heures et peut être engendrée par trois mécanismes distincts (Figure 1-5) [18] :

1. Mécanisme d'action classique : suivant la liaison avec le ligand, le récepteur se dimérise et transloque au noyau. Il se lie à la séquence ERE favorisant la transcription de gènes cibles [9, 18].
2. Mécanisme d'action génomique indépendant des ERE : le complexe oestrogène-récepteur se lie à une autre séquence dans le noyau, par exemple l'activateur protéique AP-1, favorisant la transcription d'une autre série de gènes ciblés. Le tiers

des gènes régulés par le récepteur aux oestrogènes ne contient pas la séquence complète ERE, mais plutôt des fractions de cette dernière [9, 18].

3. Mécanisme d'action génomique indépendant des œstrogènes : le récepteur aux oestrogènes est activé par un ligand autre que les oestrogènes, par exemple un facteur de croissance. Le récepteur activé se lie aux ERE et enclenche la transcription de gènes cibles [9, 18].

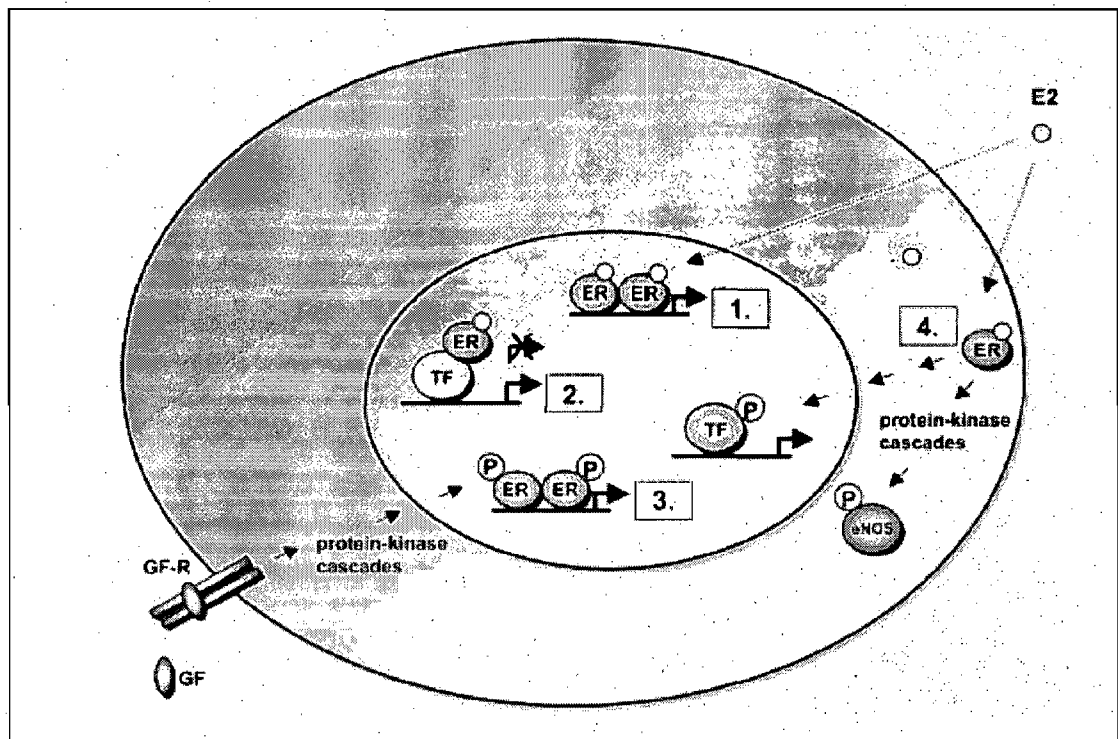


Figure 1-5 : Mécanisme d'action génomique de l'œstrogène.

Il existe trois mécanismes d'action des œstrogènes qui résultent en la transcription de gènes cibles. Le mécanisme classique (1) où les œstrogènes se lient au récepteur, transloquent au noyau et lient le ERE. Le deuxième mécanisme d'action est génomique et indépendant des ERE (2). Il enclenche la transcription d'une série de gènes qui ne sont pas sous le contrôle des ERE. Le troisième mécanisme d'action est génomique et indépendant de la présence des œstrogènes (3). Suivant l'activation du récepteur des facteurs de croissance une cascade de protéines kinases est enclenchée ce qui permet l'activation du récepteur aux oestrogènes et la transcription de gènes sous le contrôle des ERE. Le quatrième mécanisme d'action est non génomique et implique l'activation d'un récepteur aux oestrogènes à la membrane

cytoplasmique. Abréviations (ER : Estrogen Receptor, eNOS : endothelial nitric oxide synthase, TF : transcription factor, GF : growth factor, GF-R : growth factor receptor) Adapté de [18]

1.1.3.4 Le récepteur membranaire aux oestrogènes et son mécanisme d'action

Un troisième récepteur aux oestrogènes a été identifié dans les dernières années [19]. Il est localisé à la membrane plasmique comparativement aux deux autres isoformes du récepteur qui sont localisées au noyau. Ce récepteur ne fait pas partie de la famille des facteurs de transcription activés par un ligand mais plutôt de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est dénommé GPR30 est constitué de sept domaines transmembranaires et est couplé à une protéine G.

Le mode d'action des récepteurs aux protéines G diffère grandement de celui des facteurs de transcription. Leur stimulation n'active pas directement des gènes mais plutôt le recrutement de sous-unités qui engendrent certaines cascades précises de seconds messagers et des protéines kinases. L'activation de récepteur membranaire serait associée à des actions quasi immédiates comparativement aux récepteurs nucléaires qui nécessitent plusieurs heures avant que les conséquences de la transcription de leurs gènes se traduisent par un effet physiologique.

Quoiqu'il en soit, le mécanisme d'action du récepteur membranaire GPR30 reste encore à élucider. Des conséquences variées sont engendrées selon le type de sous-unité recrutée par le récepteur aux protéines G. Certains travaux suggèrent que le recrutement de la sous-unité alpha permettrait d'engendrer l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc [9, 18, 20]. Un autre mécanisme d'action possible impliquerait cette

fois-ci le recrutement des sous-unités bêta et gamma et entraînerait la synthèse et la relâche du facteur endothelial de croissance (EGF). L'activation de la sous-unité bêta et gamma est aussi impliqué dans la modulation des canaux potassiques Kir3 [21] [22] Le ligand EGF est essentiel à l'activation du récepteur EGF impliqué dans les phénomènes [20, 23]. (Figure 1-6)

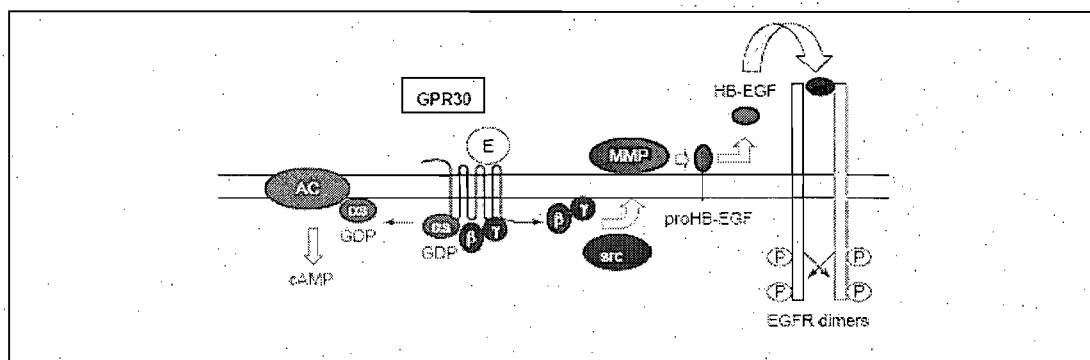


Figure 1-6 : Mécanisme d'action du GPR30

Comparativement aux récepteurs ER α et ER β , le récepteur GPR30 est impliqué dans l'action non génomique des oestrogènes. Ce mécanisme d'action produit des conséquences physiologiques beaucoup plus rapidement que l'activation génomique du récepteur. Son mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé mais plusieurs évidences suggèrent que suivant la liaison de l'oestrogène au GPR30, l'adénylate cyclase et la métalloprotéase matricielle sont activées. Cette activation amène l'augmentation d'AMPC et le clivage et la relâche du HB-EGF. Ce dernier se lie au récepteur EGF et favorise la survenue de certains événements. Adapté de [23].

1.1.4 Distribution des récepteurs aux oestrogènes

Les récepteurs aux oestrogènes sont présents dans une multitude de tissus et organes ce qui témoigne bien de la grande diversité de leurs actions. Cependant, le patron de distribution diffère énormément entre les deux récepteurs ce qui suggère qu'ils n'exercent pas les mêmes fonctions [24]. Les récepteurs aux oestrogènes sont très présents au niveau

du système reproducteur mâle/femelle quoiqu'ils n'y soient pas exprimés uniformément. L'isoforme alpha est majoritairement exprimée dans l'utérus, le stroma de la prostate et dans l'épithélium et le stroma mammaire. L'isoforme bêta, quant à elle, est exprimée majoritairement dans les cellules granuleuses des ovaires et dans l'épithélium de la prostate. La différence dans les patrons de distribution du récepteur explique que les deux isoformes sont impliqués dans la régulation de processus physiologiques distincts.

Outre le système reproducteur, les récepteurs alpha sont aussi retrouvés dans les os [25], le cerveau, le thymus, le foie et dans le myocarde. Le récepteur bêta est plutôt retrouvé dans les ganglions sympathiques, le côlon, le myocarde, la moelle osseuse, le système osseux et les tissus adipeux [8, 17, 26-29].

Le récepteur GPR30 présente lui aussi un patron de distribution qui lui est propre. Il est très présent dans le tissu mammaire où il aurait une implication dans la progression de certains cancers du sein [30]. Ce récepteur est aussi largement distribué dans le système nerveux central où ces implications sont potentiellement multiples [31].

1.1.5 Rôles des récepteurs aux oestrogènes

1.1.5.1 Reproduction

Les récepteurs aux oestrogènes sont très impliqués dans le système reproducteur. L'isoforme alpha y exerce toutefois un rôle prédominant [5, 26, 32, 33]. Chez la femme, son activation amène l'augmentation du poids de l'utérus [5], la prolifération des cellules épithéliales et l'induction de gènes [34]. Le récepteur alpha serait aussi impliqué dans la

maturation et le développement des glandes mammaires et dans la rétro-inhibition du gène de la sous-unité β de l'hormone luthéinisante (LHB) suivant la production de gonadotropines [34]. L'isoforme bêta exerce un rôle moins crucial sur la reproduction.

Bien que les oestrogènes soient en concentrations plus importantes chez la femme que chez l'homme, ces hormones sont aussi impliquées dans divers processus de la reproduction masculine [10]. L'isoforme alpha est essentielle à la formation des tubes séminifères, à la maturité des spermatozoïdes et aux comportements sexuels favorisant la reproduction [14, 26].

1.1.5.2 Cardiovasculaire

Selon un nombre important d'études, les œstrogènes exerceraient un rôle protecteur sur le système cardiovasculaire [9, 17, 35-38]. Toutefois, le mécanisme exact de cette cardioprotection reste encore à être élucidé avec plus de certitude [9, 39]. Les travaux de différentes équipes de recherche permettent cependant d'envisager plus clairement certaines pistes. Il est en effet suggéré que cette protection serait à la fois au niveau vasculaire et cardiaque mais serait prioritairement enclenchée lors du développement de pathologies tels que l'athérosclérose ou l'infarctus du myocarde [9]. De plus, il semblerait que dépendamment du contexte, une isoforme particulière du récepteur serait responsable de médier la cardioprotection. En effet, certaines études affirment que le récepteur alpha exercerait un effet protecteur prédominant lors de la vasodilatation des petites artères [40], de la protection de la taille de la cicatrice suivant un infarctus du myocarde [41, 42], de la régulation des niveaux de LDL (low density lipoprotein) et contre le développement de

l'obésité [43]. D'autres études affirment que l'isoforme bêta du récepteur serait plutôt responsable de médier la survie et la protection suivant un infarctus du myocarde chronique [44] et d'exercer la protection contre le développement de l'hypertrophie du ventricule gauche [45-47] en situation d'ischémie-reperfusion [48] et au niveau vasculaire [49]. Dans certaines situations, il semblerait même que les deux récepteurs exercent avec la même importance cet effet cardioprotecteur. À cet effet, certains groupes ont démontré que lors de l'infarctus du myocarde, les deux isoformes du récepteur exerceraient cette protection avec la même importance [48] et il en serait de même lors de la protection vasculaire suivant une blessure imposée aux vaisseaux [36, 50, 51]. Les œstrogènes exerceraient aussi une cardioprotection indirecte via l'augmentation des niveaux de HDL (high density lipoprotein) et la diminution des niveaux de LDL circulants, facteurs contribuant à la prévention du développement et de la progression de certaines maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose [35].

1.1.5.3 Hormonothérapies de remplacement (HTR)

La ménopause correspond à la période de vie chez la femme où l'activité ovulatoire de même que les menstruations sont arrêtées. C'est aussi à cette période que la sécrétion des œstrogènes est grandement diminuée amenant avec elle son lot de problèmes physiologiques tels que les bouffées de chaleur, les sueurs abondantes, la sécheresse vaginale, la prise de poids, la perte de la masse osseuse et les troubles de l'humeur pouvant mener à la dépression. Outre ces problèmes apparents, la diminution des œstrogènes à la ménopause est aussi associée à un risque accru de survenue de maladies cardiovasculaires

chez ces femmes [52]. De nombreuses solutions ont été envisagées afin de palier à ces problèmes. Dans ce contexte, l'utilisation de l'hormonothérapie de remplacement semble tout indiquée chez la femme au début de la ménopause [53, 54]. Plusieurs études préliminaires réalisées chez des modèles animaux ont permis d'observer des effets bénéfiques associés à la prise d'oestrogène, sur la prévention de certaines pathologies cardiovasculaires [35, 55-58]. Cependant, les résultats de plusieurs études cliniques présentent des résultats divergents et ne permettent pas d'affirmer si oui ou non ces tendances se confirment chez la femme ménopausée.

1.2 Impact clinique des œstrogènes sur les maladies cardiaques

1.2.1 Études WHI et HERS

1.2.1.1 Controverse

Les études WHI (Women Health Initiative) [59-61] et HERS (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study) [62] sont les premières grandes études randomisées qui se sont intéressées au rôle cardioprotecteur potentiel des hormonothérapies de remplacement (œstrogène seul ou œstrogène et progestérone combinés) chez des femmes post-ménopausées n'ayant pas subi d'hystérectomie.

L'objectif poursuivi par ces études était de valider pour la première fois chez la femme ménopausée le rôle cardioprotecteur potentiel des oestrogènes tel qu'observé lors

d'études expérimentales.[35] L'ampleur des effets de l'hormonothérapie de remplacement (HTR) sur la prévalence du développement de divers événements cardiovasculaires, du cancer du sein invasif et de l'ostéoporose a donc été mesurés sur de grandes cohortes de femmes américaines post-ménopausées [62-64].

Plusieurs conclusions se dégagèrent de ces deux grandes études randomisées. En ce qui concerne la prévalence de développement de maladies cardiovasculaires, les résultats obtenus indiquaient que le risque était augmenté lors de la prise de HTR. Ces résultats étaient contraires à tout ce qui avait été préalablement observé au niveau expérimental.

Une grande controverse entoura l'accueil des conclusions de ces grandes études randomisées par la communauté scientifique. Les lignes directrices y étant énoncées ont amener un grand nombre de cliniciens à prescrire ou non des HTR aux femmes post-ménopausées. Or, il se trouve que ces lignes directrices étaient diamétralement opposées à celles obtenues à ce jour par un grand nombre d'études expérimentales sur les effets cardioprotecteur potentiels des oestrogènes [65]. Les conclusions des études WHI et HERS étaient-elles suffisamment étoffées pour justifier de nouvelles directives? Des scientifiques se penchèrent sur plusieurs facettes douteuses de ces études [2, 66], telles que la sélection des candidates, le design de l'étude, les résultats et leurs conclusions en reconsidérant l'ensemble de ces paramètres. Les résultats et les conclusions qu'ils ont obtenus sont eux aussi plus que surprenants [67-70].

1.2.1.2 Sélection des candidates

La sélection des participantes est l'une des faiblesses majeures de ces études. En effet, l'âge moyen de recrutement des participantes est de 63,2 ans alors que l'âge moyen d'entrée en post-ménopause chez les femmes américaines est de 51,1 ans. Un grand écart sépare donc les candidates sélectionnées des femmes pour lesquelles s'appliqueront les conclusions de l'étude. De plus, entre 51 et 63 ans, des dommages au niveau cardiovasculaire ont eu le temps de s'installer. [68, 71].

Le début de l'utilisation de l'hormonothérapie de remplacement était aussi très tardif chez ces femmes. Comme l'âge moyen des femmes enrôlées dans ces études était d'environ 63,2 ans, soit plus de 10 ans suivant l'âge du début de la ménopause chez la femme, beaucoup de conditions favorisant l'apparition de pathologies cardiovasculaires ont pu s'installer. Ces conditions préliminaires particulières ne sont pas conformes avec la manière utilisée actuellement, en clinique, lors de l'instauration de ce type de traitement et ne favorisent pas la réussite d'un traitement à vocation primaire préventive.

Il est à noter que 90% des femmes participant à l'étude sont caucasiennes [68]. La puissance des groupes de minorités visibles est insuffisante et aucune analyse n'a été réalisée sur chacun de ces sous-groupes. Les conclusions pour les minorités visibles ne sont pas applicables aux femmes appartenant à une origine ethnique autre que caucasienne en ce qui concerne l'utilisation d'une HTR [71].

Un pourcentage très élevé des candidates recrutées étaient fumeuses ou ex-fumeuses, hypertendues, diabétiques ou possédaient de très hauts niveaux de LDL. Ces

conditions confondantes n'ont pas été considérées dans des sous-groupes lors de l'analyse et n'aident en rien la prévention de l'apparition de maladies cardiovasculaires.

1.2.1.3 Design de l'étude

Le design de l'étude est lui aussi non optimal. Les candidates étaient appelées à utiliser une HTR composée d'œstrogène seul, d'oestrogène et de progestérone ou encore un placebo. L'ensemble des femmes ont aussi consommé parallèlement des suppléments de carbonate de calcium et de vitamine D3, rendant impossible la distinction du rôle de l'HTR ou de la vitamine D3, dans la diminution du risque relatif de développement d'ostéoporose et du risque diminué de fracture [71].

1.2.1.4 Analyse statistique

L'une des plus grande faiblesse de ces études demeure la méthode statistique utilisée lors de l'analyse. L'ensemble des tests utilisés ont été réalisés de manière adéquate, cependant, leur interprétation a été présentée de manière erronée. En effet, le risque relatif face au développement des maladies cardiovasculaires entre les groupes était calculé correctement, mais ces résultats ont été présentés comme étant le risque absolu applicable à l'ensemble de la population. Or, lorsque le risque absolu correspond à un tout autre calcul. Lorsqu'il est réellement calculé avec les données recueillies lors de l'étude sa valeur est faible, voire négligeable. Malheureusement, le risque relatif de ces études cliniques a été interprété en risque absolu et a été utilisé afin de justifier la mise en place de nouvelles

directives en ce qui concerne l'hormonothérapie de remplacement. De nombreuses femmes sont en conséquence privées des bienfaits de ce type de thérapie [67].

Beaucoup d'attentes étaient reliées aux grandes études randomisées WHI et HERS, car pour la première fois, le devis de ces études allaient permettre d'avoir une meilleure idée du rôle cardioprotecteur potentiel des HTR chez la femme post-ménopausées. Cependant, devant le manque de rigueur de l'information, il reste encore beaucoup à faire afin de comprendre le rôle cardioprotecteur potentiel des oestrogènes. De nombreux outils très précis émergent et permettent une étude approfondit du phénomène. Les modèles d'animaux transgéniques, qui sont à notre disposition depuis quelques années, représentent un outil précieux pour comprendre de nombreux processus physiologiques.

1.3 Le modèle transgénique

Les souris ERKO (estrogen receptor knock-out), un modèle de souris transgénique, se caractérise par l'absence de récepteurs fonctionnels aux oestrogènes de type alpha (ERKO α) ou bêta (ERKO β). Ce modèle a été généré par l'insertion d'une séquence de 1,8 kB, contenant le gène de la résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur PGK. Il est localisé dans le site unique *Not1* de l'exon 2 d'un fragment du gène du récepteur alpha [72]. Cette séquence fut intégrée à un vecteur possédant les séquences nécessaires à son insertion dans le gène du récepteur alpha. Le vecteur modifié fut intégré dans des cellules souches embryonnaires. L'insert de 270 paires de bases est retrouvé en aval du site de départ de la traduction du gène de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes. Il en

résulte l'absence de l'expression d'un récepteur aux oestrogènes fonctionnel [8, 73].

(Figure 1-7)

L'approche utilisée pour générer les souris ERKO β est similaire [73] à celle pour le récepteur aux oestrogènes alpha. La différence réside dans le lieu d'insertion du vecteur. Cette fois-ci, il est inséré dans le site unique *Pst*I de l'exon 3 du gène, ce qui empêche la traduction de l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes [8, 74].

