

2M11.3267.8

Université de Montréal

**Action vasorelaxante du  $17\beta$ -œstradiol, implication du  
monoxyde d'azote et des récepteurs aux oestrogènes**

par

Pierre-André Scott

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Août, 2004

© Pierre-André Scott, 2004



W

4

U58

2005

V. 047

## **AVIS**

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

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

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

## **NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Action vasorelaxante du  $17\beta$ -œstradiol, implication du  
monoxyde d'azote et des récepteurs aux oestrogènes

présenté par :

Pierre-André Scott

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing, président-rapporteur  
Jean St-Louis, directeur de recherche  
André Tremblay, codirecteur de recherche  
Jolanta Gutkowska, membre du jury

## Résumé

La vascularisation utérine joue un rôle important pendant la gestation, assurant une perfusion adéquate des unités fœto-placentaires. Durant la gestation le flot sanguin de la vasculature utérine est considérablement augmenté et les artères sont l'objet d'un remodelage vasculaire qui se caractérise par une hyperplasie et une hypertrophie de tous les éléments de la paroi. Nous avons observé sur des artères utérines dépourvues d'endothélium et préstimulées avec la phényléphrine, que l'effet vasorelaxant du  $17\beta$ -œstradiol ( $E_2$ ) était plus grand chez les rates non gestantes que gestantes. De plus, cette plus grande relaxation est bloquée par le L-NAME, inhibiteur des synthases de monoxyde d'azote (NOS). Nous avons émis l'hypothèse que l'effet vasorelaxant aigu des œstrogènes dans les artères utérines est en partie médié par une NOS musculaire présente surtout chez les non gestantes et que l'activation de cette enzyme est dépendante des récepteurs aux œstrogènes.

Chez des rates gestantes et non gestantes, nous avons évalué l'expression des récepteurs aux œstrogènes et des NOS en relation avec l'effet vasorelaxant des œstrogènes dans la circulation utérine de rates non gestantes et gestantes.

Au 22<sup>e</sup> jour de gestation, l'expression de eNOS est augmentée dans la vasculature utérine comparativement à la rate non gestante. La iNOS n'est pas présente dans ces vaisseaux, alors que l'expression de nNOS est diminuée en fin de gestation. D'autre part, nous avons observé que l'expression de  $ER\beta$  est diminuée dans la vasculature utérine en fin de gestation, tandis que celle de  $ER\alpha$  est inchangée. Le  $17\beta$ - $E_2$  et le  $17\alpha$ - $E_2$  sont tous deux capable d'induire une relaxation rapide des artères utérines, mais le  $17\alpha$ - $E_2$  amène un effet moindre. Le ICI182,780, un antagoniste des récepteurs  $ER\alpha$  et  $ER\beta$ , ne bloque pas la relaxation rapide du  $17\beta$ - $E_2$  et du  $17\alpha$ - $E_2$ .

Les résultats obtenues suggèrent que l'effet vasorelaxant de l'œstrogène sur le muscle lisse vasculaire des artères utérines serait en partie médié par le NO (nNOS) et passerait par une voie indépendante des récepteurs classiques aux œstrogènes, mais qui possède néanmoins une certaine stéréospécificité.

**Mots-clés :** Grossesse, œstrogènes, synthases monoxyde d'azote, artère utérine, remodelage vasculaire, rat

## Abstract

Uterine vasculature plays an important role during pregnancy, allowing adequate perfusion of the maternal-foetal interface. To achieve this goal, substantial remodelling of uterine vasculature occurs. We have previously observed that, in uterine arcuate arteries, denuded of endothelium and prestimulated with phenylephrine, the vasorelaxation to  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) was larger in tissues of non-pregnant than of pregnant rats. This larger relaxation to  $17\beta$ - $E_2$  was inhibited when arteries were incubated in the presence of L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor (NOS). This suggests that this larger vasorelaxation to  $17\beta$ - $E_2$  observed on non-pregnant rats is dependent on muscular nitric oxide (NO).

Our objectives was to evaluate the expression of estrogen receptors ( $ER\alpha$  and  $ER\beta$ ) and NOSs in relation with the vasorelaxant effects of estrogens in uterine circulation of non-pregnant and pregnant rats. We measured the *ex vivo* response to  $17\beta$ - $E_2$  and  $17\alpha$ - $E_2$  of uterine artery segments in wire myographs in presence and absence of ICI182,780. Estrogen receptors ( $ER\alpha$  and  $ER\beta$ ) and NOS expression were evaluated by Western blot.