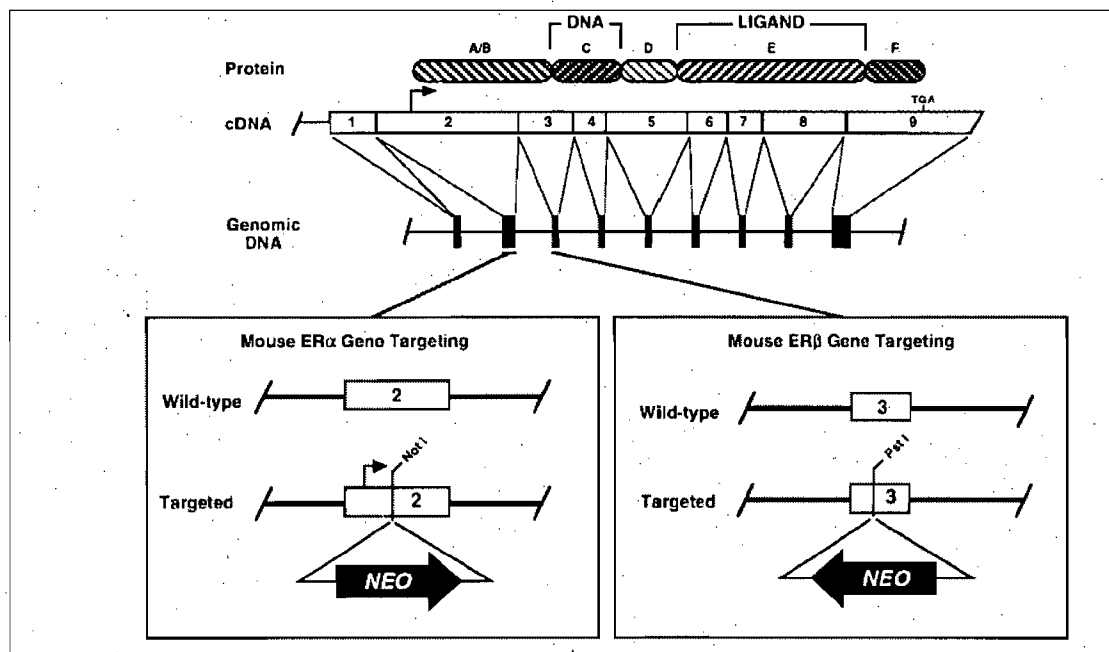


Figure 1-7: Génération des souris ERKO

La méthode utilisée pour générer les souris transgéniques ERKO α et ERKO β est similaire. La différence entre ces deux modèles est le lieu d'insertion du gène de la néomycine dans le gène du récepteur ainsi que son orientation. Pour le modèle ERKO α , l'insertion est effectuée dans le site unique Not 1 de l'exon 2 et dans la même orientation que le sens de traduction du gène. Pour le modèle ERKO β , l'insertion est effectuée dans le site unique PstI de l'exon 3 et dans l'orientation inverse au sens de traduction du gène. Adapté de [8]

Le modèle transgénique ERKO est un modèle qui permet d'étudier la perte de fonction de l'isoforme alpha ou bêta du récepteur aux oestrogènes [75]. Comme la majorité des modèles transgéniques de perte de fonction, les mutations présentées dans le gène du récepteur aux oestrogènes chez le modèle ERKO sont récessives [74]. Comme mentionné précédemment, les récepteurs aux oestrogènes sont impliqués dans plusieurs processus. Leur absence résulte donc en des conséquences multiples [76]. En effet, le système reproducteur et le développement embryonnaire sont hautement affectés par l'absence des récepteurs aux oestrogènes [74, 77]. Plus particulièrement, l'absence du récepteur alpha engendre des problèmes dans le phénotype de l'utérus, des ovaires, des testicules, lors du développement intra-utérin des fœtus et dans le comportement sexuel reproducteur des animaux [5, 32]. Cette importance du récepteur alpha dans plusieurs composantes du système reproducteur représente un obstacle majeur dans la génération de souris possédant cette modification génétique.

L'utilisation de modèles transgéniques présente cependant plusieurs défis et inconvénients. Tout d'abord des inconvénients logistiques liés au coût d'acquisition des animaux et au maintien de la colonie qui est plus souvent qu'autrement constituée d'animaux dont la santé est plus fragile que les animaux ne portant pas la perte de fonction. La spécificité des modèles transgéniques liée au blocage d'un unique gène peut toutefois causer des conséquences multiples dans plusieurs systèmes, ce gène pouvant être impliqué dans des mécanismes intracellulaires variés. Finalement, la perte totale de la fonction du gène peut avoir des conséquences amplifiées à différents niveaux (cellulaires, tissulaires)

comparativement à la pathologie réelle et mener à des conclusions erronées sur le phénomène.

Le modèle ERKO offre l'opportunité d'étudier l'impact de l'absence du récepteur aux oestrogènes sur différents systèmes sans nécessiter le blocage de la synthèse des oestrogènes et l'ensemble des conséquences associés à ce blocage. L'utilisation d'antagonistes du récepteur ou d'antagonistes de la synthèse des oestrogènes (inhibiteurs de l'aromatase) entraîne l'apparition de facteurs confondants intrinsèques à l'utilisation de molécules antagonistes; variabilité de la biodisponibilité, de l'efficacité d'action dans différents tissus, organes et modèle animal, de même que la présence d'effets secondaires sur d'autres systèmes. [8].

1.4 Électrocardiogramme (ECG)

L'ECG est un outil essentiel permettant un diagnostic précis du fonctionnement électrique du cœur. L'ECG est obtenu suivant la mise en place d'électrodes à différents endroits précis (12 dérivations sont mesurées chez l'humain). Plus le nombre de dérivations est important, plus la reconstitution de l'image tridimensionnelle de l'activité électrique est précise. L'ECG permet de visualiser les potentiels électriques qui parcourent le myocarde. Plus précisément, le vecteur entre le front positif de dépolarisation et le front négatif de repolarisation représente le potentiel électrique mesuré. Les différentes ondes qui constituent l'ECG permettent de discriminer précisément si des anomalies sont présentes dans l'activité électrique cardiaque.

L'ECG est composé de cinq ondes : P, Q, R, S, et T. Chacune de ces ondes correspond à une portion spécifique de l'activité électrique du cœur. L'onde P représente la durée de la dépolarisation auriculaire, le complexe QRS représente la durée de la dépolarisation ventriculaire, l'onde T représente la durée de la repolarisation ventriculaire et l'intervalle QT correspond à la durée de la repolarisation cardiaque. L'intervalle QT est toujours normalisé en fonction de la valeur du rythme cardiaque et est alors appelé QTc ($QTc = QT/(\sqrt{RR})$).

L'importance de la normalisation du QTc a été observée pour la première fois dans les années 20 par le groupe de Bazett. En effet, ce groupe a constaté que la durée de l'intervalle QT est plus longue chez la femme que chez l'homme bien que la valeur du rythme cardiaque au repos y soit plus élevée [78-81]. Cette observation a par la suite été observée par d'autres groupes. Une prolongation de la durée de l'intervalle QTc se traduit au niveau cellulaire par une prolongation de la durée de la phase plateau (phase 2) et de la phase de repolarisation terminale (phase 3) du potentiel d'action. Voir figure 1-8.

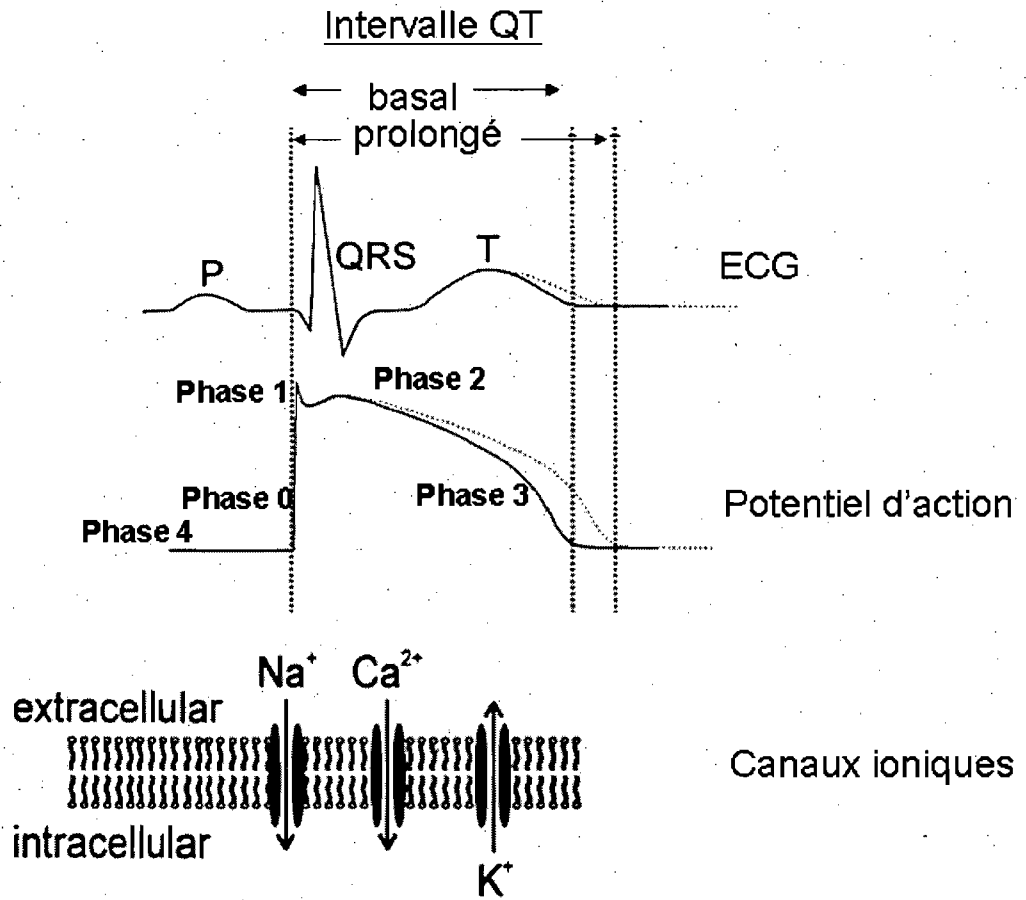


Figure 1-8 : Électrocardiogramme chez l'humain et électrophysiologie cardiaque

L'électrocardiogramme est constitué de cinq ondes (P, Q, R, S, T). Chacune de ces ondes correspond à un événement précis de l'activité électrique du myocarde et est initié par une portion précise du potentiel d'action. Le potentiel d'action ventriculaire est composé de plusieurs phases distinctes. La phase 0 correspond à la dépolarisation rapide de la cellule, moment où les ions Na^+ entrent rapidement dans la cellule. La phase 1 correspond à la repolarisation rapide initiale et est initiée par l'inactivation rapide des canaux sodiques et l'ouverture de certains canaux potassiques. La phase 2 correspond à la phase plateau et est caractérisée par l'ouverture des canaux calciques permettant l'entrée d'ions Ca^{2+} et la sortie d'ions K^+ . La phase 3 correspond à la repolarisation rapide terminale et implique une sortie massive d'ions K^+ . La phase 4 correspond au retour au potentiel de repos, moment où les pompes et les échangeurs s'activent dans le but de rétablir les concentrations d'ions de part et d'autre de la membrane. Adapté de [82]

De manière générale, de grandes similitudes existent dans le profil de l'électrocardiogramme entre les différentes espèces animales. Le profil murin a cependant la particularité d'avoir une onde T très différente de celle de l'humain. Cette différence s'explique par la morphologie respective des potentiels d'action chez chacune de ces deux espèces, celle de la souris comportant une phase rapide positive et une phase lente négative et par la composition et la densité des courants potassiques impliqués dans la repolarisation [83]. Voir figure 1-9.

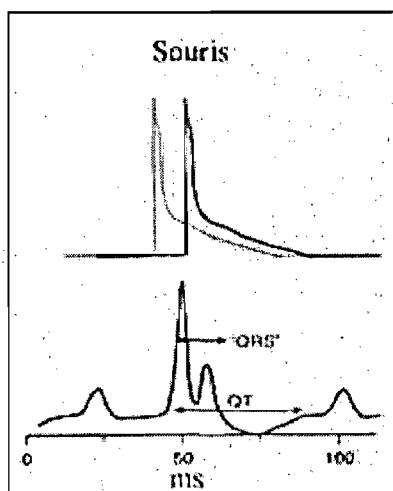


Figure 1-9 Électrocardiogramme chez la souris

Un potentiel d'action typiquement retrouvé chez la souris est représenté dans la portion supérieure de la figure. Dans la portion inférieure de la figure un exemple d'électrocardiogramme typiquement retrouvé chez la souris est représenté. Adapté de [83]

1.4.1 Caractéristiques électrophysiologiques des cellules cardiaques

Les cellules du myocarde possède trois propriétés caractéristiques : l'automaticité, la conductivité et l'excitabilité. L'automaticité, aussi appelé le potentiel pacemaker, est une

propriété détenue uniquement par les cellules automatiques qui sont localisés dans trois foyers distincts : le nœud sinusal, le faisceaux de His et les fibres de Purkinje [84]. Les cellules automatiques de par leur potentiel pacemaker sont les seules à être en mesure de générer l'excitation initiale qui sera par la suite transmise aux cellules musculaires. Cette excitation suit un parcours bien précis qui s'initie dans le nœud sinusal et dépolarise les oreillettes. L'influx se rend ensuite au nœud auriculo-ventriculaire et dans le faisceau de His ce qui permet la dépolarisation ventriculaire. (Figure 1-9)

Le potentiel pacemaker n'a pas besoin d'excitation externe afin de s'enclencher. La cellule dicte par elle-même le rythme d'initiation de sa propre dépolarisation. Comparativement aux cellules musculaires, les cellules automatiques n'entrent pas dans une période réfractaire suivant leur repolarisation. Elles recommencent plutôt à se dépolariser tranquillement jusqu'à l'atteinte d'un nouveau potentiel seuil, où l'excitation sera propagée de nouveau [1]. La transmission de cette onde de dépolarisation d'une cellule cardiaque à une autre s'effectue par le passage des ions dans les jonctions gap. Ce mécanisme permet de rassembler toutes les cellules en une seule entité contractile et permet au cœur de battre à l'unisson.

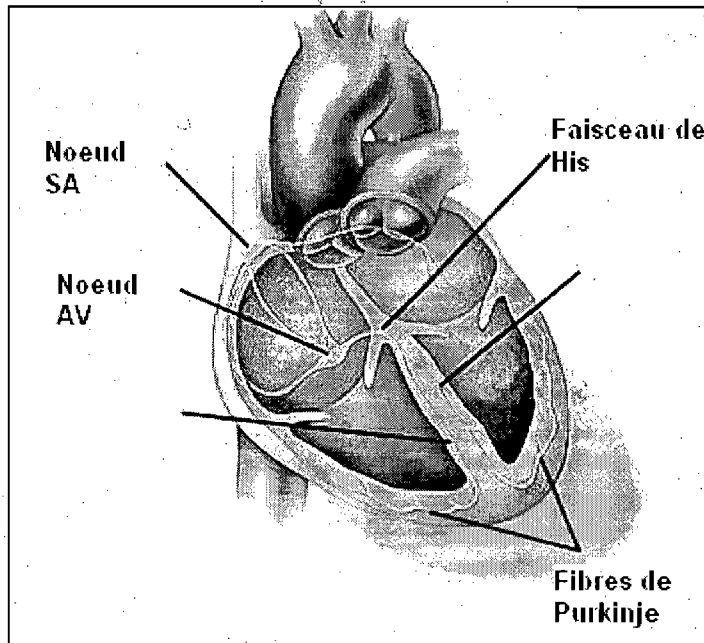


Figure 1-10: Schéma du cœur et propagation de l'influx

Les principaux foyers contenant des cellules automatiques, cellules ayant la capacité d'initier de manière autonome un potentiel d'action sont situés dans le nœud sinusal, les le faisceau de His et les fibres de Purkinje. La propagation de l'influx s'effectue dans ce même ordre. Adapté de [85]

Le potentiel d'action est un événement "tout ou rien" qui se déclenche suivant l'atteinte du seuil d'excitation et se propage de manière unidirectionnelle dans la cellule. Initialement, la cellule est à son potentiel de repos membranaire (-80 mV), potentiel créé par la différence dans la concentration des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les concentrations ioniques sont diamétralement différentes entre le milieu intracellulaire et extracellulaire pour chacun des ions (sodium intra : 5-15 mM; extra : 145 mM, calcium : intra : 0,1 mM; extra : 2,5-5 mM potassium; intra : 140 mM; extra 5mM). Ces différences de concentrations permettent de créer des conditions permettant un flux passif

d'électrolytes de chaque côté de la membrane suivant l'ouverture des canaux permettant leur transport.

Le potentiel d'action est créé par l'ouverture consécutive de trois familles de canaux ioniques dépendants du voltage; les canaux sodiques, les canaux calciques et les canaux potassiques [86]. Dans les cellules musculaires, une excitation externe est essentielle à la dépolarisation initiale de la cellule. L'atteinte du potentiel seuil, permet l'ouverture des canaux sodiques et l'entrée d'ions sodium à l'intérieur de la cellule (Phase 0). La membrane étant maintenant dépolarisée, la phase plateau (phase 2) enclenche la repolarisation grâce à l'ouverture des canaux calciques de même que l'ouverture de certains canaux potassiques. Lors de cette phase, la densité du courant calcique entrant est en équilibre avec la densité du courant potassique sortant de la cellule. Cet équilibre sera maintenu jusqu'à ce que la valeur du potentiel membranaire devienne plus négative, moment où tous les canaux potassiques s'ouvriront afin de compléter la repolarisation terminale de la cellule (phase 3).

1.5 Le courant calcique

1.5.1 Le canal calcique cardiaque de type L

Le canal calcique de type L est un canal ionique dont l'ouverture est dépendante du voltage [87]. Cette propriété se traduit par une activation et une inactivation du canal à des valeurs précises de voltage membranaire. Suivant son ouverture, des ions calcium pourront

entrer à l'intérieur de la cellule [84, 88, 89]. Le canal calcique de type L est un tétramère qui est localisé à la membrane sarcolemmale des cardiomyocytes [90]. Chacune de ces sous-unités (Figure 1-10) est constituée des domaines alpha 1, alpha 2, bêta et gamma. Le domaine alpha 1 est constitué de 24 domaines transmembranaires (boucles S1-S6). Ce sont les boucles S5 de chacune des sous-unités alpha 1 qui sont responsables de s'assembler pour former le pore [87, 90, 91]. Le pore est constitué d'un filtre de sélectivité, élément influençant la perméabilité aux ions. Le filtre de sélectivité du canal calcique de type L contient la séquence GYGD. La présence de cette séquence influence le passage des ions et est plus favorable aux passages des ions bariem comparativement aux ions calcium. Finalement, le domaine bêta est, quant à lui, impliqué dans la modulation de la cinétique du canal (mécanisme "ball and chain" expliqué plus loin).

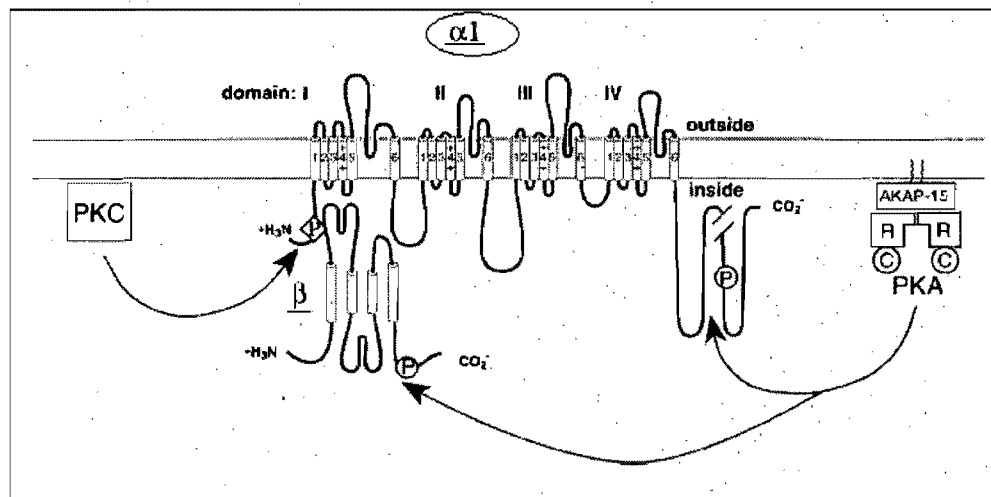


Figure 1-11: Sous-unité du canal calcique cardiaque de type L

Le canal calcique cardiaque de type L est un tétramère formé de quatre sous-unités. Chacune de ces sous-unités est constituée d'un domaine alpha 1 qui possèdent 24 domaines transmembranaires (S1-S6) et qui est responsable de constituer le pore du canal. Ce

domaine est associé à un domaine bêta intracellulaire qui est responsable de moduler les cinétiques d'inactivation du canal. Adapté de [87]

1.5.2 Caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type L

La famille des canaux ioniques dépendants du voltage ne comprend pas uniquement le canal calcique de type L. Une multitude de canaux possédant des caractéristiques similaires sont regroupés sous le terme de canaux de type Shaker. Cette famille a été la première à être étudiée en profondeur afin de mieux comprendre certaines propriétés biophysiques relatives au fonctionnement des canaux ioniques. La caractérisation subséquente d'autres canaux ioniques a permis d'observer qu'ils possédaient des caractéristiques et des mécanismes d'action similaires. En effet, tous les canaux de type shaker sont constitués d'une répétition d'une seule sous-unité (tétramère ou pentamère). La composition de ces sous-unités a de grandes analogies avec celle du canal calcique de type L.

De grandes similitudes sont présentes entre les mécanismes d'activation et d'inactivation entre les membres de la famille shaker. Le plus connu de ces mécanismes est l'inactivation de type "ball and chain". Cette inactivation dite rapide, typique des canaux shaker [92], se caractérise par la fermeture du canal par la sous-unité bêta intracellulaire qui bloque le passage des ions dans le canal [87]. L'inactivation en C-terminale, le deuxième mécanisme d'inactivation typique des canaux shaker, est un processus d'inactivation beaucoup plus lent que le premier. Cette fois-ci, le passage des ions est bloqué par la constriction du pore sur lui-même.

Bien que les cinétiques d'inactivation ont de grandes similitudes entre les canaux de la famille Shaker, des particularités concernant le mécanisme déclencheur de l'inactivation, sont propres au canal calcique de type L [93, 94]. L'inactivation se caractérise par un état où le canal n'est pas favorisé dans son état ouvert. Comparativement aux autres canaux ioniques de type shaker inactivés par la modification du potentiel membranaire, le canal calcique de type L est inactivé en réponse à la quantité d'ions calcium entrant dans la cellule. Les ions calcium se lient à la portion C-terminale de la calmoduline, ce qui inactive le canal.

1.5.3 Les courants calciques cardiaques

Il existe deux types de courants calciques dans le myocarde, le courant calcique de type L et le courant calcique de type T [87, 90, 95]. Le courant calcique de type L est un courant entrant dont l'influence dans le myocarde est prédominante en condition physiologique. Ce courant est impliqué dans des processus de haute importance tels que la phase plateau du potentiel d'action et l'initiation du couplage excitation-contraction cellulaire. Le courant calcique de type L peut aussi être bloqué par des molécules de type dihydropyridines (DHP), le vérapamil et le diltiazem. [90] Le courant calcique de type T, quant à lui, s'active à des valeurs de potentiels membranaires plus négatives que le courant de type L. Ce courant est insensible aux DHP et sa contribution est plus importante en conditions pathologiques tels que lors de la présence d'hypertrophie cardiaque [90].

1.5.4 Courant calcique cardiaque, activité électrique et contraction du myocarde

Le canal calcique de type L s'ouvre lors de la phase plateau du potentiel d'action [96, 97]. L'entrée de calcium qu'il génère permet d'amener la cellule à des valeurs de potentiel où la repolarisation peut s'initier. Cette entrée de calcium est aussi responsable d'initier la contraction cellulaire [89, 98-100]. En effet, le canal calcique de type L est présent à la membrane sarcolemmale et forme un dyade avec le récepteur à la ryanodine. L'activation du récepteur à la ryanodine et l'entrée de calcium par ce canal à l'intérieur de la cellule exerce un effet de rétroaction négatif sur le canal calcique de type L. Le canal est inactivé par cette rétroaction ce qui freine l'entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire.

Le mécanisme de contraction cellulaire est grandement régulé par le récepteur à la ryanodine [101]. Ce récepteur, une fois activé, permet la relâche du calcium contenu à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique [90, 102]. Cette brusque augmentation du calcium intracellulaire permet au calcium de se lier au myofilament protéique de la troponine C et d'activer la machinerie contractile. L'amplitude de cette contraction est directement proportionnelle à la densité du courant calcique de type L entrant dans la cellule [103]. La fin de la contraction s'initie lorsque les concentrations de calcium intracellulaire diminuent. Cette sortie de calcium s'effectue par transport actif de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, de l'échangeur sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, de la Ca^{2+} -ATPase sarcolemmale et

du transport de Ca^{2+} mitochondrial. La diminution du calcium permet la dissociation d'avec la troponine C (Figure 1-11) [89, 103].

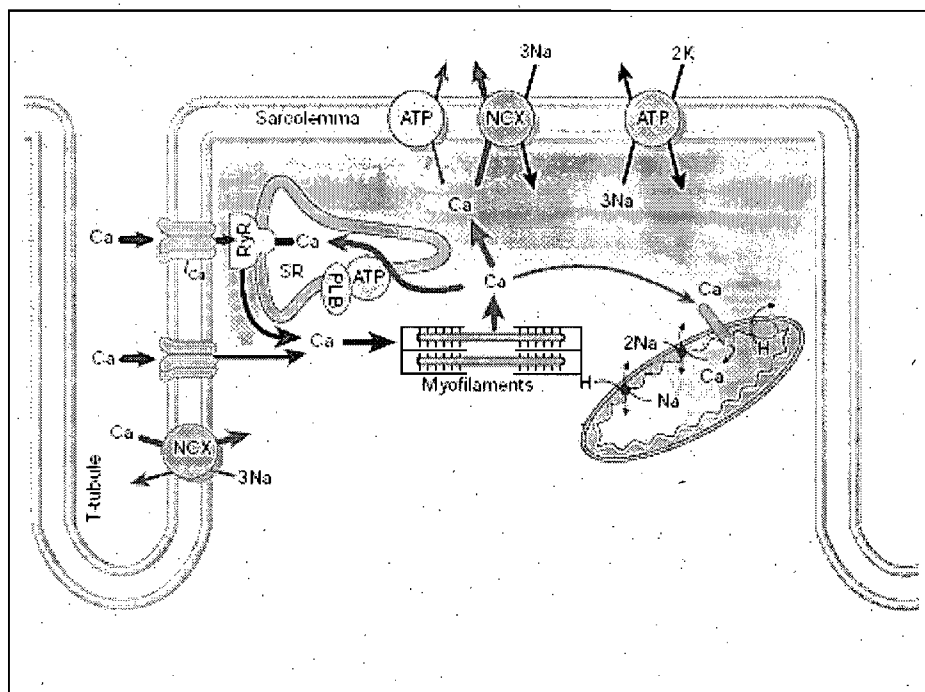


Figure 1-12: Entrée du calcium à travers le canal calcique de type L et initiation du couplage excitation-contraction

L'entrée du calcium à travers le canal favorise l'activation du récepteur à la ryanodine, ce dernier étant situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Son activation amène la relâche du calcium contenu à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique et la liaison à la troponine ce qui enclenche la contraction cellulaire. Afin de mettre fin à la contraction, la concentration de calcium intracellulaire diminue par le transport actif effectué par divers pompes et mécanismes de transport ionique. Le calcium se dissocie de la troponine et retourne dans le réticulum sarcoplasmique où il restera jusqu'à la prochaine contraction cellulaire. Adapté de [102]

1.6 But du projet

Il existe des différences dans la prépondérance de certaines maladies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes, tels que l'infarctus du myocarde et les arythmies [9, 35, 79, 104-113]. Au niveau électrophysiologique la durée de l'intervalle QTc, indice de la repolarisation cardiaque est plus longue chez la femme que chez l'homme [78, 81, 114-118]. La valeur de l'intervalle QTc est identique à l'enfance entre les garçons et les filles et raccourcit chez les garçons au moment de la puberté [78].

Plusieurs évidences suggèrent que les hormones sexuelles seraient impliquées dans la régulation de la repolarisation cardiaque [2, 119-122]. Des études antérieures ont été réalisées dans le laboratoire du Dre Fiset [123-125] afin d'établir le rôle des androgènes sur la repolarisation cardiaque. Un lien direct entre la présence d'hormones androgéniques et le raccourcissement de la durée de la repolarisation cardiaque, des potentiels d'actions ventriculaires et l'augmentation de la durée des courants potassiques correspondants a pu y être clairement démontré. Bien que ces études montrent un rôle majeur des androgènes dans la régulation de la repolarisation cardiaque, il n'est pas exclu que d'autres hormones sexuelles puissent contribuer à cette régulation. Dans cette optique, les oestrogènes ont été étudiés afin de déterminer leur implication dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque et sur différents phénomènes électrophysiologiques caractérisant l'activité électrique du cœur.

Un modèle de souris transgénique n'exprimant pas l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur aux oestrogènes (ERK α et ERK β) ayant été initialement mis au point par le groupe de Korach [73, 74] nous a été fourni afin de réaliser notre étude. Ce modèle de souris nous offre la possibilité d'étudier directement l'impact de l'absence des oestrogènes sur la repolarisation cardiaque. Des études préliminaires sur les potentiels d'action et les courants potassiques ventriculaires, paramètres caractérisant la repolarisation cardiaque, ont été effectuées dans notre laboratoire sur la souris ERKO. Les résultats obtenus ne permettaient pas de conclure à une régulation de l'intervalle QTc, des potentiels d'action et des courants potassiques ventriculaires suivant l'absence de récepteurs fonctionnels aux oestrogènes. Suite à ces travaux, nous nous sommes intéressés à savoir si l'absence de récepteurs aux oestrogènes pourrait toutefois moduler d'autres paramètres caractéristiques de l'activité électrique cardiaque.

L'objectif de ce projet de maîtrise est donc d'identifier l'impact de l'absence du récepteur aux oestrogènes alpha ou bêta chez la souris sur les paramètres électrocardiographiques (QT, QTc, PR, HR) sur les courants calciques de type L ventriculaires. Pour ce faire, les paramètres de l'ECG ont été étudiés en conditions physiologiques (Dérivation I), en télémétrie (Dérivation II) et en mode Langendorff. Par la suite la densité des courants calciques de type L a été étudiée sur des cellules de myocytes ventriculaires fraîchement isolés.

2 Matériel et méthodes

2.1 Génotypage

2.1.1 Extraction d'ADN

Les échantillons proviennent de tissus d'oreilles des animaux ERKO α et ERKO β . Pour chaque tube, une quantité de 65 μ L du tampon de digestion (pH ajusté à 12) : 25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA dissodium) est incubé avec le tissu. Les tubes sont placés à 95° C pendant 1 heure et sont agités à quelques reprises afin d'éviter la formation de condensation et l'évaporation du liquide dans le couvercle. Suivant la réaction, les tubes sont légèrement centrifugés afin que tout le liquide se retrouve au fond. Les tubes sont conservés au congélateur à -20° C.

2.1.2 Génotypage ERKO α

L'ADN digéré des souris ERKO α est dégelé en vue de son utilisation. Deux séries de mélanges seront effectuées. Le premier mélange contient les concentrations finales suivantes : 10 mM de dNTP, 6,6 μ M d'amorce ERA WT-1 (5'-CGGTCTACGGCCAGTCGGGCACC-3') 6,6 μ M d'amorce ERA WT-2 (5'-GTAGAAGGCGGGAGGGCCGGTGTC-3'), 1x tampon, solution Q (Quiagen), H₂O et Taq (Fermentas) qui servira à faire apparaître la bande de type sauvage à 239 pb. Le deuxième mélange contient 10 mM de dNTP, 10 μ M de l'amorce Neo 3A, 10 μ M de l'amorce ERA WT-2 (5'-GTAGAAGGCGGGAGGGCCGGTGTC-3'), le tampon Q à 1X,

H₂O et la Taq (Fermentas #) qui servira à faire apparaître la bande transgénique à 800 pb. Les réactions s'effectueront dans deux thermocycleurs (PTC-100 TM, Programmable Thermal controller, MJ Research Inc.) car les conditions sont différentes entre les deux bandes. Pour la bande sauvage, les conditions de PCR sont : l'étape de l'ancrage des amorces à 94°C pour 5 minutes, l'étape de l'amplification constituée de 35 répétitions de la séquence : 94°C pour 1 minute, 60°C pour 1 minute et 72°C pour 1 minute 30 secondes et l'étape d'élongation à 72°C pour 10 minutes. Pour la bande transgénique les conditions de PCR sont : l'étape de l'ancrage des amorces à 94°C pour 5 minutes, l'étape de l'amplification constituée de 35 répétitions de la séquence : 94°C pour 1 minute, 58°C pour 1 minute et 72°C pour 1 min et l'étape d'élongation à 72°C pour 10 minutes.

2.1.3 Génotypage ERKOβ

L'ADN digéré des souris ERKOβ est dégelé en vue de son utilisation. Un mélange contenant l'ensemble des éléments nécessaires à la réaction sera réalisé soit : 10 mM de dNTP, tampon, 50 mM de Mg²⁺, 10 μM d'amorce sens mER #2 (5'-GGTTGTGGGTGAAGACAAGTG-3'), 10 μM des amorces anti-sens de type sauvage (5'-CATCCTTCACAGGACCAGACAC-3') et 10 μM de l'amorce transgénique (5'-GCAGCCTCTGTTCCACATACAC-3'), H₂O et la Taq (Fermentas #). La bande de type sauvage apparaîtra à 600 pb et la bande transgénique apparaîtra à 650 pb. Les réactions s'effectueront dans un seul thermocycleur (PTC-100 TM, Programmable Thermal controller, MJ Research Inc.). Les conditions d'amplification dans le thermocycleur : l'étape de l'ancrage des amorces à 94°C pour 5 minutes, l'étape de l'amplification constituée de 32 répétitions de la séquence : 94°C pour 45 sec, 60°C pour 1 minute et 72°C

pour 1 minute et 30 secondes et l'étape d'élongation à 72°C pour 10 minutes. Ces conditions permettent l'apparition des deux bandes, la bande sauvage à environ 400 pb et la bande mutée à environ 450 pb.

2.2 Dosage d'œstrogène de type ELISA

Le dosage du 17 β -oestradiol a été effectué avec le kit Estradiol EIA Kit (Cayman chemical Catalog No. 582251). Les échantillons dosés provenaient de sérums sanguins de souris. Une phase préliminaire d'extraction a été effectuée selon les instructions du fabricant.

2.3 Enregistrement d'ECG sous anesthésie

Les animaux sont anesthésiés par inhalation à l'isoflurane et placés sur un coussin chauffant pour maintenir leur température corporelle à 37° C. Des électrodes de platine ont été positionnées de manière sous-cutanée en position dérivation I. L'acquisition des données a été effectuée avec le système Biopac System MP100 à une fréquence de 2 kHz. Le signal a été amplifié, filtré à 100 Hz et à 60 Kz. Les enregistrements ont été analysés à l'aide du logiciel CG Auto data analyst (AcqKnowledge 3.7). Les intervalles QT ont été corrigés en fonction du rythme cardiaque en utilisant la formule appropriée chez la souris :

$$QT_c = QT / (RR/100)^2.$$

2.4 Enregistrement d'ECG par télémétrie

Un transmetteur de radiofréquence OpenHeart® (Data Science International, Arden Hills, MN) a été implanté pour monitorer et enregistrer l'ECG sur des animaux conscients et non restreints dans leurs mouvements. Les animaux ont été anesthésiés par inhalation à l'isoflurane et gardés sur un coussin chauffant. Les transmetteurs ont été implantés dans la cavité péritonéale. L'ECG a été enregistré en continu pour une période de 24 heures et conservé sur un support informatique pour analyse ultérieure. L'acquisition des données a été effectuée avec le système Biopac System MP100 à une fréquence de 2 kHz. Le signal a été amplifié, filtré à 100 Hz et à 60 Kz. Les enregistrements ont été analysés à l'aide du logiciel CG Auto data analyst (AcqKnowledge 3.7)

2.5 Enregistrement d'ECG par Langendorff

Les animaux ont été anesthésiés par inhalation à l'isoflurane. Le cœur a été explanté de l'animal et a été canulé. Il a été perfusé de manière rétrograde par l'aorte avec une solution de Krebs [126] (pH ajusté à 7.4 avec NaOH) (en mM) : 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 0.5 EDTA, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 11 glucose. Le cœur a été stabilisé pour une période de 15 minutes. Par la suite, les paramètres de l'ECG ont été enregistrés pendant une période de 10 minutes. L'acquisition des données a été effectuée avec le système Biopac System MP100 à une fréquence de 2 kHz. Le signal a été amplifié, filtré à 100 Hz et à 60 Kz. Les enregistrements ont été analysés à l'aide du logiciel ECG Auto data analyst (AcqKnowledge 3.7)

2.6 Isolation cellulaire de myocytes ventriculaires de souris

Les souris ont été héparinées par inhalation d'isoflurane et sacrifiées par dislocation cervicale. Les myocytes ont été isolés du ventricule droit en utilisant un protocole préalablement décrit [125]. Brièvement, les cœurs étaient rapidement explantés de l'animal et canulé pour une perfusion rétrograde par l'aorte d'une durée de 5 minutes avec une solution de Tyrode tamponnée avec de l'HEPES contenant (en mM) : 130 NaCl, 5,4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0,3 Na₂PO₄, 10 HEPES, 5,5 glucose (pH ajusté avec NaOH). Par la suite les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes avec une solution de Tyrode sans calcium suivi par une digestion de 21 minutes avec une solution sans calcium contenant 73,7 U/ml de collagénase de type 2 (Worthington Co. Ltg, Freehold, NJ, USA), 0,1% d'albumine bovine sérique (BSA), 20 mM de taurine et 30 μM de CaCl₂. Le tout a été suivi d'une perfusion d'une durée de 3 minutes avec une solution de Kraft-Bruhe (KB) contenant (en mM) : 100 K-glutamate, 10 K-aspartate, 25 KCl, 10 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 20 taurine, 5 creatine base, 0,5 EGTA, 5 HEPES, 20 glucose et 0,1% BSA (pH ajusté à 7,2 avec KOH 1 N). Le cœur a ensuite été enlevé de la canule et le feuillet unique du ventricule droit a été trituré doucement pour isoler les myocytes ventriculaires.

2.7 Enregistrements électrophysiologiques cellulaires par la technique de patch clamp (voltage imposé)

Tous les enregistrements de courants ont été effectués à l'aide d'un amplificateur pour le voltage imposé (AXOPATCH 200B, Axon Instruments, Foster City, USA). Les pipettes étaient remplies d'une solution incluant (en mM) : 80 acide aspartique, 40 CsCl, 70

CsOH, 10 EGTA, 10 HEPES, 2 MgCl₂, 4 Na₂ATP (pH 7,2 avec CsOH 1N). Les myocytes étaient constamment perfusés avec une solution oxygénée spécifique à l'enregistrement des canaux calciques de type L (en mM) : 140 NaCl, 10 CsCl, 5 HEPES, 0,5 MgCl₂, 5,5 glucose, 2 CaCl₂ (pH 7,4 ajusté avec CsOH 1N). Seules les pipettes ayant une résistance en série se situant entre 2 et 5 MΩ ont été utilisées pour réaliser les enregistrements. La résistance des pipettes a été contrebalancée en appliquant une compensation de l'ordre de 80-90%. Les courants enregistrés étaient filtrés à 1 kHz avec un filtre analogue 4-pole Bessel, digitalisés à 4 kHz et conservés électroniquement à l'aide du logiciel PCLAMP 8.0 (Axon Instruments)

La magnitude des courants était normalisée en fonction de la capacitance cellulaire. La capacitance était initiée par tranche de 10 mV à partir d'un potentiel de repos de -80 mV, était filtrée à 10 kHz et digitalisée à 25 kHz. La capacitance cellulaire était déterminée à l'aide de l'intégralité de ces courants transitoires.

Les potentiels membranaires enregistrés étaient corrigés par -10 mV afin de compenser pour le potentiel de jonction créé par le liquide à la jonction du bain et de la pipette. La densité des courants calciques et la dépendance au voltage de l'activation ont été obtenues suivant l'application d'un pré-pulse inactivant de -45 mV d'une durée de 20 ms et d'une série de pulse (-50 mV à +60 mV) d'une durée de 250 ms pour lesquels la densité de courant traversant le canal était mesurée. La dépendance de l'inactivation au voltage a été obtenue suivant l'application d'un protocole constitué d'un pré-pulse inactivant d'une durée de 1000 ms aux potentiels suivants (-60 mV à +20 mV) suivi d'un pulse test à +10 mV d'une durée de 150 ms.

La densité des courants a été mesurée relativement à zéro. Les enregistrements ont été analysés et mis en graphique à l'aide des logiciels Origin et Clampfit (Axon Instruments, CA).

3 Résultats

3.1 Caractérisation du modèle

Le modèle animal que nous avons utilisé afin de réaliser notre étude est le modèle de souris ERKO α et ERKO β qui n'exprime respectivement pas l'isoforme alpha et bêta du récepteur aux oestrogènes. L'utilisation d'animaux transgéniques, comparativement à l'utilisation d'animaux de lignée non modifiée génétiquement, nécessite la mise en place de protocole précis permettant d'identifier avec exactitude le génotype des animaux issus de la reproduction. Les conditions de génotypage pré-établies permettant l'identification de la lignée ERKO β fonctionnaient bien dans notre laboratoire, cependant, le protocole permettant l'obtention des résultats de génotype pour la lignée ERKO α était peu concluant. Nous avons donc procédé à la conception de nouvelles amorces et à la mise en place de nouvelles conditions de PCR propres à cette lignée.

Par ailleurs, la caractérisation du modèle ERKO comportait une autre facette essentielle : le dosage des concentrations sériques circulantes d'oestrogènes. Ce modèle permettant l'étude de l'impact d'un blocage partiel et non complet de la stimulation oestrogénique il était important de mesurer l'ampleur de la compensation physiologique éventuelle afin de bien comprendre les observations effectuées sur le modèle. Les oestrogènes étant impliqués dans de nombreux processus physiologiques essentiels, il n'était pas exclu que les concentrations circulantes de cette hormone stéroïdienne soient sécrétées en concentrations significativement différentes chez les souris ERKO et ce, de

manière à compenser l'absence de fonctionnalité de l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur.

3.1.1 Géotypage

Le géotypage est une technique qui permet l'identification exacte du géotype d'un gène d'intérêt modifié chez un animal transgénique. Cette technique repose sur trois principes : la dénaturation des double brins d'ADN et des amorces, la renaturation de l'ADN avec les amorces complémentaires et spécifiques et la polymérisation de la région du gène amplifié. La région amplifiée est délimitée sélectivement par les amorces qui se lient de manière complémentaire à la séquence du gène. La migration sur gel des produits de PCR permet de déterminer avec précision et certitude si la modification du gène est présente ou non.

La mise en place de conditions de PCR est déterminée par plusieurs éléments distincts. Dans un premier temps, il est nécessaire de connaître la composition exacte du gène et de la séquence insérée dans le gène afin de générer des amorces qui se lieront à une portion précise du gène et son brin complémentaire de manière spécifique. Dans un deuxième temps, il est essentiel de construire des amorces qui répondent aux critères de base pour une reconnaissance efficace avec l'ADN : 1) les amorces doivent avoir une longueur de 18-22 paires de bases. Des amorces trop courtes n'assurent pas une bonne sélectivité dans la reconnaissance de la région à amplifier et des amorces trop longues rendent difficile la liaison des amorces à la séquence d'ADN à amplifier. Le deuxième critère est la similitude de température de fusion entre les amorces. La température de

fusion (T_m) représente la température à laquelle la moitié du complexe ADN / amorce sera dissocié et deviendra simple brin. Cette valeur est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = (\Delta H / \Delta S + R \ln(C))$$

où le H représente l'enthalpie (Kcal/mole) et le S représente l'entropie (Kcal/mole). La température de fusion devrait idéalement se situer entre 52°C et 58°C . Des températures supérieures indiquent une possibilité d'appariement secondaire. Le troisième critère à considérer lors de la conception des amorces est la température d'appariement (T_a), dont la valeur dépend directement de la température de fusion. Cette valeur est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$T_a = 0,3 \times T_m (\text{amorce}) + 0,7 T_m (\text{produit PCR}) - 14,9$$

Des températures d'appariement trop élevées indiquent que l'hybridation entre l'amorce et l'ADN est faible, tandis que des températures d'appariement trop basses indiquent un faible ratio du produit de PCR désiré. Le quatrième critère à considérer est le contenu de l'amorce dont la composition en nucléotides GC ne devrait pas dépasser 40-60% du contenu total. De plus, la séquence de l'amorce ne devrait pas contenir trop de répétitions de séquences et posséder une grande stabilité à son extrémité 3'. Finalement, les amorces choisies ne devraient pas être en mesure de former des structures secondaires afin d'assurer un appariement ADN/amorce optimal.

Les amorces, une fois liées, détermineront la portion du gène qui sera ensuite amplifiée par l'enzyme ADN polymérase. Deux séries d'amorces se lieront sur la région

d'intérêt et son brin complémentaire: les amorces sens ($5' \rightarrow 3'$) et les amorces anti-sens ($3' \rightarrow 5'$). La région d'intérêt sera amplifiée à répétition jusqu'à l'obtention de plusieurs fragments d'ADN correspondant à la région d'intérêt. Une fois l'amplification terminée, les produits de PCR obtenus migreront sur gel et le nombre de paires de bases correspondant à chacune des bandes permettra de déterminer si la mutation est présente ou non dans chaque échantillon.

En ce qui concerne les souris ERKO α et ERKO β , des différences dans la séquence des nucléotides existent entre les gènes de l'isoforme alpha et bêta du récepteur. Il est donc nécessaire d'établir des conditions de PCR propres à chacun des deux modèles. La connaissance de la séquence spécifique des gènes des récepteurs aux oestrogènes alpha et bêta nous a permis de pouvoir générer des paires d'amorces permettant l'amplification de la région d'intérêt portant ou non la mutation. Pour le PCR des souris ERKO α , les amorces utilisées et leur position d'ancrage sur le gène nous permettent d'obtenir une bande représentant le phénotype sauvage d'une longueur de 239 pb et une bande représentant le phénotype muté d'une longueur de 800-850 pb.

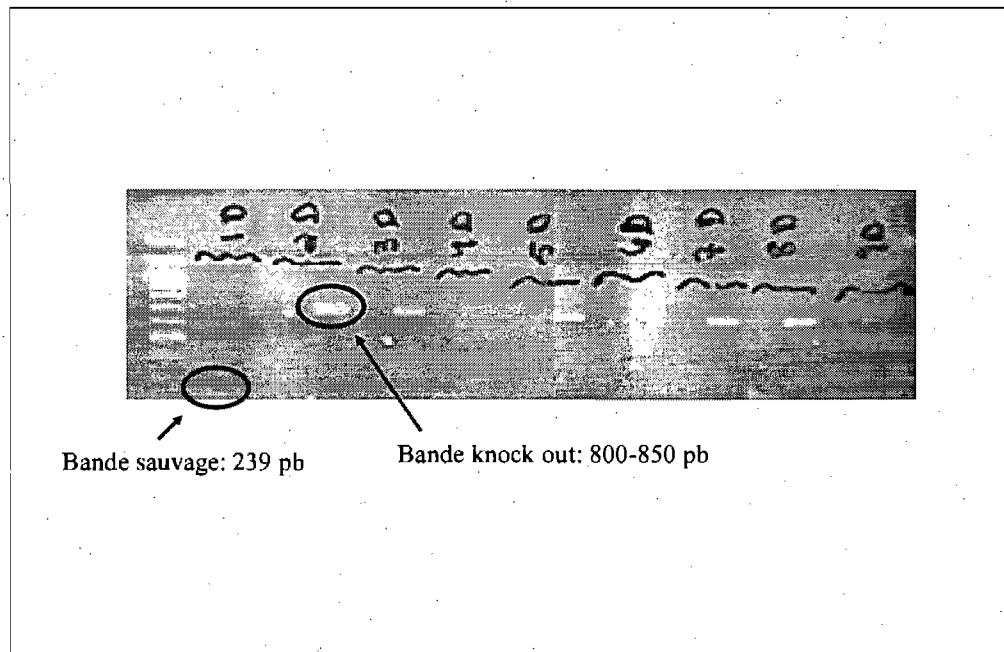


Figure 3-1 : Génotypage des souris ERK0 α

Cette image montre les résultats de génotypage typiquement obtenus pour les souris ERK0 α . Le premier résultat montre bien que seule la bande à 239 pb est présente ce qui signifie que la souris a le phénotype sauvage. Lorsque deux bandes à des hauteurs différentes apparaissent dans les deux puits la souris à un génotype hétérozygote. Finalement, lorsque seule la bande à une hauteur de 800-850 pb apparaît la souris possède le phénotype knock-out.

Pour le PCR des souris ERKO β , les amorces utilisées et leur position d'ancrage sur le gène nous permet d'obtenir une bande représentant le phénotype sauvage d'une longueur de 400 pb et une bande représentant le phénotype muté d'une longueur de 450 pb.

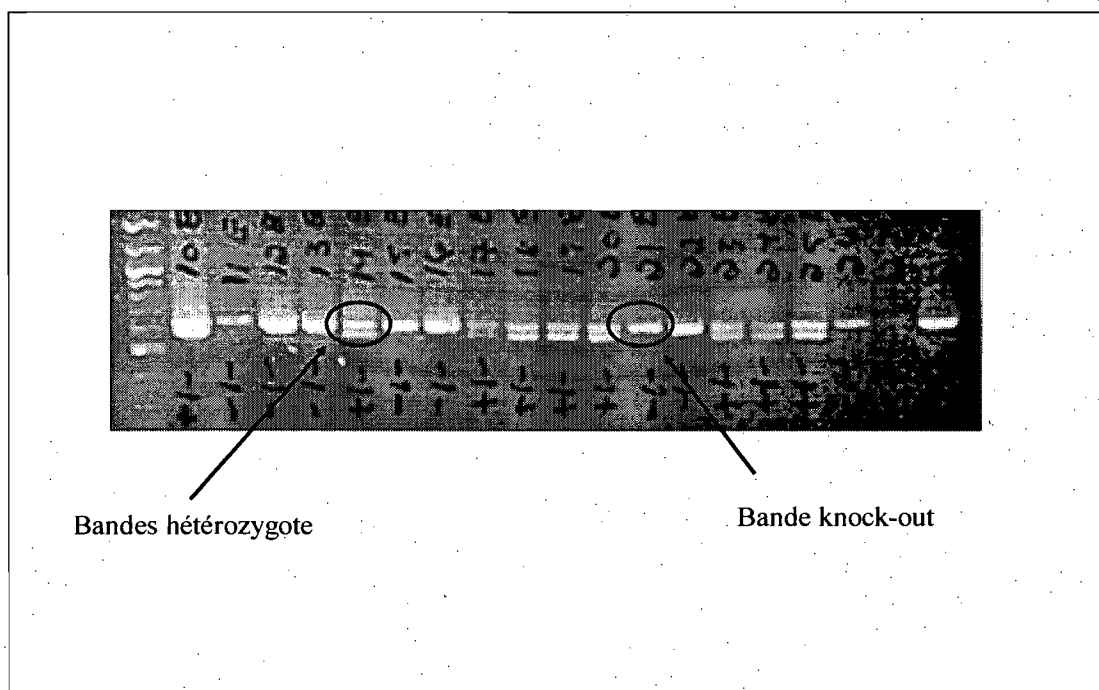


Figure 3-2 : Génotypage des souris ERKO β

Cette image montre les résultats de génotypage typiquement obtenus pour les souris ERKO β . Dans le premier puit, nous pouvons voir que deux bandes apparaissent. La première bande a une longueur de 400 pb et la deuxième bande a une longueur de 450 pb. La présence de ces deux bandes indique que la souris a un génotype hétérozygote. Dans le deuxième puit nous pouvons voir que seule la bande à la hauteur de 450 pb apparaît. Cette bande indique que l'animal possède le génotype knockout.

3.1.2 Dosage du 17 β -oestradiol

Il est connu que certaines lignées de souris possèdent naturellement des niveaux moins élevés de certaines hormones sexuelles. Des observations à cet effet ont d'ailleurs été recueillies dans le laboratoire et ont permis de constater que les souris mâles de la lignée C57BL/6 possédaient des niveaux d'androgènes significativement moins élevés que les souris d'autres lignées telles que les CD1 [123]. Nous avons donc voulu nous assurer que les niveaux d'oestrogènes chez la lignée de souris C57BL/6, lignée de souris sur laquelle a été généré le modèle ERKO, étaient similaires à ceux observés chez d'autres lignées.

Dans cette optique, nous avons procédé au dosage comparatif du 17 β -oestradiol, la forme prédominante de l'oestrogène dans l'organisme, chez différentes lignées de souris utilisées dans le laboratoire (CD1, SJL, C3H, FVB). Les concentrations que nous avons obtenues et qui sont présentées à la figure 3-3, nous ont permis de constater que les niveaux de 17 β -oestradiol n'étaient pas significativement différents entre les femelles de la lignée C57BL/6 (537 ± 190 pM) et les femelles des autres lignées étudiées soit les femelles CD1 (389 ± 81 pM), SJL (831 ± 274 pM), C3H (763 ± 346 pM) et FVB (470 ± 136 pM). Les concentrations de 17 β -oestradiol sont aussi similaires entre les mâles C57BL/6 (166 ± 131 pM) et les mâles CD1 (243 ± 50 pM). Finalement, les concentrations de 17 β -estradiol ont aussi été mesurées chez les souris ERKO α femelles (810 ± 998 pM) et mâles (127 ± 33 pM) et chez les souris ERKO β femelles (137 ± 194 pM) et mâles (47 ± 19 pM). Bien que la valeur obtenue chez le groupe femelle ERKO α soit plus élevée, en raison de son manque de puissance statistique (n=3) et de son immense écart-type, il n'est pas possible de conclure à

une différence statistiquement significative chez ce groupe. Cependant, ce résultat nous porte à croire que l'absence de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes, impliquée de manière majoritaire dans les processus de reproduction tente d'être compensée par une augmentation des concentrations sériques de 17 β -oestradiol. Voir figure 3-3

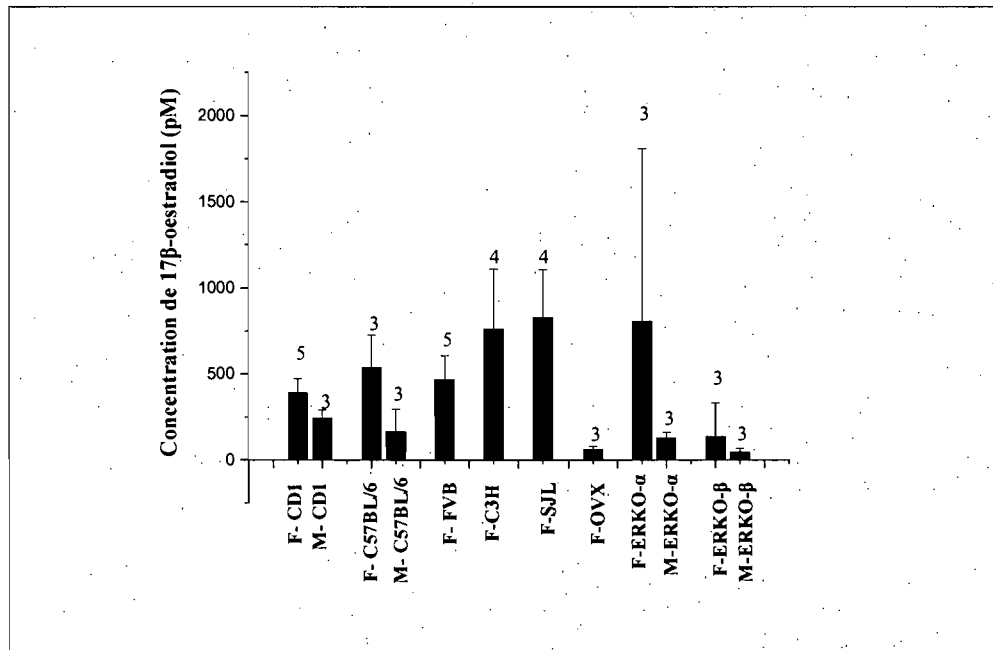


Figure 3-3: Dosage du 17 β -oestradiol dans des échantillons sériques de souris

Cette figure présente les résultats obtenus lors du dosage du 17 β -oestradiol. Les concentrations sériques moyennes mesurées (pM) sont similaires entre les femelles de l'ensemble des lignées étudiées. Les concentrations sériques sont aussi similaires entre les mâles C57BL/6 et les mâles CD1. Finalement les concentrations de 17 β -oestradiol mesurée chez les souris ERKO ne sont pas significativement différente à celle mesurée dans le groupe C57BL/6 contrôle.

3.2 Paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo

Il est clairement établi qu'il existe des différences dans la valeur de l'intervalle QTc entre les hommes et les femmes. Cette différence apparaît au moment de la puberté. Plusieurs évidences suggèrent que les hormones sexuelles seraient impliquées dans cette modulation. De récents travaux effectués dans notre laboratoire démontrent clairement le rôle des androgènes dans la diminution de l'intervalle QTc et la modulation correspondante des potentiels d'action et des courants potassiques [123, 124]. Quelle est la contribution des oestrogènes à ce phénomène? Le modèle ERKO nous permettra d'étudier spécifiquement le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque. La caractérisation initiale du modèle étant terminée, la première étape de ce projet consistait à établir si l'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur modifiait les paramètres électrophysiologiques cardiaques in vivo et ex vivo chez la souris femelle et mâle.

3.2.1 Enregistrement de l'ECG sous anesthésie

Dans un premier temps, l'impact d'une stimulation oestrogénique partielle sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde, tels que l'intervalle QTc a été mesuré par ECG de surface chez la souris ERKO α femelles et mâles et la souris ERKO β femelles et mâles. Il existe plusieurs modes distincts afin d'enregistrer les paramètres électrophysiologiques chez l'animal entier, chacun d'entre eux ayant son lot d'avantages et d'inconvénients. L'ECG de surface est une technique qui permet de mesurer rapidement les

paramètres électrocardiographiques chez un animal anesthésié. Il offre des avantages tels que la rapidité et la simplicité d'exécution, et n'implique pas le sacrifice des animaux utilisés pour réaliser la procédure. Son inconvénient majeur est qu'il nécessite le recours à des agents anesthésiants, tel que l'isoflurane et que ces agents sont connus pour influencer les paramètres de l'ECG. Cette influence n'est normalement pas assez importante pour contrebalancer des différences électrophysiologiques propres à l'animal. De plus, l'animal étant endormi, son rythme cardiaque est grandement diminué. Le rythme cardiaque (HR) de la souris étant, de base, très rapide (650 battements/min) il n'est pas rare d'observer une diminution de près de 50% (300-350 battements/min) du rythme ce qui influence la valeur des paramètres calculés en fonction de ce rythme. L'ensemble de ces éléments est à considérer lors de l'analyse et de l'interprétation des résultats.

3.2.1.1 Groupe femelles

Comme il est possible de le constater sur la Figure 3-4 et la Figure 3-5, l'ECG de surface a été enregistré chez le groupe de souris femelles ERKO α et chez le groupe de souris femelles ERKO β . Les valeurs ont été compilées et comparées à celles obtenues pour leur groupe de souris contrôles (CTL) respectifs. Les paramètres ont été mesurés chez les souris au cycle oestrus tant pour les souris CTL que pour les souris transgéniques. Contrairement à ce qui pourrait être attendu, il semblerait que l'absence d'une stimulation oestrogénique complète n'ait pas d'impact concrètement sur les paramètres de l'électrocardiogramme. En effet, chez les souris ERKO α les valeurs de l'intervalle PR obtenues sont de $41,1 \pm 1,9$ ms pour le groupe contrôle et de $41,1 \pm 0,9$ ms pour le groupe

ERKO α . Les valeurs obtenues pour l'intervalle QT sont aussi similaires entre les deux groupes et respectivement pour le groupe contrôle de $44,7 \pm 0,9$ ms et de $44,9 \pm 1,9$ ms pour le groupe ERKO α . Finalement, les valeurs obtenues pour l'intervalle QT corrigé en fonction du rythme cardiaque étaient de $37,9 \pm 1,7$ ms pour le groupe contrôle et de $38 \pm 0,7$ ms pour le groupe ERKO α . L'ensemble de ces valeurs n'est donc pas significativement différent entre le groupe de femelles ERKO α et le groupe contrôle. L'absence de la stimulation oestrogénique effectuée par l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes ne semble pas interférer avec les paramètres électrophysiologiques du myocarde.

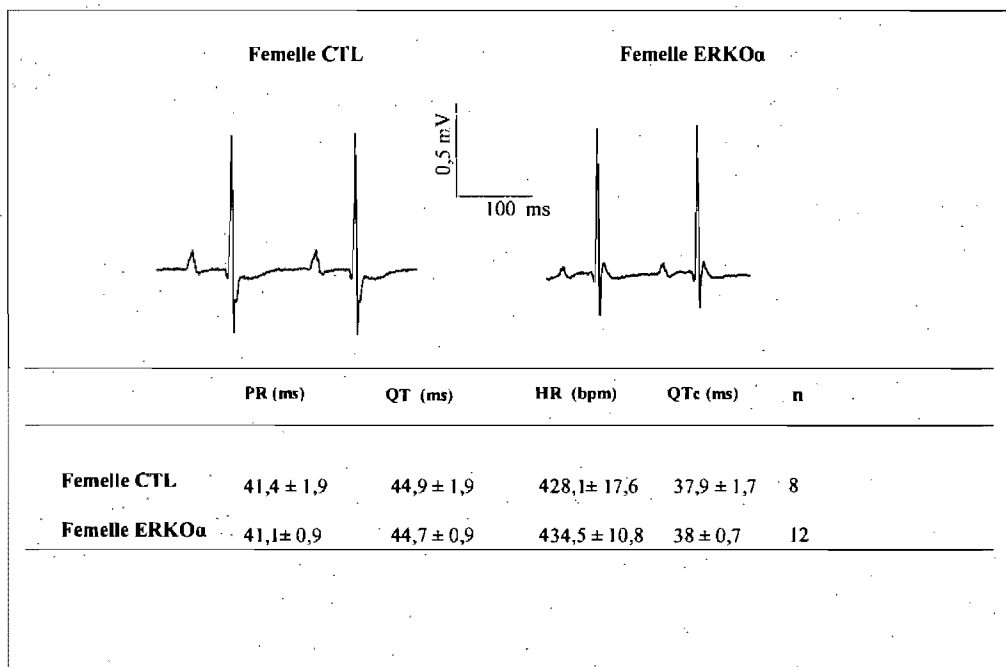


Figure 3-4 : Impact de l'absence de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde chez le groupe de souris femelles

Exemples de tracés d'ECG de surface obtenus chez des souris femelles contrôles et ERKOα âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêts mesurées soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc (* p < 0.05).

Les valeurs obtenues pour ces mêmes paramètres d'intérêt chez le groupe de femelles ERKO β suivent la même tendance à savoir qu'aucun paramètre n'est significativement différent entre les deux groupes. En effet, les valeurs obtenues sont pour l'intervalle PR de $48,7 \pm 3,2$ ms pour le groupe contrôle et de $47,6 \pm 1,7$ ms pour le groupe ERKO β . Pour le paramètre de l'intervalle QT, les valeurs obtenues sont respectivement pour le groupe de souris contrôles et le groupe de souris ERKO β de $42,1 \pm 1,7$ ms et de $41,4 \pm 1,3$ ms. Finalement les valeurs obtenues pour l'intervalle QTc sont de $42,6 \pm 3,4$ ms pour le groupe de souris contrôles et de $41,8 \pm 13,0$ pour le groupe de souris ERKO β . Les valeurs obtenues nous permettent de constater que l'absence d'une stimulation oestrogénique partielle par l'isoforme bêta du récepteur n'interfère pas avec les paramètres électrophysiologiques de l'ECG chez le groupe de souris femelles.

Cette absence de différences sur les paramètres de l'ECG tant chez la souris femelles ERKO α , qu'ERKO β pourrait s'expliquer par une sur-stimulation de l'isoforme du récepteur aux oestrogènes toujours exprimée et fonctionnelle chez l'un ou l'autre des modèles. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré les paramètres de l'ECG chez une souris pour laquelle il n'y a plus de stimulation oestrogénique (souris ovariectomisée). Comme vous pouvez le constater sur la figure 3-6, la valeur obtenue pour les différents paramètres d'intérêt de l'ECG est similaire entre le groupe de souris ovariectomisée et le groupe de souris contrôles. L'absence de récepteurs fonctionnels aux oestrogènes ne semble pas exercer une influence directe sur les paramètres de l'ECG de surface.

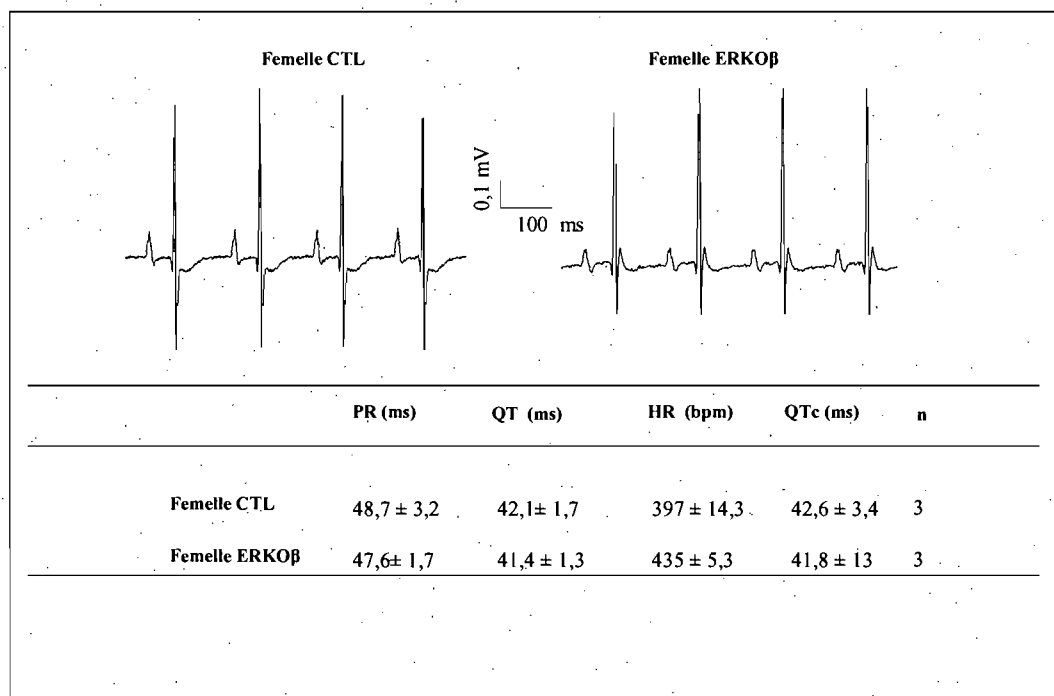


Figure 3-5 : Impact de l'absence de l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris femelles

Exemples de tracés d'ECG de surface obtenus chez des souris femelles contrôles et ERKOβ âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêts mesurées soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc (* p< 0.05).

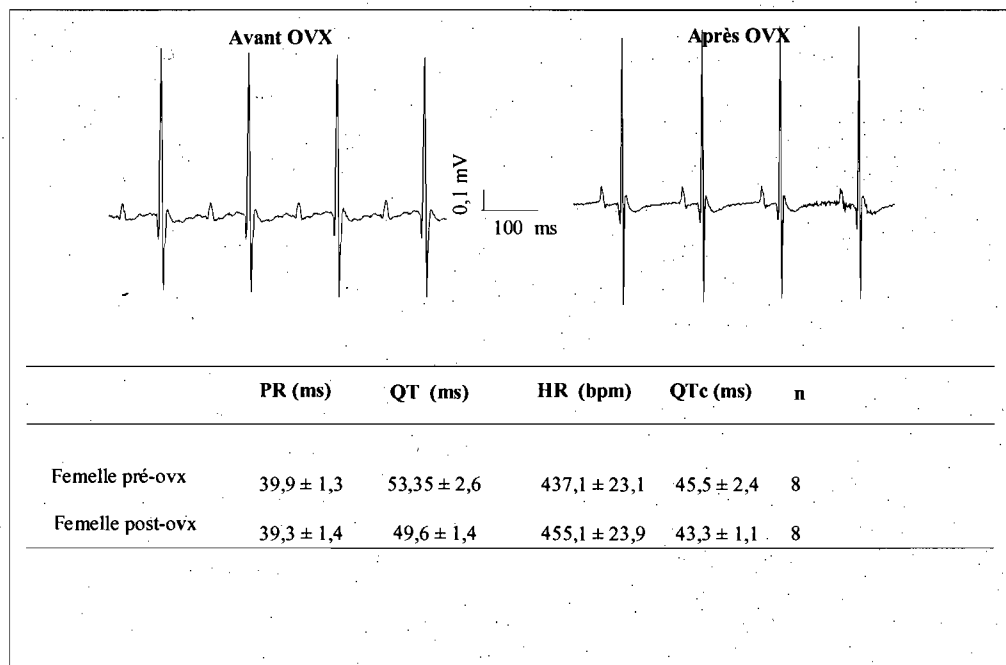


Figure 3-6 : Impact de l'absence totale de stimulation oestrogénique sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris femelles

Exemples de tracés d'ECG de surface obtenus chez des souris femelles avant (avant OVX) et après (après OVX) l'ovariectomie. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêts mesurées soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc (* p< 0.05).

3.2.1.2 Groupe de souris mâles

La diminution de l'intervalle QT à la puberté chez le garçon est associée en premier lieu à l'augmentation des niveaux d'androgènes circulants. Cependant, est-ce qu'une variation du ratio androgène/oestrogène pourrait aussi affecter directement cette modulation? C'est ce que nous avons voulu étudier chez le groupe mâle ERKO α et ERKO β pour lesquels la faible concentration d'oestrogène circulant élimine la possibilité d'une stimulation compensatoire.

Dans un premier temps, les différents paramètres de l'ECG de surface ont été mesurés chez le groupe mâle ERKO α . Comme il est possible de le constater sur la figure 3-6, la valeur obtenue pour les différents paramètres d'intérêt de l'ECG mesurés ne sont pas significativement différents entre le groupe mâle ERKO α et son groupe contrôle. En effet, pour l'intervalle PR les valeurs obtenues sont de $39,9 \pm 1,3$ ms pour le groupe de souris contrôles et de $39,3 \pm 1,4$ ms pour le groupe de souris ERKO α . Pour l'intervalle QT les valeurs obtenues sont de $45,5 \pm 0,7$ ms pour le groupe contrôle et de $47,0 \pm 0,7$ ms pour le groupe ERKO α . Finalement, les valeurs recueillies pour l'intervalle QTc sont de $38,9 \pm 0,5$ ms pour le groupe de souris contrôle et de $38,7 \pm 0,6$ ms pour le groupe de souris ERKO α . À la lumière de ces résultats, il ne semble pas que l'absence de la stimulation oestrogénique effectuée par l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes influence directement les paramètres de l'ECG.

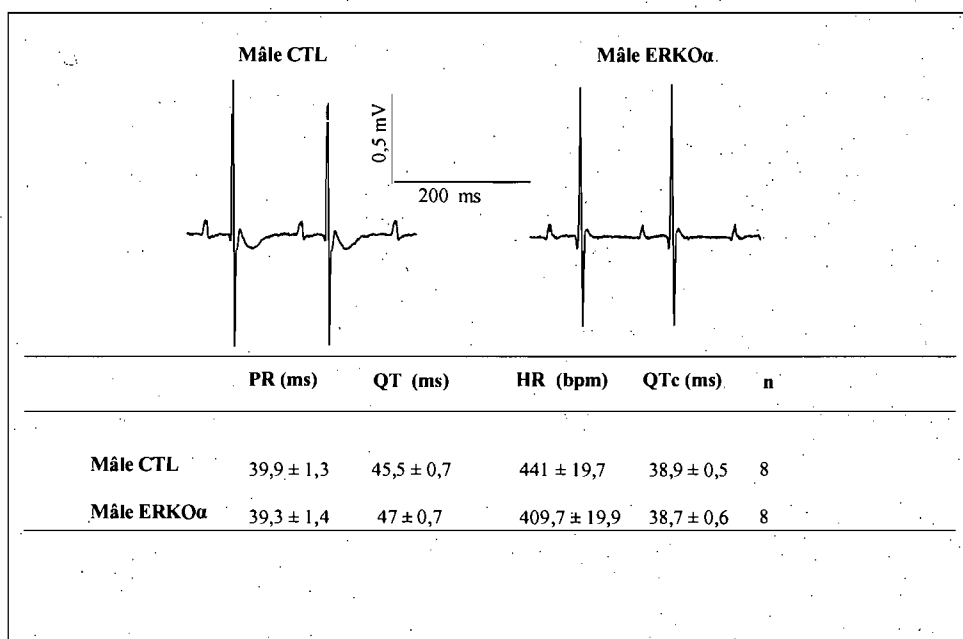


Figure 3-7: Impact de l'absence de l'isoforme alpha du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris mâles

Exemples de tracés d'ECG de surface obtenus chez des souris mâles contrôles et ERKOα âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêt mesurés soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc. (* p < 0.05)

Les mêmes paramètres ont été étudiés chez le groupe mâle ERK β . Les valeurs obtenues pour l'intervalle PR sont de $42,8 \pm 2,6$ ms pour le groupe contrôle et de $39,0 \pm 1,7$ ms pour le groupe ERK β . Les valeurs obtenues pour l'intervalle QT sont de $42,1 \pm 1,7$ ms pour le groupe contrôle et de $41,4 \pm 1,3$ ms pour le groupe ERK β . Finalement, les valeurs obtenues pour l'intervalle QTc sont de $45,2 \pm 2,1$ ms pour le groupe de souris contrôle et de $41,2 \pm 4,6$ ms pour le groupe de souris ERK β . L'absence de stimulation par l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes ne semble pas influencer les paramètres de l'ECG chez la souris mâles.

Globalement, l'absence de l'une ou l'autre des isoformes du récepteur aux oestrogènes n'entraîne pas de modifications dans les paramètres de l'ECG tant chez les souris femelles que chez les souris mâles.

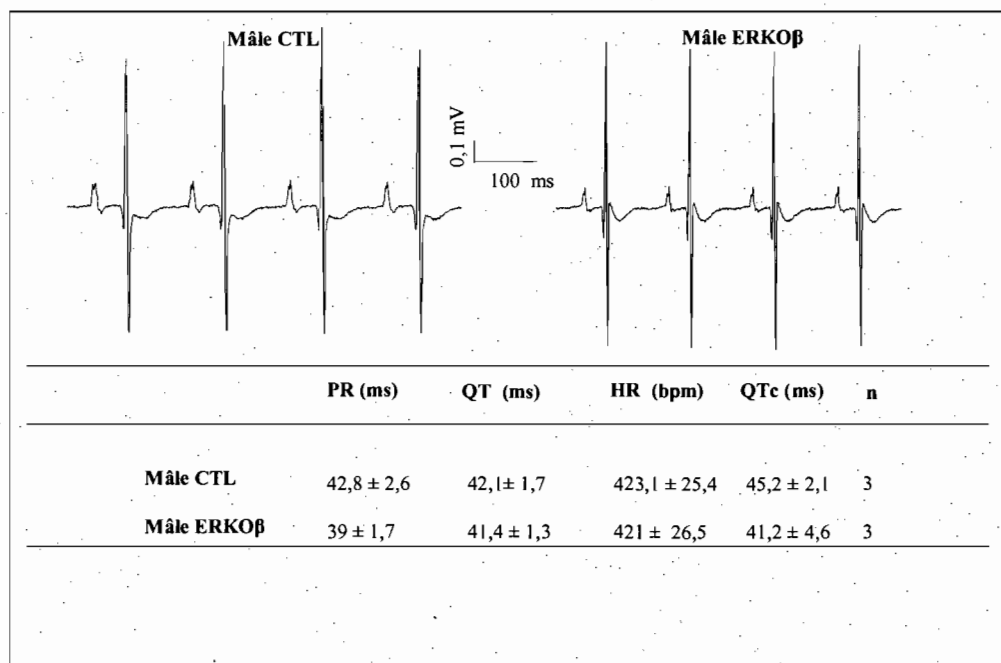


Figure 3-8: Impact de l'absence de l'isoforme bêta du récepteur aux oestrogènes sur les paramètres électrophysiologiques du myocarde dans le groupe de souris mâles

Exemples de tracés d'ECG de surface obtenus chez des souris mâles contrôles et ERKOβ âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêt mesurés soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc (* $p < 0.05$).

3.2.2 Enregistrement d'ECG par télémétrie

La télémétrie est un autre mode d'enregistrement des paramètres de l'électrocardiogramme. Comparativement au mode ECG de surface vu précédemment, la télémétrie se déroule chez un animal qui est conscient et libre de ces mouvements. Cette technique présente donc l'avantage d'éliminer la présence d'agent anesthésiant qui, comme mentionné précédemment, peuvent interférer avec les paramètres d'intérêt mesurés. L'autre avantage de la télémétrie est qu'elle permet des enregistrements de longue durée. Il devient donc possible d'être témoin d'événements sporadiques pathologiques affectant l'électrocardiogramme. Outre ces avantages, la télémétrie est une technique plus coûteuse à mettre en place. En effet, elle nécessite le recours à des capteurs spécialement conçus pour loger à l'intérieur de la cage thoracique de l'animal. Une chirurgie d'implantation est requise avant de pouvoir obtenir des résultats. De plus, les implants utilisés causent parfois de l'inconfort et parfois même des dommages cutanés à l'animal. La plupart des animaux doivent être sacrifiés au terme des expérimentations.

L'utilisation de la technique de la télémétrie présente l'avantage d'étudier avec une approche plus physiologique les paramètres de l'électrocardiogramme. Nous avons donc procédé à l'étude de ces paramètres dans nos groupes de souris ERKO β femelles et mâles. Les valeurs obtenues dans notre groupe femelle et qui sont présentés à la figure 3.8 nous montrent que même en condition plus physiologique, l'absence d'une stimulation oestrogénique complète n'entraîne pas de modifications sur les paramètres de l'électrocardiogramme. Les valeurs que nous avons obtenues sont pour l'onde P de $10,5 \pm$

0,5 ms pour le groupe de souris contrôles et de $11,5 \pm 0,9$ ms pour le groupe de femelles ERKO β . Pour l'intervalle PR les valeurs obtenues sont de $33,8 \pm 0,2$ ms pour le groupe contrôle et de $32,6 \pm 0,9$ ms pour le groupe ERKO β . Les valeurs du segment PR sont de $23,3 \pm 0,5$ ms pour le groupe de souris contrôle et de $21,1 \pm 1,1$ ms pour le groupe de souris ERKO β . Les valeurs obtenues pour l'intervalle QT sont de $42,1 \pm 1,7$ ms pour le groupe contrôle et de $41,4 \pm 1,3$ ms pour le groupe ERKO β . Finalement les valeurs obtenues pour l'intervalle QTc sont de $42,9 \pm 2,1$ ms pour le groupe contrôle et de $42,9 \pm 1,5$ ms pour le groupe ERKO β .

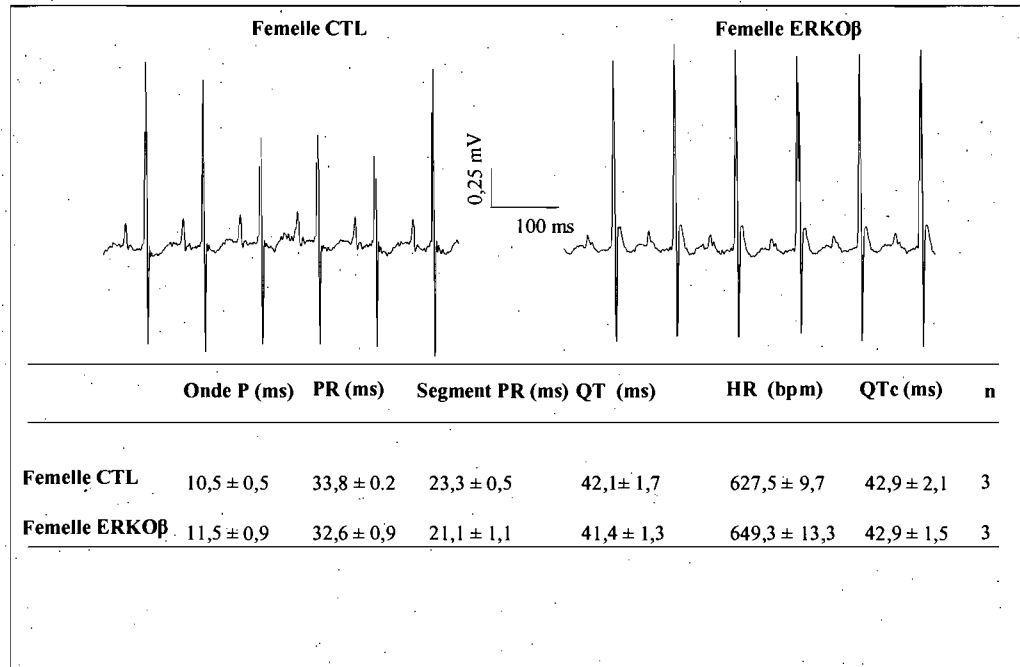


Figure 3-9 : Enregistrement d'ECG par télémétrie dans le groupe femelle ERKOβ

Exemples de tracés de télémétrie obtenus chez des souris femelles contrôles et ERKOβ âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêts mesurées soit l'onde P, l'intervalle PR, le segment PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc (* p< 0.05).

La même expérimentation a été effectuée chez un groupe de souris mâles. Comme il a été démontré dans nos expérimentations de dosage, les souris ERKO mâles possèdent des niveaux d'oestrogènes circulants très faibles. Chez le mâle, la probabilité que l'autre isoforme du récepteur soit surstimulée de manière compensatoire comparativement à la femelle est donc minime. Malgré cette importante distinction, les résultats que nous avons obtenus chez le mâle ne nous montrent pas de différences significatives dans les paramètres de l'ECG chez le mâle possédant uniquement une stimulation oestrogénique partielle.

En effet, les résultats que nous avons obtenus sont pour l'onde P de $10,5 \pm 0,5$ ms pour le groupe de souris contrôle et de $11,5 \pm 0,9$ ms pour le groupe de mâles ERKO β . Pour l'intervalle PR les valeurs obtenues sont de $33,8 \pm 0,2$ ms pour le groupe contrôle et de $32,6 \pm 0,9$ ms pour le groupe ERKO β . Les valeurs du segment PR sont de $23,3 \pm 0,5$ ms pour le groupe de souris contrôle et de $21,1 \pm 1,1$ ms pour le groupe de souris ERKO β . Les valeurs obtenues pour l'intervalle QT sont de $42,1 \pm 1,7$ ms pour le groupe contrôle et de $41,4 \pm 1,3$ ms pour le groupe ERKO β . Finalement les valeurs obtenues pour l'intervalle QTc sont de $42,9 \pm 2,1$ ms pour le groupe contrôle et de $42,9 \pm 1,5$ ms pour le groupe ERKO β .

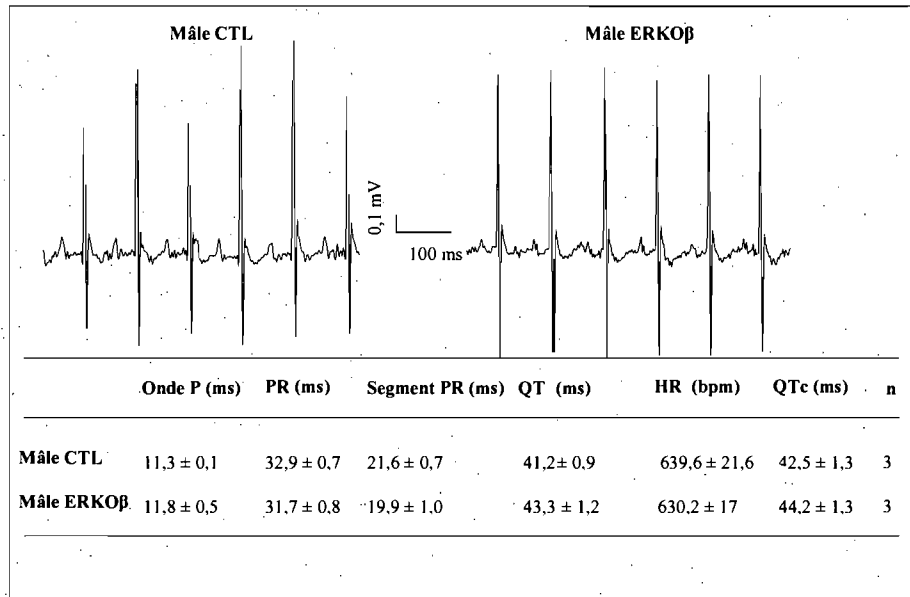


Figure 3-10 : Enregistrement d’ECG par télémétrie dans le groupe mâle ERKOβ

Exemples de tracés de télémétrie obtenus chez des souris mâles contrôles et ERKOβ âgées de 2-3 mois. Tableau comprenant les valeurs obtenues pour les paramètres d’intérêts mesurés soit l’onde P, l’intervalle PR, le segment PR, l’intervalle QT, le rythme cardiaque et l’intervalle QTc (* p< 0.05).

3.2.3 Enregistrement d'ECG par Langendorff

Comparativement aux deux techniques précédentes qui permettaient de mesurer de manière *in vivo* les paramètres de l'électrocardiogramme, la technique du Langendorff permet l'étude de ces mêmes paramètres mais de manière *ex-vivo*. Le Langendorff consiste à enregistrer les paramètres électrophysiologiques sur un myocarde explanté de l'organisme. La caractéristique distincte de cette approche est qu'elle permet l'étude des paramètres de l'ECG intrinsèques au myocarde. En effet, à l'intérieur de l'organisme le myocarde est sujet à de nombreuses influences externes, la plus importante d'entre elles étant exercée par le système nerveux autonome.[127] Ce système innerve le cœur et exerce au besoin, une influence sympathique ou parasympathique sur le myocarde. Ce type d'influence pourrait contribuer à masquer des différences intrinsèques au myocarde engendrées par certaines conditions, l'absence d'une stimulation oestrogénique complète pouvant possiblement être l'une d'entre elles.

Les paramètres de l'ECG ont donc été mesurés chez notre groupe de souris femelles contrôles, ERKO β et ovariectomisées. Les résultats que nous avons obtenus pour l'intervalle PR sont de $32,5 \pm 4,5$ ms pour le groupe de souris contrôles, de $35,3 \pm 1,0$ ms pour le groupe de souris ERKO β et de $32,8 \pm 0,8$ ms pour le groupe ovariectomisé. Pour l'intervalle QT les valeurs obtenues sont de $46,5 \pm 5,5$ ms pour le groupe contrôle, de $44,3 \pm 0,6$ ms pour le groupe ERKO β et de $58,8 \pm 8,5$ ms pour le groupe ovariectomisé. Finalement, les valeurs recueillies pour l'intervalle QTc sont de $38,5 \pm 3,9$ ms pour le groupe de souris contrôles, de $36,9 \pm 0,5$ ms pour le groupe de souris ERKO β et de $44,9 \pm$

6,3 ms pour le groupe de souris ovariectomisées. À la lumière de ces résultats, il ne semble pas que le système nerveux autonome compense l'absence de stimulation oestrogénique car aucune différence statistiquement significative dans les paramètres de l'ECG n'est présente malgré l'absence de ce système dans les expérimentations de type Langendorff.

	PR (ms)	QT (ms)	HR (bpm)	QTc (ms)	n
Femelle CTL	32,5 ± 4,5	46,5 ± 5,5	415,8 ± 14,3	38,5 ± 3,9	5
Femelle ERKOβ	35,3 ± 1,0	44,3 ± 0,6	416,1 ± 0,3	36,9 ± 0,5	3
Femelle ovx	32,8 ± 0,8	58,8 ± 8,5	347,2 ± 14,8	44,9 ± 6,3	4

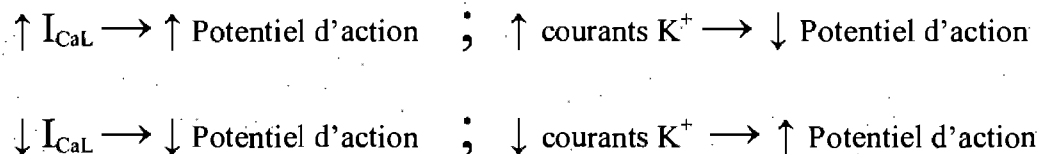
Figure 3-11 : Enregistrement d'ECG par Langendorff dans le groupe femelle ERKOβ

Tableau présentant les valeurs obtenues pour les paramètres d'intérêts mesurées soit l'intervalle PR, l'intervalle QT, le rythme cardiaque et l'intervalle QTc dans le groupe de femelles contrôles, ERKOβ et ovariectomisées ($P_{\text{valeur}} = 0,403$).

3.3 Courants calciques

Les courants calciques de type L sont impliqués dans l'initiation du phénomène de la repolarisation cardiaque et dans l'initiation du couplage excitation-contraction de la cellule. Ce courant ionique entre dans la cellule au moment de la phase plateau du potentiel d'action. Lors de cette phase, l'entrée de calcium est en équilibre avec la sortie d'ions potassium. Cet équilibre sera maintenu jusqu'au moment où le potentiel membranaire redescendra à des valeurs permettant l'ouverture de l'ensemble des canaux potassiques ce qui amènera la cellule à se repolariser. La repolarisation cardiaque (intervalle QT) est donc un événement multifactoriel qui est enclenché principalement par l'ouverture des canaux potassiques. Cependant, le moment d'ouverture de ces canaux dépend d'un équilibre dans lequel participe les canaux calciques.

En effet, la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT sont directement influencées par la densité des courants calciques entrants dans la cellule et des courants potassiques sortants de la cellule. Afin de ne pas entraîner des différences visibles dans la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT, les variations dans la densité de courant calcique (I_{CaL}) ou potassique (I_K) devrait toujours être compensée tel que démontré sur le diagramme suivant :



Malgré l'absence de différences dans les paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo caractérisant la repolarisation cardiaque, tel que démontré dans la section précédente, des différences au niveau de l'équilibre ionique cellulaire pouvaient tout de même exister. [128] Il est en effet connu que la valeur de l'intervalle QT raccourcit chez le garçon, comparativement aux filles, au moment de la puberté. Plusieurs évidences dans la littérature suggèrent que cette différence s'explique par l'augmentation des hormones androgéniques. Cependant, l'implication des oestrogènes demeure encore à élucider. Est-ce qu'une diminution des oestrogènes peut moduler le QT et les paramètres électrophysiologiques cellulaires caractérisant la repolarisation cardiaque? Serait-ce plutôt la variation du ratio œstrogène/androgène qui permettrait de moduler ces paramètres?

La durée des potentiels d'action ventriculaires et des courants potassiques a tout d'abord été étudiée chez les souris ERKO α et ERKO β femelles et mâles, car ce sont les principaux indicateurs de la fluctuation de la durée de la repolarisation cardiaque. L'hypothèse énoncée à ce sujet était que l'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur aux oestrogènes chez les souris ERKO α et ERKO β entraînerait le raccourcissement de l'intervalle QT, du potentiel d'action et l'augmentation de la densité des courants potassiques au niveau des cellules ventriculaires myocardiales. La caractérisation de la durée des potentiels d'action et de la densité des courants potassiques présents dans les myocytes ventriculaires infirmait cependant notre hypothèse initiale. Il nous restait une dernière composante à vérifier afin de valider qu'aucun paramètre de la repolarisation cardiaque n'était modifié par l'absence d'une stimulation oestrogénique

complète sur le myocarde : le courant calcique de type L. Ce courant étant d'une moins grande amplitude que les courants potassiques chez la souris, il n'était pas exclu qu'il puisse être modulé [128, 129] sans engendrer directement des différences dans les autres paramètres électrophysiologiques cellulaires. Afin de compléter notre étude, la densité et la cinétique des courants calciques de type L ont donc été caractérisées chez la souris ERK α et ERK β femelles et mâles.

3.3.1 Groupe femelle

3.3.1.1 Densité de courant

La densité du courant calcique de type L a été enregistré selon un protocole de voltage établi. Un pulse d'inactivation de -80 mV est imposée à la cellule pendant 100 ms et un deuxième prépulse à -45 mV est imposé à la cellule afin d'inactiver les courants sodiques. Des sauts de voltage de 10 mV allant de -50mV à +60 mV ont été imposés à la cellule, chacun de ces sauts durant 250 ms et à une fréquence de 0.1 Hz. La densité de courant traversant le canal a été enregistrée pour chacune de ces valeurs de voltage. La cellule a par la suite été ramenée à une valeur de potentiel membranaire au repos soit de -80 mV.

L'objectif de ces expérimentations était de voir l'impact de l'absence de stimulation oestrogénique partielle ou complète sur la densité des courants calciques de type L du myocarde. Pour ce faire, la densité de courant calcique de type L a été mesurée chez un groupe de souris contrôles, ERK α , ERK β et chez un groupe de souris ovariectomisées. L'intérêt de la souris ovariectomisée réside dans le fait qu'elle ne subit aucune stimulation

oestrogénique, comparativement aux souris ERK α et ERK β pour lesquelles ce blocage est partiel, car les ovaires (première source de production d'oestrogènes) ont été supprimés chez les animaux ovariectomisés. Selon l'hypothèse initiale énoncée, la densité de courant devrait être plus petite chez les souris ERK α et ERK β comparativement au groupe contrôle. La densité de courant attendue du groupe ovariectomisé aurait elle dû être plus faible que chez les groupes ERK α et ERK β sachant que toute stimulation oestrogénique est éliminée chez les ovx.

Cependant, les résultats que nous avons obtenus ne s'orientent pas du tout dans cette direction. Tel qu'il est montré à la figure 3-12, la densité de courant mesurée pour l'ensemble des valeurs de voltages imposés à la cellule ne sont pas statistiquement différentes entre les quatre groupes étudiés. En effet, la valeur de densité de courant maximale obtenue à 0 mV est de -7 ± 0.5 pA/pF pour le groupe de souris contrôles, $-5,9 \pm 1,25$ pA/pF pour le groupe de souris ERK α , $-8,3 \pm 0,8$ pA/pF pour le groupe de souris ERK β et de $-7,8 \pm 0,88$ pA/pF pour le groupe de souris ovariectomisées. La densité du courant calcique de type L n'est donc pas modulée par une stimulation partielle (l'isoforme alpha ou bêta du récepteur toujours fonctionnelle respectivement chez la souris ERK β et ERK α) ou par l'absence totale de stimulation oestrogénique (souris ovariectomisée).

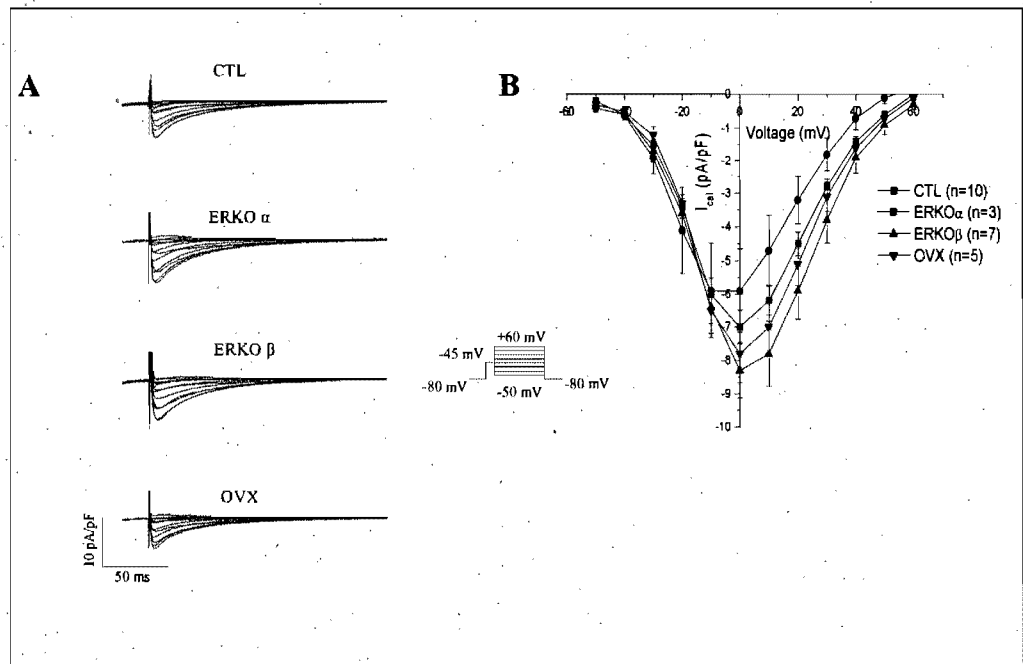


Figure 3-12: Effet de l'absence de stimulation oestrogénique partielle ou totale sur la densité des courants calciques de type L mesurés dans le groupe femelle

(A) Cette figure nous montre des exemples typiques de courants calciques de type L mesurés chez des souris femelles CTL, ERKO α , ERKO β et OVX. (B) La courbe du courant en fonction du voltage obtenue chez les groupes de souris femelles CTL, ERKO α , ERKO β et OVX pour lesquelles les valeurs de densité de courant ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$).

Malgré l'absence de différences dans le groupe femelle dans la densité du courant calcique de type L, nous nous sommes intéressés à savoir si la cinétique d'activation et d'inactivation du canal pourrait cependant être modulée par l'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes fonctionnelles du récepteur aux oestrogènes. Il est connu que la cinétique d'activation et d'inactivation du canal calcique de type L peut être directement modulée par des concentrations aiguës d'oestrogène (effet non génomique). Qu'en est-il de la modulation génomique de la cinétique de ce canal ? C'est à cette question que nous avons tenté de répondre à l'aide des expérimentations suivantes.

3.3.1.2 Activation du canal calcique de type L

L'activation est le processus par lequel le canal ouvert est amené à des valeurs de potentiel membranaire qui favorisent le passage d'ions. Il est possible de mesurer le pourcentage d'activation du courant en fonction des valeurs de potentiel membranaire qui lui sont imposées [130]. Le même protocole que celui de la densité de courant est utilisé, mais cette fois les valeurs de densité de courant obtenue pour chacune des valeurs de voltage imposée à la cellule sont utilisées et mis en relation avec la valeur de courant maximale.[131] Un ratio est calculé, le pourcentage d'activation du courant et il est possible d'obtenir la valeur de deux constantes : le $V_{1/2}$ qui représente la valeur de voltage pour laquelle 50% du courant est activé et le $S_{1/2}$ qui représente le niveau d'activation du canal.

La cinétique d'activation du courant calcique de type L a été mesurée dans le groupe femelle. Les valeurs que nous avons obtenues et qui sont présentées dans la figure

3-13, nous montrent qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la cinétique d'activation du canal calcique de type L entre les groupes de femelles contrôles, ERKO α , ERKO β et ovariectomisées. Une stimulation oestrogénique complète, partielle absente ne semble pas influencer la cinétique d'activation du courant calcique de type L ventriculaire.

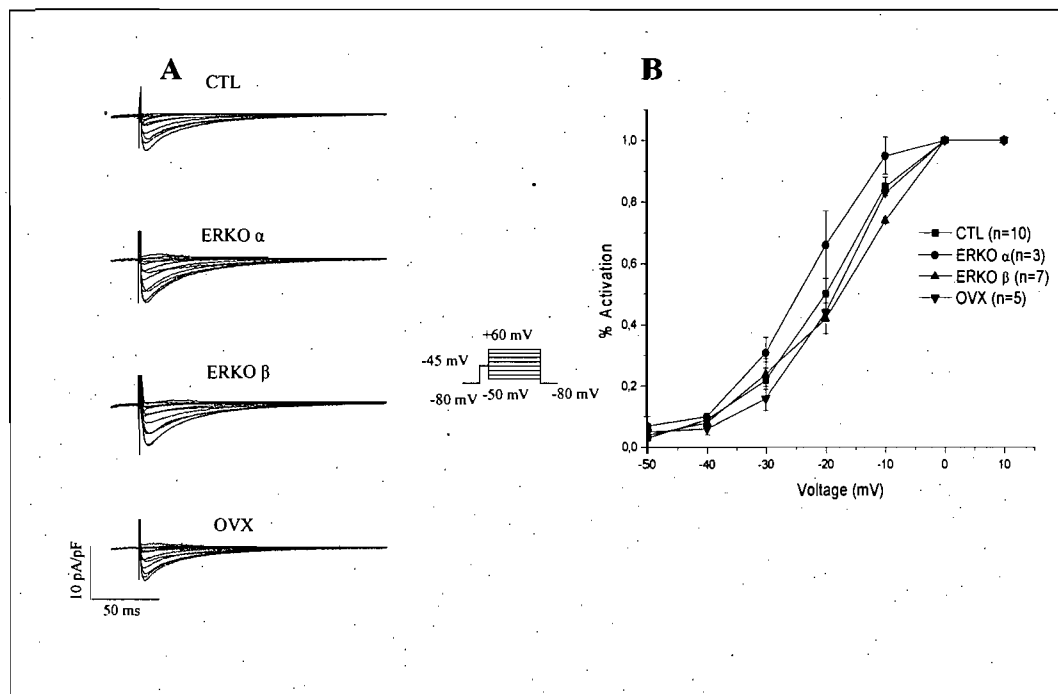


Figure 3-13 : Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'activation du courant calcique de type L dans le groupe femelle.

(A) Cette figure nous montre des exemples typiques d'activation du courant calcique de type L mesurée chez des souris femelles CTL, ERKO α , ERKO β et OVX. (B) La courbe l'activation du courant mesurée dans les groupes de souris femelles CTL, ERKO α , ERKO β et OVX pour lesquelles les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$).

3.3.1.3 Inactivation du courant calcique de type L

L'inactivation représente l'état où le canal est toujours à l'état ouvert mais plus aucun ion ne peut le traverser. Il existe différents mécanismes d'inactivation, celui de la "ball and chain" et de l'inactivation en C-terminale étant les plus couramment vus chez les canaux ioniques activés par le voltage. Lors de la mesure de la cinétique d'inactivation, l'objectif est de mesurer le pourcentage d'inactivation du courant en fonction du voltage qui lui est imposé [93, 131]. Plus spécifiquement un protocole précis comprenant l'imposition de saut de voltage de 10 mV partant de -60 mV et allant jusqu'à +20 mV pour une durée de 250 ms ont été imposée à la cellule. Un pulse final de +10 mV a finalement été imposée à la cellule avant de la ramener à son potentiel de repos de -80 mV. La densité de courant traversant le canal a ensuite été mesurée. Chacune des valeurs de courant a ensuite été utilisée afin de calculer le pourcentage d'inactivation (densité de courant/densité de courant maximale) du canal pour chacune des valeurs des voltages qui lui sont imposés.

La cinétique d'inactivation du courant calcique de type L a donc été mesurée dans le groupe femelle. Les valeurs que nous avons obtenues et qui sont présentées dans la figure 3.13, nous permettent de voir la valeur de voltage pour laquelle 50% du courant est inactivé ($V_{1/2}$) et le niveau d'inactivation du courant ($S_{1/2}$). Le $V_{1/2}$ calculé pour le groupe de femelles contrôles est de -33,9, pour le groupe ERKO β est de -33,0 et pour le groupe OVX est de -33,5. Les valeurs obtenues pour le $S_{1/2}$ sont de 5,2 pour le groupe contrôle, de 5,4 pour le groupe ERKO β et de 5,1 pour le groupe OVX. L'ensemble des valeurs mesurées concernant la cinétique d'inactivation chez le groupe femelle ne sont pas statistiquement

différentes. Une stimulation oestrogénique totale, partielle ou absente ne semble donc pas moduler la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L.

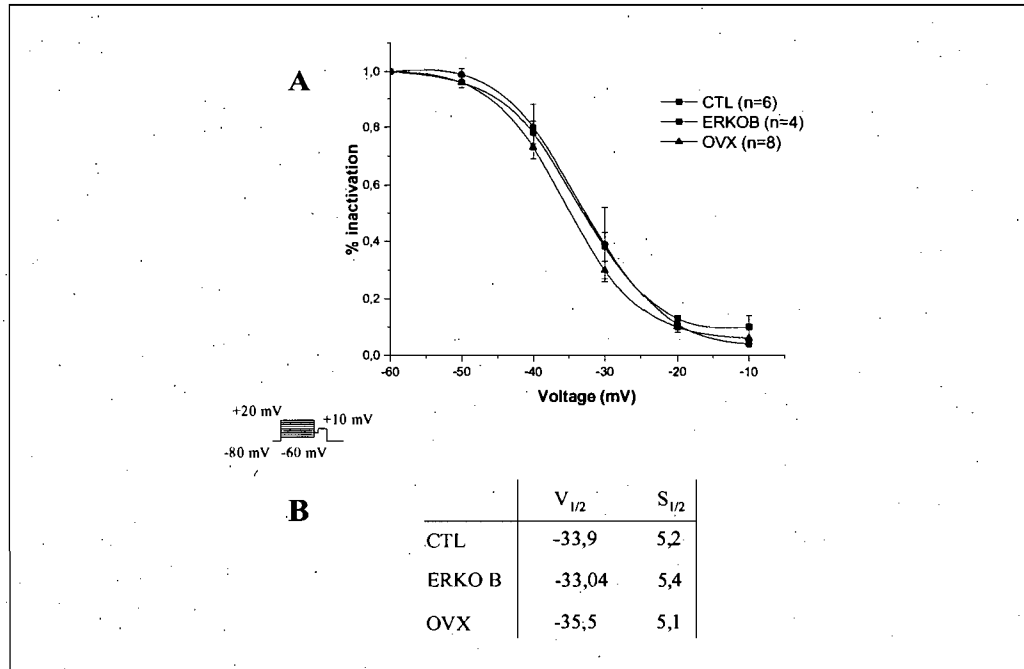


Figure 3-14: Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe femelle.

(A) La courbe d'inactivation du canal mesurée dans les groupes de souris femelles CTL, ERKOB et OVX pour lesquelles les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$). (B) Les valeurs de $V_{1/2}$ (valeur de voltage pour laquelle 50% du courant est inactivée) et de $S_{1/2}$ (taux d'inactivation du canal) pour lesquelles les valeurs sont similaires entre les groupes (* $p < 0.05$).

3.3.2 Groupe mâle

La densité et la cinétique des courants calciques ont aussi été mesurées dans le groupe de souris mâles. L'intérêt du groupe mâle réside dans le fait que ces souris possèdent des niveaux moins élevés d'oestrogènes. Donc, comparativement aux femelles, la possibilité de stimuler l'autre isoforme du récepteur aux oestrogènes toujours exprimé et fonctionnelle est moins probable. Ce modèle nous permet d'étudier l'influence d'une véritable stimulation partielle oestrogénique sur le canal calcique de type L.

3.3.2.1 Densité du courant calcique de type L

La mesure de la densité de courant calcique de type L a été effectuée selon un protocole standard de mesure des canaux calciques tels que décrit précédemment. Les résultats que nous avons obtenu et qui sont présentés à la figure 24 nous montrent qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la densité de courant calcique de type L entre le groupe de souris mâles contrôles ($-7,7 \pm 0,5$), le groupe de souris ERKO α ($-8,7 \pm 1,8$) et le groupe de souris ERKO β ($-8 \pm 1,6$) à la valeur reportée de 0 mV, mais aussi pour l'ensemble des autres valeurs de courants mesurées. L'absence de l'une ou l'autre des isoformes fonctionnelles du récepteur aux oestrogènes ne semblent pas influencer la densité de courant calcique de type L cardiaque dans le groupe de souris mâles.

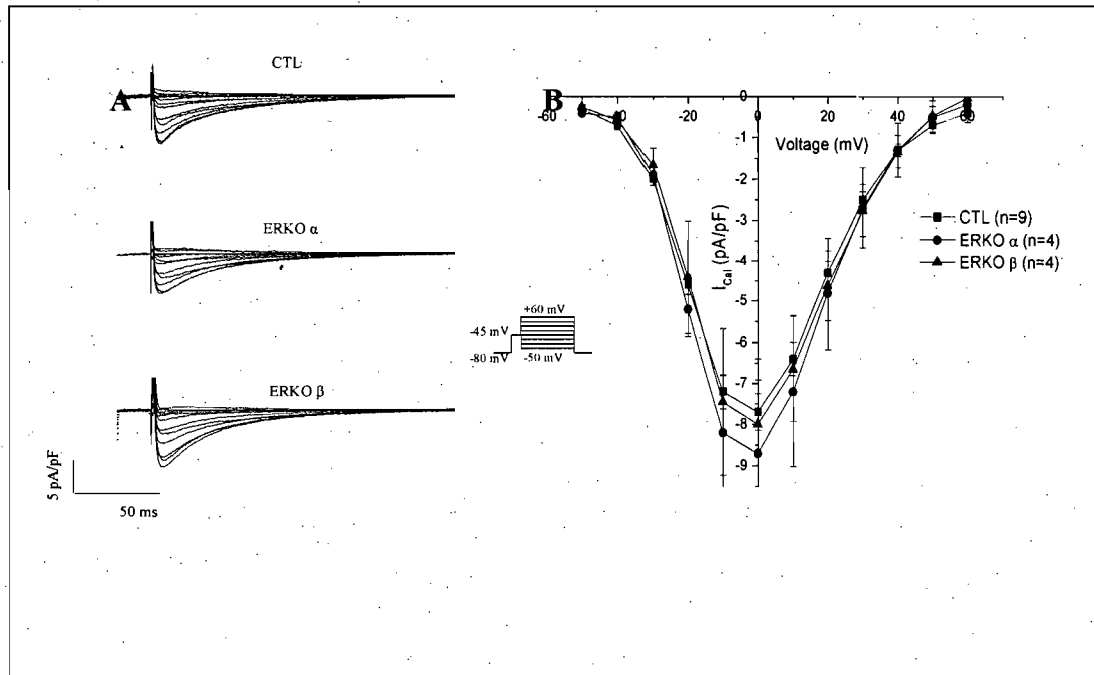


Figure 3-15: Effet de l'absence de stimulation oestrogénique totale sur la densité des courants calciques de type L mesurés dans le groupe mâle

(A) Cette figure nous montre des exemples typiques de courant calcique de type L mesuré chez des souris mâles CTL, ERKO α , ERKO β . (B) La courbe du courant en fonction du voltage obtenue chez les groupes de souris mâles CTL, ERKO α , ERKO β et pour lesquelles les valeurs de densité de courant ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$).

3.3.2.2 Activation du courant calcique de type L

La cinétique d'activation du courant calcique de type L a été mesurée dans le groupe mâle. Les valeurs que nous avons obtenu et qui sont présentées dans la figure 3-16 vont dans le même sens que ce que nous avons obtenu précédemment soit qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la cinétique d'activation du courant calcique de type L entre les groupes de mâles contrôles, ERKO α , ERKO β . L'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur aux oestrogènes n'entraîne pas de modifications, en condition physiologique, dans la cinétique d'activation du courant calcique de type L ventriculaire.

3.3.2.3 Inactivation du courant calcique de type L

La cinétique d'inactivation du courant calcique de type L a aussi été mesurée dans le groupe mâle. Les valeurs que nous avons obtenu et qui sont présentées dans la figure 3-17, vont dans le même sens que ce que nous avons obtenu précédemment soit qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L entre les groupes de mâles contrôles, ERKO α , ERKO β . L'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes du récepteur aux oestrogènes n'entraîne pas de modifications, en condition physiologique, dans la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L ventriculaire.

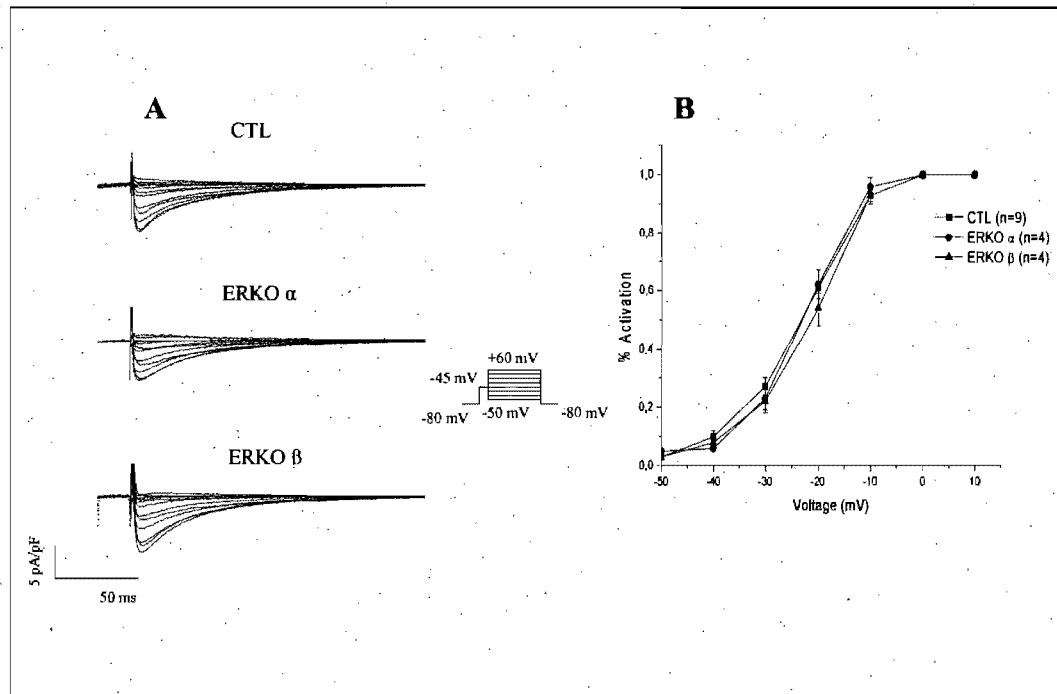


Figure 3-16 : Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe mâle.

(A) Cette figure nous montre des exemples typiques d'activation du courant calcique de type L mesurée chez des souris mâles CTL, ERKO α , ERKO β . (B) La courbe de l'activation du canal mesurée chez les groupes de souris mâles CTL, ERKO α , ERKO β pour lesquelles les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$).

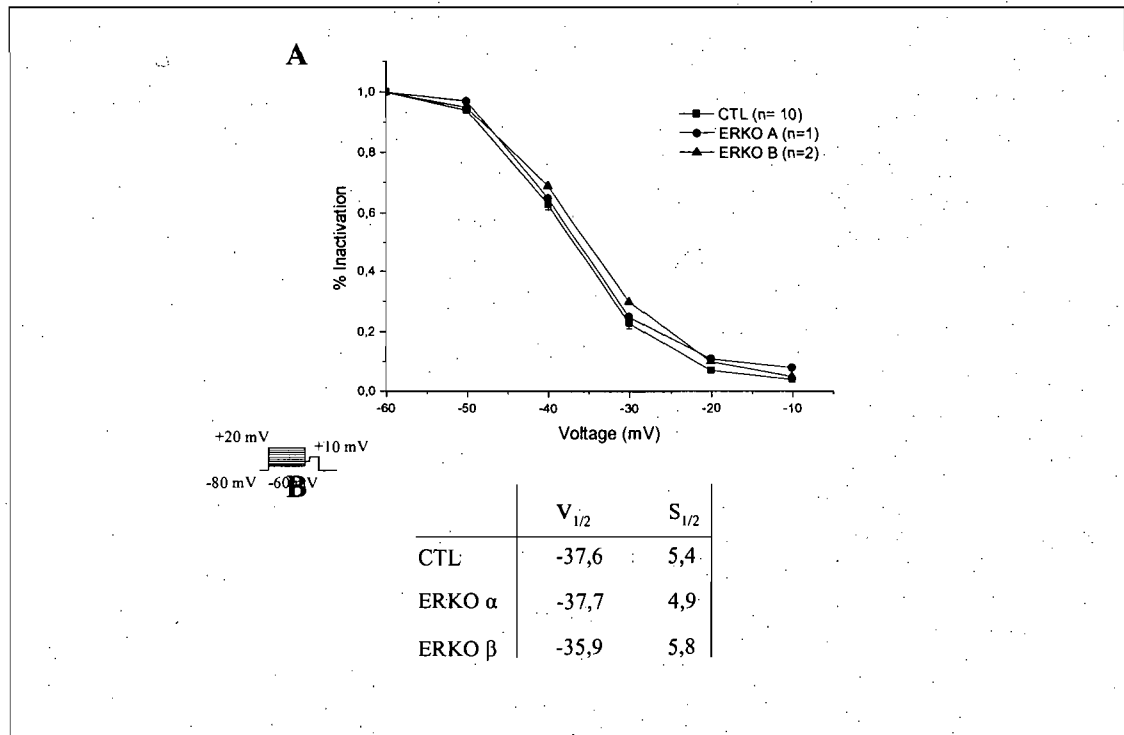


Figure 3-17: Impact de l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique sur la cinétique d'inactivation du courant calcique de type L dans le groupe mâle.

(A) La courbe d'inactivation du courant mesurée dans les groupes de souris mâles CTL, ERKO α et ERKO β pour lesquelles les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les groupes (* $p < 0.05$). (B) Les valeurs mesurées de $V_{1/2}$ (valeur de voltage pour laquelle 50% du courant est inactivée) et de $S_{1/2}$ (taux d'inactivation du canal) pour lesquelles les valeurs sont similaires entre les groupes (* $p < 0.05$).

4 Discussion

4.1 Efficacité de détection de la technique utilisée pour le génotypage

Le PCR est une technique hautement fiable et qui permet, entre autres, de réaliser le génotypage d'animaux transgéniques. En raison de la haute spécificité des amorces qui sont conçues pour la portion du gène d'intérêt à amplifier et la mutation qui y est insérée, cette technique offre rapidement des résultats de haut rendement.

Il est toutefois possible d'obtenir des résultats erronés avec la technique du PCR si certaines précautions ne sont pas prises. Dans un premier temps, il est primordial, lors de la mise au point des amorces et des conditions d'amplification, de s'assurer qu'un seul produit de PCR sera formé pour chaque paire d'amorces utilisées. De mauvaises températures d'appariement et/ou des amorces manquant de spécificité peuvent amener la formation de produit de PCR multiples, ce qui diminue grandement la fiabilité et la précision de la technique de détection.

La mise en place de conditions offrant une grande spécificité et sélectivité dans l'amplification des produits désirés permet d'éliminer la majorité des erreurs reliées à la technique de PCR. Cependant, certaines erreurs inhérentes à la manipulation des produits de PCR peuvent aussi entraîner au final des erreurs. La plus commune d'entre elles est la contamination de produits de PCR migrant dans des puits côte-à-côte et pour laquelle une simple diffusion entraînerait une fraction des produits de PCR d'un échantillon dans la

colonne voisine. Afin d'éliminer cette possibilité d'erreur il est important de toujours s'assurer que l'intensité de la luminosité est similaire entre chacune des bandes de produits de PCR présent sur le gel. En cas de doute, lorsque deux échantillons migrant côte à côte présente le même génotype mais que leur luminosité est visiblement très différente, il est nécessaire de faire migrer à nouveau l'échantillon avec la luminosité la plus faible afin de s'assurer que les résultats observés ne sont pas dues à de la contamination. Finalement il est primordial de toujours faire migrer ces échantillons avec un marqueur de poids moléculaire afin de s'assurer qu'aucune anomalie ne s'est produite durant la procédure d'amplification.

Il existe d'autres techniques que le PCR afin d'effectuer le génotypage qui offre soit plus de puissance, de précision ou de rapidité tel que la technique de Southern Blot et la technique du QPCR. Cependant, l'excellent rendement de la technique de PCR jumelé à son moindre coût et à son temps d'exécution plus qu'acceptable fait que cette technique est celle qui est le plus communément utilisée lors du génotypage des animaux. La rigueur, la constance et la précision des résultats que nous obtenons avec cette approche dans le laboratoire font que la possibilité d'erreur dans le génotype de nos animaux est très faible.

4.2 Dosage des oestrogènes : efficacité de la technique et implications des valeurs mesurées

La technique ELISA est l'approche que nous avons utilisée afin de réaliser le dosage des niveaux de 17β -oestradiol dans nos échantillons de sérum de souris. Le 17β -oestradiol est la forme prédominante sous laquelle les oestrogènes sont retrouvés dans

l'organisme. L'objectif de ce dosage était dans un premier temps d'identifier si les concentrations d'oestrogène retrouvées dans la lignée de souris C57BL/6 étaient similaires aux concentrations retrouvées chez d'autres lignées murines couramment utilisées soient les lignées CD1, C3H, FVB et SJL. La lignée C57BL/6 était particulièrement d'intérêt car c'est sur cette lignée que la mutation permettant aux souris de ne plus avoir l'une ou l'autre des isoformes du récepteur aux oestrogènes fonctionnelle a été insérée.

Le deuxième objectif poursuivi par ce dosage était de vérifier les concentrations sériques des oestrogènes chez la lignée ERKO. L'hypothèse avancée était que l'absence de l'une ou l'autre des isoformes du récepteur pourrait amener une compensation au niveau physiologique. Selon la théorie des récepteurs et les principes de pharmacologie, cette compensation pourrait, entre autres, se traduire par des niveaux significativement plus élevés d'oestrogènes afin de stimuler maximale l'autre isoforme du récepteur aux oestrogènes, toujours exprimée et fonctionnelle.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de répondre à nos questions préliminaires. En ce qui concerne les niveaux de 17β -oestradiol (pM) mesurés chez les souris femelles C57BL/6, les valeurs obtenues sont similaires à celles mesurées chez d'autres lignées de souris couramment utilisées soit les lignées CD1, FVB, C3H et SJL. Cette observation est très importante car des études préalables dans le laboratoire ont clairement démontré que les niveaux d'androgènes étaient significativement plus faibles chez la lignée C57BL/6 comparativement à la lignée CD1. Il aurait donc pu être possible que cette même tendance se maintienne pour les hormones féminines. Outre la similitude dans les concentrations des oestrogènes entre les lignées, cette information nous permettait

aussi de constater que les souris C57BL/6 se comportaient normalement en ce qui a trait aux mécanismes de la synthèse des oestrogènes ce qui nous laissait croire que des différences dans la régulation hormonale pourrait être observées chez notre modèle transgénique.

En ce qui concerne les niveaux de 17β -oestradiol mesurés chez les lignées ERKO α et ERKO β , des résultats intéressants ont pu être recueillis. En effet, les valeurs mesurées sont plus élevées chez les souris ERKO α que chez les souris ERKO β . Ce résultat nous porte à croire que l'isoforme alpha du récepteur pourrait avoir une importance physiologique plus importante que l'isoforme bêta du récepteur car son absence semble être compensée par de plus grandes concentrations circulantes d'oestrogènes. La littérature recense le rôle prédominant du récepteur alpha sur les processus reliés à la reproduction ce qui pourrait expliquer, en partie, l'augmentation importante des niveaux d'oestrogènes lors de l'absence de fonctionnement de ce récepteur. Les niveaux d'oestrogènes chez la souris n'exprimant pas une isoforme fonctionnelle du récepteur bêta sont similaires à ceux observés chez la souris femelle de type sauvage. Toutefois, étant donné le faible nombre d'animaux utilisés, il est difficile de porter une conclusion définitive sur cette observation.

Les niveaux de 17β -oestradiol ont aussi été mesurés chez des lignées mâles. Les récepteurs aux oestrogènes sont aussi présents chez les mâles. Ils y jouent un rôle moins crucial que chez la femelle lors de la reproduction mais l'absence de fonctionnalité des récepteurs a aussi des répercussions chez le mâle. Les valeurs de dosage qui ont été obtenues nous montrent que les valeurs de 17β -oestradiol sont similaires entre les lignées de mâles C57BL/6, CD1, ERKO α et ERKO β . L'augmentation des concentrations

circulantes des oestrogènes ne semble pas se maintenir chez la lignée mâle ERKO. Cela peut probablement s'expliquer d'une part par un rôle secondaire des oestrogènes dans la régulation hormonale masculine, très loin derrière le rôle joué par les androgènes. Par ailleurs, les oestrogènes sont uniquement synthétisés chez le mâle par les glandes surrénales et le tissu adipeux, deux sites qui atteignent plus rapidement leur capacité de synthèse maximale.

La technique de dosage utilisée est une technique qui permet de quantifier de très petites quantités de sérum (100 uL). Cela représente un grand avantage lorsque les échantillons à doser proviennent de petits animaux, tels que les rongeurs. L'utilisation de petits échantillons présentent aussi certains inconvénients qu'il est important de considérer lors de l'interprétation des résultats. Dans un premier temps, il est important de considérer la variabilité, la sensibilité et le niveau de détection de la technique et des appareils utilisés pour réaliser les dosages et cela peut expliquer en grande partie la grande variabilité des résultats obtenus, variabilité qui se traduit par de grands écarts-type dans la plupart des groupes.

La variabilité inhérente de la technique se situe à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la difficulté de la technique réside dans la quantité de sérum sanguin pouvant être prélevée chez la souris. De 150-200 μL de sang peuvent maximalelement être prélevée suivant l'ouverture de la cage thoracique. Suivant la centrifugation des échantillons, le volume de sérum restant est de 70-150 μL ce qui est souvent la quantité minimale pour être en mesure de réaliser des expériences sur ces échantillons. De plus, il n'est pas rare qu'un certain niveau d'hémolyse persiste au niveau du sérum sanguin, ce qui fausse le volume exact de

sérum et peut contribuer à interférer avec les dosages effectués. Le niveau de conservation des sérums est aussi un élément qui peut varier d'un échantillon à l'autre, certains ayant été conservés beaucoup plus longtemps au congélateur et leur stabilité ayant pu être influencé par le gel et dégel dû à l'utilisation du congélateur par de nombreux utilisateurs.

Outre la stabilité de base des échantillons, la quantité de produits dosés a aussi pu être influencée par la variabilité de la technique d'extraction initiale des produits contenus dans le sérum. Finalement la variabilité de la quantité des produits déposés sur la plaque de lecture a aussi pu être légèrement variable entre les échantillons ce qui peut aussi expliquer en partie la variabilité des résultats obtenus.

Au niveau de la sensibilité, ce paramètre est grandement influencé par les limites de la technique utilisée qui ne peut détecter à partir de la valeur de 10 pM et jusqu'à la valeur de 2000 pM la concentration de produit présent dans l'échantillon. Il est important de comprendre que les oestrogènes sont en concentrations de l'ordre des pM dans l'organisme. La quantité présente dans un échantillon de sérum de 50 μ L est donc très petite. Plusieurs échantillons étant probablement très proches de la limite inférieure de détection n'ont pu être dosés, ce qui diminue grandement la puissance statistique de plusieurs groupes et amène à la hausse certaines moyennes qui auraient été plus faibles si ces échantillons auraient pu être détectés. Outre la lecture des échantillons n'ayant pas fonctionné, la puissance statistique de cette expérience est directement proportionnelle au coût de ces expériences qui est très élevé et pour lequel il est très dispendieux de se procurer des kit de dosage et de procéder au sacrifice d'animaux supplémentaires et de leurs échantillons de sérum correspondants. Finalement, la variabilité des résultats obtenus dépend est aussi

influencé par les limites de détection inhérentes au spectrophotomètre permettant la lecture de la plaque. Malgré ces obstacles, les résultats que nous avons obtenus nous permettent de répondre à nos questions de départ concernant les concentrations circulantes de 17β -oestradiol et nous permette de compléter la caractérisation initiale de notre modèle animal.

4.3 Le modèle ERKO : modèle d'étude de la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque par les oestrogènes

Plusieurs études établissent clairement le lien entre les androgènes comme modulateurs des courants potassiques [123, 124] constituant la repolarisation cardiaque. Cependant, l'implication des oestrogènes à ce sujet demeure encore à élucider. L'ensemble des expérimentations réalisées dans le cadre de ce projet avait comme objectif d'essayer de faire progresser les connaissances à ce sujet. En effet, plusieurs interrogations persistent encore à savoir si la seule augmentation des niveaux des androgènes amène la diminution du QTc chez le mâle ou si le ratio androgène/oestrogènes pourrait aussi accentuer ce phénomène. De plus, quel est le rôle des oestrogènes chez la femelle? A-t-il un rôle protecteur, est-ce que la diminution de ces concentrations circulantes pourrait aussi amener une diminution de la durée du QTc ? Le modèle transgénique utilisé, nous permet de mieux comprendre le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque tant chez le mâle que chez la femelle.

4.4 Paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo ou l'impact global sur le myocarde d'une stimulation oestrogénique partielle

Plusieurs types d'expérimentations ont été effectués afin d'identifier l'impact d'une stimulation oestrogénique partielle sur le myocarde. En effet, des approches aussi variées et complémentaires que l'ECG de surface, la télémétrie et le Langendorff ont été utilisées afin de répondre à cette question. L'hypothèse de départ qui avait été formulée à ce sujet était que l'absence partielle ou totale de stimulation oestrogénique engendrerait une diminution de l'intervalle QTc. En réalité, ce qui a été observé dans l'ensemble de nos expérimentations ne permet pas de confirmer cette hypothèse initiale. Dans l'ensemble des expérimentations in vivo et ex vivo, aucune différence dans l'électrocardiogramme n'est associée avec une modification du niveau de stimulation oestrogénique. Ces résultats plutôt surprenants renforcent l'idée associée aux androgènes comme modulateurs de la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque.

Est-il possible qu'un manque d'efficacité dans la méthode utilisée contribue à expliquer l'absence de différences dans les paramètres in vivo et ex vivo? L'acquisition et l'analyse des données sont effectuées avec des technologies de pointe du domaine. En effet, pour chacune de ces étapes un logiciel adapté et spécifique est requis. L'analyse des paramètres de l'électrocardiogramme est effectuée à l'aide du logiciel ECG auto.

Le principe d'analyse utilisé par le logiciel repose sur la reconnaissance de formes préalablement identifiées et définies par l'utilisateur. Plus précisément, une librairie dans

laquelle plusieurs formes d'ECG différents sont présentes est constituée par l'utilisateur. Pour chacune de ces formes l'emplacement précis de chacune des ondes de l'électrocardiogramme est déterminé. Le logiciel utilise par la suite l'ensemble des formes présentes dans la librairie et les superpose une à une sur chacun des battements de l'ECG. La forme optimale pour chacun des battements est sélectionné par le logiciel et la valeur de chacun des paramètres est calculé en fonction de ce qui a été préalablement établi.

Le recours à ce genre de technologies diminue les chances d'erreurs reliées à la manipulation de grandes quantités de données dont les paramètres sont calculés à la main. Grâce à ces logiciels, les paramètres d'analyse sont uniformisés et une fois les critères fixés, la grande majorité de l'analyse est réalisée par le logiciel. Il ne reste par la suite qu'à compiler les données recueillies afin d'obtenir les moyennes pour chacun des groupes. Il est donc peu probable que l'absence de différences obtenues dans les paramètres de l'électrocardiogramme in vivo et ex vivo s'explique par un manque d'efficacité des logiciels utilisés.

Quelles sont maintenant les causes d'erreurs les plus probables lors de ce type d'expérimentations et qui peuvent entraîner de la variabilité dans les résultats obtenus. Ils arrivent parfois que les enregistrements effectués présentent des formes non conventionnelles pour un électrocardiogramme. Cela n'est pas dû à des anomalies chez l'animal mais à un positionnement non optimal des électrodes sur la cage thoracique ou sur le cœur de l'animal, lors de l'ECG de surface et du Langendorff ou à un déplacement du capteur à l'intérieur de l'animal lors de la télémétrie. Il devient alors difficile pour le logiciel de pouvoir calculer les paramètres demandés, ce qui peut introduire des données

aberrantes ou encore diminuer la puissance statistique de l'échantillon, ces enregistrements étant tout simplement éliminés.

En ce qui concerne l'ensemble des autres conditions utilisées, une grande uniformité est toujours de mise. Le même temps d'attente est toujours respecté avant l'enregistrement afin de s'assurer que les paramètres sont stabilisés. De plus, les animaux sont toujours anesthésiés dans un laps de temps précis, une anesthésie plus ou moins profonde entraîne des variations dans la valeur du rythme cardiaque ce qui modifie la valeur de certains autres paramètres. Finalement, les animaux utilisés sont toujours dans le même groupe d'âge, entre 2-6 mois et ont approximativement le même poids corporel, le poids des animaux influençant la vitesse et l'intensité avec laquelle l'agent anesthésiant fait son effet. Le pourcentage de tissu adipeux étant un élément faisant varier considérablement la biodisponibilité d'une drogue. En ce qui concerne les précautions utilisées lors des expérimentations de Langendorff, un temps similaire est utilisé entre le moment où le cœur est explanté de la cage thoracique et canulé. L'ensemble de ces précautions rend les techniques de mesures des paramètres électrophysiologiques in vivo et ex vivo très précises et avec peu de variabilité d'une expérimentation à l'autre.

4.5 Canaux calciques et repolarisation cardiaque

4.5.1 Approche du patch clamp

La technique du patch clamp consiste à enregistrer les courants ioniques parcourant les cellules d'un tissu ou d'un organe donné. Cette approche permet de pousser plus loin la compréhension des résultats électrophysiologiques obtenues in vivo et ex vivo. Brièvement,

les cellules sont présentes dans un environnement externe similaire aux concentrations ioniques retrouvées dans l'organisme. Un dispositif de stimulation et d'enregistrement avec à son extrémité une fine pipette de verre remplie d'une solution mimant l'environnement intracellulaire est utilisée afin de stimuler la cellule et enregistrer les courants ioniques désirés. Préalablement à son utilisation, des protocoles de stimulation bien précis et spécifique à la famille de courants enregistrés sont mis au point. La composition des solutions externes et internes est aussi déterminée afin de s'assurer d'un maximum de spécificité du courant qui sera enregistré et réduire au strict minimum les chances d'enregistrer simultanément d'autres courants ioniques, contaminant le signal désiré. De par l'ensemble de ces précautions et la finesse de son exécution, le patch clamp est donc une technique qui permet une grande précision et fiabilité des résultats collectés.

Il existe différents modes d'enregistrement des courants ioniques. Celui que nous avons favorisé est le mode appelé cellule entière (whole-cell). La caractéristique propre à ce mode est que le courant enregistré correspond au courant total parcourant la cellule. Ce mode est distinct et donne lieu à l'enregistrement de courant de plus grande densité que lors de l'utilisation du mode d'enregistrement appelé canal unitaire (single channel), où cette fois-ci, le courant traversant un seul canal est enregistré.

Le mode d'enregistrement qui est cependant le plus favorisé lors de l'enregistrement des canaux calciques est le mode perforé (perforated patch). La caractéristique de ce mode est qu'une substance appelée perforine (amphotéricine ou nystatine) est ajoutée à la solution intracellulaire contenue dans la pipette. Lors du contact de la pipette avec la cellule, cette solution produit de petits trous à travers la membrane cellulaire. Ces petits

trous dans la membrane permettent à certains constituants intracellulaires de sortir de la cellule par simple diffusion. Dans le cas de l'enregistrement des canaux calciques, ce processus permet d'augmenter la quantité d'AMPc à l'intérieur de la cellule. L'AMPc est un médiateur qui est en outre, impliqué dans la phosphorylation du canal calcique de type L. La phosphorylation du canal permet une meilleure ouverture et l'obtention de courants de plus grande densité.

La température est aussi un autre facteur à considérer lors de l'enregistrement de courant ionique. En effet, ce paramètre influencera directement la cinétique du canal. Une température le plus près possible de 37° C est à privilégier lors de l'étude des courants calciques. Cependant, à ces températures, les cellules sont beaucoup plus fragiles, se conservent moins longtemps et il devient très difficile d'y réaliser des expérimentations. En ce qui nous concerne, nos expérimentations ont été effectuées à la température ambiante (22° C). Cette température rend l'aspect pratique des expérimentations moins difficiles, et est d'ailleurs utilisée par un bon nombre de groupes [132-135].

4.5.2 Importance du courant calcique de type L dans le myocarde

Le courant calcique de type L est un courant de très grande importance dans le myocarde. Il est non seulement impliqué dans la phase plateau du potentiel d'action mais aussi dans l'initiation du couplage excitation-contraction cellulaire.[100] L'intérêt premier de l'étude de ce courant est de pouvoir élucider l'ensemble des composantes caractéristiques de la repolarisation cardiaque. La caractérisation des potentiels d'action ventriculaires et des courants potassiques ayant été précédemment réalisés sur le modèle

ERKO, il nous semblait essentiel de caractériser le dernier élément pouvant influencer la repolarisation, les courants calciques. Il est en effet recensé dans la littérature que les oestrogènes, lorsqu'appliqués en concentration aigue ont la capacité de moduler le canal calcique de type L cardiaque. Est-il possible que le canal calcique de type L soit aussi modulé de manière génomique par les oestrogènes et contribuent à expliquer les différences mâles-femelles en ce qui a trait à la repolarisation cardiaque? Ces interrogations ont pu être répondues par l'ensemble des expérimentations effectuées sur le canal calcique de type L dans nos différents groupes à l'étude.

4.5.3 Conséquences d'une stimulation oestrogénique complète, partielle ou nulle sur le canal calcique de type L

L'hypothèse énoncée concernant l'influence de la stimulation oestrogénique sur le canal calcique de type L était que la diminution de la stimulation oestrogénique amènerait une modulation de la densité ou de la cinétique du courant calcique de type L. L'ensemble des expérimentations réalisées nous a fournit suffisamment de preuves afin de pouvoir infirmer notre hypothèse de départ.

Dans un premier temps, la caractérisation de la densité du courant calcique de type L a été effectuée chez le groupe femelles contrôles, ERKO α et ERKO β . Les résultats que nous avons collectés à ce sujet n'étaient visiblement pas statistiquement différents entre ces trois groupes. Considérant les niveaux d'oestrogènes mesurés dans chacun de ces groupes, l'absence de différences dans la densité des courants calciques nous laissait envisager une

stimulation compensatoire de l'autre isoforme du récepteur toujours exprimée et fonctionnelle. Dans une telle alternative, il était possible que la stimulation oestrogénique soit aussi importante chez les groupes ERKO α et ERKO β que chez le groupe contrôle. Afin d'élucider cette question nous avons créé un quatrième groupe à l'étude, le groupe de souris ovariectomisées. La particularité de ce groupe réside dans le fait que ces souris sont coupées de leur source majeure de production d'oestrogène, les ovaires. Sans la production d'oestrogène, la stimulation des récepteurs ER α et ER β quoique toujours fonctionnels n'est plus possible. La densité de courant mesurée dans ce groupe ne fut cependant pas significativement différente à celles précédemment mesurées chez nos trois autres groupes.

Outre la souris ovariectomisée, il existe d'autres modèles permettant l'étude de l'impact d'une absence totale de stimulation oestrogénique. L'utilisation de bloqueurs spécifiques au récepteur alpha ou bêta aurait pu être utilisée chez l'une ou l'autre des souris ERKO afin de vérifier si l'absence de modulation du canal calcique de type L par les oestrogènes est camouflée par une sur-stimulation de l'autre isoforme du récepteur. Cependant, seulement quelques bloqueurs sélectifs à chacune des deux isoformes du récepteurs sont à ce jour disponibles quoique la plupart sont encore au stade d'essais expérimentaux. La possibilité d'utiliser un bloqueur non sélectif mais spécifique aux deux isoformes du récepteur tel que le tamoxifène était aussi une possibilité que nous avons envisagé. Cependant, bien que l'efficacité du tamoxifène soit connue il n'en demeure pas moins que l'utilisation de telles molécules est associée à des coûts financiers, de même qu'à la possibilité de variation dans le niveau de disponibilité de la molécule au site d'action, ou encore à la présence éventuelle d'effets secondaires confondants avec le phénomène étudié.

Finalement, le modèle ERKO double knock out (dERKO) est probablement le plus prometteur. Certains groupes [25, 136-138] ont obtenus beaucoup de succès avec le modèle dERKO comparativement aux modèles ERKO α et/ou ERKO β . La perte d'activité constitutive des deux isoformes du récepteur permet d'observer les conséquences d'une perte de fonctionnalité totale et non uniquement partielle des récepteurs aux oestrogènes. L'implication des récepteurs aux oestrogènes sur ces phénomènes est sans équivoque et dissipe le doute, présent chez ERKO α et ERKO β , relié à une compensation exercée par l'autre isoforme fonctionnelle du récepteur. Le temps requis à la génération d'une lignée double KO ne nous a pas permis d'obtenir cette lignée dans un laps de temps nécessaire à la réalisation de ce projet. Il pourrait cependant être intéressant dans le futur d'investiguer l'implication de l'oestrogène sur la repolarisation cardiaque chez ce modèle.

L'absence de différences dans la densité du courant calcique de type L en fonction du niveau de stimulation oestrogénique n'excluait pas la possibilité que cette modulation s'exprime plutôt au niveau de la cinétique d'activation et d'inactivation du canal. Les expériences qui ont été effectuées à ce sujet nous ont cependant permis de constater que la cinétique d'activation et d'inactivation n'étaient pas différentes selon le niveau de stimulation oestrogénique.

L'intérêt de poursuivre ce même type d'expérimentations chez le groupe mâle s'explique par le fait que les concentrations d'oestrogènes circulants y sont très faibles comparativement aux femelles. Cette réalité nous permettait d'étudier l'impact d'une réelle stimulation partielle par les oestrogènes. De plus, il semblait intéressant d'étudier le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque chez le mâle

afin de savoir quelle était la contribution du ratio androgène/oestrogène dans la modulation des courants ioniques constituant l'intervalle QT. Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude des canaux calciques nous ont permis de constater qu'une stimulation oestrogénique complète ou partielle ne semble pas interférer non plus chez le mâle sur la densité et la cinétique des courants calciques.

L'ensemble de nos expérimentations sur les paramètres électrophysiologiques *ex vivo* et *in vivo* de même que sur les canaux calciques nous ont permis d'en apprendre un peu plus sur le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque. En effet, la caractérisation de l'ensemble de ces paramètres chez un modèle de souris transgénique mâle et femelle pour lesquels la stimulation oestrogénique est complète, partielle ou nulle nous a permis de constater que la contribution de l'oestrogène est minimale dans la modulation de l'intervalle QTc à la puberté. Cependant, l'ensemble de nos expérimentations ont été effectuées en conditions physiologiques. Avec les nouvelles avancées sur le rôle cardioprotecteur des oestrogènes, il n'est pas exclu que son rôle soit beaucoup plus probant en conditions pathologiques.

5 Conclusion et perspectives

L'objectif premier de ce projet à l'approche multidisciplinaire était d'identifier le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque. L'ensemble des résultats obtenus ne permet pas d'affirmer que les oestrogènes exercent directement un impact sur les paramètres de la repolarisation cardiaque. Quoique décevants, ces résultats, lorsque inscrits dans une perspective plus globale confirment ce qui était largement suggéré dans la littérature; les oestrogènes sont, comparativement aux androgènes, probablement peu impliqués dans la modulation directe des paramètres de la repolarisation cardiaque à la puberté. Il n'était cependant pas exclu que la présence des oestrogènes contribue à conserver la valeur de l'intervalle QT chez la jeune fille. Cependant, nos travaux ont aussi infirmé cette hypothèse.

L'ensemble de nos travaux a été réalisé dans le but d'élucider le rôle des oestrogènes dans la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque en condition physiologique. Les connaissances concernant le rôle cardioprotecteur des oestrogènes augmentant très rapidement, il n'est cependant pas exclu que les oestrogènes soit plutôt impliqués dans la régulation des paramètres de la repolarisation cardiaque en condition pathologique. Peu d'études se sont à ce jour intéressées à cet aspect de la cardioprotection des oestrogènes exercé sur le myocarde. La majorité de l'attention est plutôt orientée vers l'aspect vasculaire de cette protection. Cette avenue est selon moi prometteuse et digne d'intérêt et nous permettra de comprendre un peu mieux la complexité des mécanismes de la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque.

6 Bibliographie

1. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaine*, ed. É.d.R. Pédagogique. 1999, Saint-Laurent. 1194.
2. Ling, S., P. Komesaroff, and K. Sudhir, *Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens*. Clin Sci (Lond), 2006. **111**(2): p. 107-18.
3. Long, J.R., et al., *Genetic polymorphisms in estrogen-metabolizing genes and breast cancer survival*. Pharmacogenet Genomics, 2007. **17**(5): p. 331-8.
4. Mueck, A.O. and H. Seeger, *Breast cancer: Are oestrogen metabolites carcinogenic?* Maturitas, 2007.
5. Carpenter, K.D. and K.S. Korach, *Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 361-73.
6. Mueller, S.O., et al., *Molecular determinants of the stereoselectivity of agonist activity of estrogen receptors (ER) alpha and beta*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12255-62.
7. Marino, M. and P. Ascenzi, *Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation*. IUBMB Life, 2006. **58**(12): p. 716-9.
8. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
9. Babiker, F.A., et al., *Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 709-19.
10. Couse, J.E., et al., *Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice*. Reprod Fertil Dev, 2001. **13**(4): p. 211-9.
11. Gaido, K.W., et al., *Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor alpha and beta, and androgen receptor: structure-activity studies*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(4): p. 852-8.
12. Ozers, M.S., et al., *Analysis of ligand-dependent recruitment of coactivator peptides to estrogen receptor using fluorescence polarization*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(1): p. 25-34.
13. Cowley, S.M. and M.G. Parker, *A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1-6): p. 165-75.
14. Hewitt, S.C. and K.S. Korach, *Estrogen receptors: structure, mechanisms and function*. Rev Endocr Metab Disord, 2002. **3**(3): p. 193-200.
15. Hall, J.M., D.P. McDonnell, and K.S. Korach, *Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(3): p. 469-86.
16. Sanchez, M., et al., *The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4830-40.
17. Mueller, S.O. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice*. Curr Opin Pharmacol, 2001. **1**(6): p. 613-9.

18. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 833-42.
19. O'Dowd, B.F., et al., *Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes*. Genomics, 1998. **47**(2): p. 310-3.
20. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
21. Ippolito, D.L., et al., *N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of G α hi*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32692-6.
22. Zaugg, M. and M.C. Schaub, *Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning*. J Muscle Res Cell Motil, 2003. **24**(2-3): p. 219-49.
23. Filardo, E.J. and P. Thomas, *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(8): p. 362-7.
24. Shughrue, P., et al., *The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Endocrinology, 1997. **138**(12): p. 5649-52.
25. Vidal, O., et al., *Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5474-9.
26. Hegele-Hartung, C., et al., *Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5129-34.
27. Dan, P., et al., *Epitope-dependent localization of estrogen receptor-alpha, but not -beta, in en face arterial endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(4): p. H1295-306.
28. Gustafsson, J.A., *What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(9): p. 479-85.
29. Ropero, A.B., et al., *Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(3): p. 496-510.
30. Filardo, E.J., et al., *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, 2006. **12**(21): p. 6359-66.
31. Brailoiu, E., et al., *Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system*. J Endocrinol, 2007. **193**(2): p. 311-21.
32. Das, S.K., et al., *Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12786-91.
33. Taniguchi, F., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression*. Faseb J, 2007. **21**(2): p. 586-95.

34. Cooke, P.S., et al., *Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Biol Reprod, 1998. **59**(3): p. 470-5.
35. Barrett-Connor, E., *Postmenopausal estrogen and heart disease*. Atherosclerosis, 1995. **118 Suppl**: p. S7-10.
36. Karas, R.H., et al., *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15133-6.
37. Krom, Y.D., et al., *Inhibition of neointima formation by local delivery of estrogen receptor alpha and beta specific agonists*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 217-26.
38. Meyer, R., et al., *Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat*. Exp Physiol, 1998. **83**(3): p. 305-21.
39. Liao, S., et al., *Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats*. Neurosci Lett, 2001. **297**(3): p. 159-62.
40. Cruz, M.N., et al., *Dilatory responses to estrogenic compounds in small femoral arteries of male and female estrogen receptor-beta knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H823-9.
41. Booth, E.A., N.R. Obeid, and B.R. Lucchesi, *Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H2039-47.
42. Wang, M., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2204-9.
43. Ohlsson, C., et al., *Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**(3): p. 640-5.
44. Pelzer, T., et al., *Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction*. Circulation, 2005. **111**(12): p. 1492-8.
45. Babiker, F.A., et al., *Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1524-30.
46. Babiker, F.A., et al., *17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 269-76.
47. Skavdahl, M., et al., *Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H469-76.
48. Gabel, S.A., et al., *Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(2): p. 289-97.
49. Iafrati, M.D., et al., *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice*. Nat Med, 1997. **3**(5): p. 545-8.
50. Karas, R.H., et al., *Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice*. Circ Res, 2001. **89**(6): p. 534-9.
51. Pare, G., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1087-92.

52. Strehlow, K., et al., *Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. 170-7.
53. Lippert, T.H., H. Seeger, and A.O. Mueck, *Estrogens and the cardiovascular system: role of estradiol metabolites in hormone replacement therapy*. *Climacteric*, 1998. **1**(4): p. 296-301.
54. Wong, J., et al., *Hormone replacement use, arterial distensibility, cardiac structure and circadian blood pressure profile in menopausal women*. *Blood Press*, 2005. **14**(1): p. 12-20.
55. Xu, Y., et al., *Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart*. *Cardiovasc Res*, 2003. **57**(2): p. 388-94.
56. Xu, Y., et al., *Estrogen improves cardiac recovery after ischemia/reperfusion by decreasing tumor necrosis factor-alpha*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(4): p. 836-44.
57. Zhang, L., M.C. Fishman, and P.L. Huang, *Estrogen mediates the protective effects of pregnancy and chorionic gonadotropin in a mouse model of vascular injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(9): p. 2059-65.
58. Zhai, P., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(5): p. H1640-7.
59. Prentice, R.L., et al., *Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial*. *Jama*, 2006. **295**(6): p. 629-42.
60. Prentice, R.L., et al., *Combined analysis of Women's Health Initiative observational and clinical trial data on postmenopausal hormone treatment and cardiovascular disease*. *Am J Epidemiol*, 2006. **163**(7): p. 589-99.
61. Rossouw, J.E., et al., *Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause*. *Jama*, 2007. **297**(13): p. 1465-77.
62. Simon, J.A., et al., *Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)*. *Circulation*, 2001. **103**(5): p. 638-42.
63. Hulley, S., et al., *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*, 1998. **280**(7): p. 605-13.
64. Grady, D., et al., *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics*. *Control Clin Trials*, 1998. **19**(4): p. 314-35.
65. Hendrix, S.L., et al., *Effects of conjugated equine estrogen on stroke in the Women's Health Initiative*. *Circulation*, 2006. **113**(20): p. 2425-34.
66. Leng, X.H., et al., *Effects of estrogen replacement therapies on mouse platelet function and glycoprotein VI levels*. *Circ Res*, 2005. **97**(5): p. 415-7.
67. Clark, J.H., *A critique of Women's Health Initiative Studies (2002-2006)*. *Nucl Recept Signal*, 2006. **4**: p. e023.
68. Ness, J., et al., *Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women after publication of the Women's Health Initiative Trial*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005. **60**(4): p. 460-2.

69. Patten, R.D. and R.H. Karas, *Estrogen replacement and cardiomyocyte protection*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(3): p. 69-75.
70. Pelzer, T., et al., *The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 604-12.
71. Ostrzenski, A. and K.M. Ostrzenska, *WHI clinical trial revisit: imprecise scientific methodology disqualifies the study's outcomes*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **193**(5): p. 1599-604; discussion 1605-6.
72. Couse, J.F., et al., *Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(11): p. 1441-54.
73. Kregel, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15677-82.
74. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.
75. Korach, K.S., *Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes*. J Soc Gynecol Investig, 2000. **7**(1 Suppl): p. S16-7.
76. Taylor, J.A., K.J. Lewis, and D.B. Lubahn, *Estrogen receptor mutations*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **145**(1-2): p. 61-6.
77. Guo, Y., et al., *Effect of estrogen deprivation on follicle/oocyte maturation and embryo development in mice*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(4): p. 498-502.
78. Abi-Gerges, N., et al., *Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes*. Fundam Clin Pharmacol, 2004. **18**(2): p. 139-51.
79. Schulze-Bahr, E., et al., *Gender differences in cardiac arrhythmias*. Herz, 2005. **30**(5): p. 390-400.
80. Peters, R.W. and M.R. Gold, *The influence of gender on arrhythmias*. Cardiol Rev, 2004. **12**(2): p. 97-105.
81. James, A.F., S.C. Choisy, and J.C. Hancox, *Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization*. Prog Biophys Mol Biol, 2005.
82. Roden, D.M. and P.M. Spooner, *Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. **10**(12): p. 1664-83.
83. London, B., *Cardiac Electrophysiology: From Cell to bedside*. 2004: Elsevier Inc. 433-443.
84. Mangoni, M.E., et al., *Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **90**(1-3): p. 38-63.
85. *The electrical system*. [web] 2007 [cited 2007 2007]; Available from: http://www.hrspatients.org/patients/the_normal_heart/electrical_system.asp.
86. Nerbonne, J.M. and R.S. Kass, *Molecular physiology of cardiac repolarization*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1205-53.

87. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 521-55.
88. Randall, A.D., *The molecular basis of voltage-gated Ca²⁺ channel diversity: is it time for T?* *J Membr Biol*, 1998. **161**(3): p. 207-13.
89. Shiels, H.A., et al., *Electrophysiological properties of the L-type Ca(2+) current in cardiomyocytes from bluefin tuna and Pacific mackerel*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **286**(4): p. R659-68.
90. Bers, D.M. and E. Perez-Reyes, *Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release*. *Cardiovasc Res*, 1999. **42**(2): p. 339-60.
91. Davare, M.A., et al., *A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2*. *Science*, 2001. **293**(5527): p. 98-101.
92. Kuo, C.C. and S. Yang, *Recovery from inactivation of t-type ca²⁺ channels in rat thalamic neurons*. *J Neurosci*, 2001. **21**(6): p. 1884-92.
93. Ferreira, G., E. Rios, and N. Reyes, *Two components of voltage-dependent inactivation in Ca(v)1.2 channels revealed by its gating currents*. *Biophys J*, 2003. **84**(6): p. 3662-78.
94. Findlay, I., *Voltage-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ currents in guinea-pig ventricular myocytes*. *J Physiol*, 2002. **545**(Pt 2): p. 389-97.
95. Pignier, C. and D. Potreau, *Characterization of nifedipine-resistant calcium current in neonatal rat ventricular cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(5): p. H2259-68.
96. Lacinova, L., *Voltage-dependent calcium channels*. *Gen Physiol Biophys*, 2005. **24 Suppl 1**: p. 1-78.
97. Linz, K.W. and R. Meyer, *Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes*. *J Physiol*, 1998. **513** (Pt 2): p. 425-42.
98. Mori, Y., et al., *Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel*. *Nature*, 1991. **350**(6317): p. 398-402.
99. Mueller, E.E., S.A. Grandy, and S.E. Howlett, *Protein kinase A-mediated phosphorylation contributes to enhanced contraction observed in mice that overexpress beta-adrenergic receptor kinase-1*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **319**(3): p. 1307-16.
100. Akita, T., et al., *Developmental changes in modulation of calcium currents of rabbit ventricular cells by phosphodiesterase inhibitors*. *Circulation*, 1994. **90**(1): p. 469-78.
101. Venetucci, L.A., A.W. Trafford, and D.A. Eisner, *Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required*. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 105-11.
102. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
103. Mahony, L., *Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart*. *Cardiovasc Res*, 1996. **31 Spec No**: p. E61-7.

104. Callow, A.D., *Cardiovascular disease 2005--the global picture*. *Vascul Pharmacol*, 2006. **45**(5): p. 302-7.
105. Cho, J.J., et al., *The nongenomic protective effects of estrogen on the male cardiovascular system: clinical and therapeutic implications in aging men*. *Med Sci Monit*, 2003. **9**(3): p. RA63-8.
106. Dash, R., et al., *Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(7): p. 1345-53.
107. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats*. *J Appl Physiol*, 2005. **99**(4): p. 1378-83.
108. Grohe, C., et al., *Modulation of hypertensive heart disease by estrogen*. *Steroids*, 1996. **61**(4): p. 201-4.
109. Liuba, I., et al., *Gender-related differences in patients with atrioventricular nodal reentry tachycardia*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(3): p. 384-8.
110. Oberman, A., et al., *Prevalence and determinants of electrocardiographic left ventricular hypertrophy among a multiethnic population of postmenopausal women (The Women's Health Initiative)*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(4): p. 512-9.
111. Pilote, L., et al., *A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease*. *Cmaj*, 2007. **176**(6): p. S1-44.
112. Schonfelder, G., *The biological impact of estrogens on gender differences in congestive heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2005. **67**(4): p. 573-4.
113. Vizgirda, V.M., et al., *Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **282**(1): p. H256-63.
114. Bidoggia, H., et al., *Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone*. *Am Heart J*, 2000. **140**(4): p. 678-83.
115. Saba, S., et al., *Cardiac autonomic modulation by estrogen in female mice undergoing ambulatory monitoring and in vivo electrophysiologic testing*. *Ann Noninvasive Electrocardiol*, 2004. **9**(2): p. 142-8.
116. Verkerk, A.O., et al., *Cellular basis of sex disparities in human cardiac electrophysiology*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006. **187**(4): p. 459-77.
117. Verkerk, A.O., et al., *Gender disparities in cardiac cellular electrophysiology and arrhythmia susceptibility in human failing ventricular myocytes*. *Int Heart J*, 2005. **46**(6): p. 1105-18.
118. Rodriguez, I., et al., *Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle*. *Jama*, 2001. **285**(10): p. 1322-6.
119. Eskes, T. and C. Haanen, *Why do women live longer than men?* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007.
120. Huxley, V.H., *Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently*. *Adv Physiol Educ*, 2007. **31**(1): p. 17-22.
121. Korte, T., et al., *Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction*. *Circulation*, 2005. **111**(18): p. 2282-90.

122. Ling, S., et al., *Endogenous estrogen deficiency reduces proliferation and enhances apoptosis-related death in vascular smooth muscle cells: insights from the aromatase-knockout mouse*. *Circulation*, 2004. **109**(4): p. 537-43.
123. Brouillette, J., et al., *Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(1): p. 148-57.
124. Brouillette, J., V. Trepanier-Boulay, and C. Fiset, *Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization*. *J Physiol*, 2003. **546**(Pt 2): p. 403-13.
125. Trepanier-Boulay, V., et al., *Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle*. *Circ Res*, 2001. **89**(5): p. 437-44.
126. Balasubramaniam, R., et al., *Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1*. *J Physiol*, 2003. **552**(Pt 2): p. 535-46.
127. Gilmour, R.F., *Life out of balance: the sympathetic nervous system and cardiac arrhythmias*. *Cardiovasc Res*, 2001. **51**(4): p. 625-6.
128. Johnson, B.D., et al., *Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice*. *J Gen Physiol*, 1997. **110**(2): p. 135-40.
129. Ritchie, A.K., *Estrogen increases low voltage-activated calcium current density in GH3 anterior pituitary cells*. *Endocrinology*, 1993. **132**(4): p. 1621-9.
130. Protas, L., et al., *Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac ICa,L*. *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 972-9.
131. Saponara, S., G. Sgaragli, and F. Fusi, *Quercetin as a novel activator of L-type Ca(2+) channels in rat tail artery smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(7): p. 1819-27.
132. Osaka, T. and R.W. Joyner, *Developmental changes in calcium currents of rabbit ventricular cells*. *Circ Res*, 1991. **68**(3): p. 788-96.
133. Osaka, T. and R.W. Joyner, *Developmental changes in the beta-adrenergic modulation of calcium currents in rabbit ventricular cells*. *Circ Res*, 1992. **70**(1): p. 104-15.
134. Mewes, T. and U. Ravens, *L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. **26**(10): p. 1307-20.
135. Maltsev, V.A., et al., *Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ current in the early stages of cardiomyocyte development*. *Circ Res*, 1999. **84**(2): p. 136-45.
136. Erlandsson, M.C., et al., *Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus*. *Immunology*, 2001. **103**(1): p. 17-25.
137. Lindberg, M.K., et al., *Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice*. *J Endocrinol*, 2002. **174**(2): p. 167-78.
138. Liang, M., et al., *Combined lack of estrogen receptors alpha and beta affects vascular iNOS protein expression*. *Cell Tissue Res*, 2003. **313**(1): p. 63-70.