Just before parturition, eNOS expression was increased in the uterine vasculature of pregnant compared to non pregnant rats. iNOS was undetectable in those vessels and nNOS expression was down-regulated during pregnancy.  $ER\alpha$  expression was unchanged by gestation but  $ER\beta$  expression was decreased during pregnancy. Both  $17\beta$ - $E_2$  and  $17\alpha$ - $E_2$  induced relaxations of the uterine artery, but  $17\alpha$ - $E_2$  produced smaller responses. ICI 182,780, an estrogen receptor antagonist, did not block the acute relaxation to  $17\beta$ - $E_2$  and  $17\alpha$ - $E_2$ .

Our results led us to suggest that the acute vasorelaxant effects of estrogen on uterine artery is mediated by one or more signalling pathways not dependent on estrogen receptors, but showing stereospecificity and part of this effect is mediated by NO that is produced by nNOS in the smooth muscle cells.

**Keywords:** Pregnancy, estrogens, nitric oxide synthase, uterine artery, vascular remodelling, rat

## Liste des abréviations

ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AngII	: Angiotensine II
BH <sub>4</sub>	: Tétrahydrobioptérine
BK <sub>Ca</sub>	: Canaux potassiques de grande conductance activés par le potentiel et le calcium
BSA	: Albumine de sérum bovin
CMLV	: Cellule musculaire lisse vasculaire
CGRP	: Peptide associé au gène de la calcitonine
DHEA-S	: Sulfate de déhydroépiandrostérone
E <sub>2</sub>	: Œstradiol
eNOS	: Synthase de monoxyde d'azote endothéliale
ER	: Récepteur aux œstrogènes
ERE	: Élément de réponse aux œstrogènes
ER $\alpha$ KO	: Inactivation du gène ER $\alpha$ chez la souris
ER $\beta$ KO	: Inactivation du gène ER $\beta$ chez la souris
ER $\alpha\beta$ KO	: Inactivation des gènes ER $\alpha$ et ER $\beta$ chez la souris
FAD	: Flavine-adénine dinucléotide
FMN	: Flavine mononucléotide
FSH	: Hormone folliculostimulante
G	: Gestante
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase
GMPc	: Guanosine monophosphate cyclique
GTP	: Guanosine triphosphate
hCG	: Gonadotrophine chorionique humaine
HHS	: Hypothalamo-hypophysaire surrénalien
Hsp	: Protéine de choc thermique
iNOS	: Synthase de monoxyde d'azote inductible
KBS	: Solution Krebs bicarbonate
LH	: Hormone lutéinisante
L-NAME	: L-Nitroarginine méthylester

L-NMMA	: L-monométhyl arginine citrate
L-NNA	: N-nitroso-L-arginine
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit
NG	: Non gestantes
NO	: Monoxyde d'azote
nNOS	: Synthase de monoxyde d'azote neuronale
NOS	: Synthase de monoxyde d'azote
RCIU	: Restriction de croissance intra-utérine
RT-PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une transcription inverse
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS
SERM	: Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes
SRAA	: Système rénine-angiotensine-aldostérone
TNF	: Facteur de nécrose tumoral



## Table des matières

1. Introduction .....	12
1.1 Composantes hémodynamiques de la grossesse .....	12
1.1.1 Grossesse normale.....	12
1.1.1.1 Modifications hormonales.....	12
1.1.1.2 Modifications cardiovasculaires.....	15
1.1.2 La vasculature utérine .....	17
1.1.2.1 Structure des vaisseaux .....	17
1.1.2.2 Modifications des vaisseaux utérins durant la gestation .....	19
1.1.3 Pathologies de la grossesse et circulation utérine .....	21
1.1.3.1 Modèles animaux et circulation utérine .....	23
1.2 L'œstrogène et les hormones sexuelles.....	25
1.2.1 Implications durant la grossesse .....	25
1.2.2 Modes d'action sur les vaisseaux sanguins.....	26
1.2.2.1 Les effets génomiques.....	27
1.2.2.2 Les effets non génomiques.....	29
1.2.3 Les récepteurs des œstrogènes .....	32
1.2.3.1 Les antiœstrogènes et antagonistes des ERs .....	35
1.3 Monoxyde d'azote et ses synthases .....	36
1.3.1 La chimie des NOS .....	37
1.3.2 Les isoformes de NOS .....	38
1.3.3 Les agents pharmacologiques .....	39
1.3.4 Implications durant la grossesse .....	39
1.4 Objectif et Hypothèse de travail.....	41
2. Matériels et méthodes : .....	42
3. Résultats .....	48
4. Discussion .....	56
5. Conclusion .....	61
6. Perspectives : .....	62
6. Bibliographie.....	64

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Pathologies hypertensives de la grossesse et les observations cliniques associées. ( <i>Adapté de Gabbe</i> ) [25].....	22
<b>Tableau 2</b> : Les amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR des récepteurs aux œstrogènes.....	43

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Comparaison des changements hémodynamiques qui surviennent chez la femme et chez le rat. La zone bleutée correspond à la période de similitude entre les 2 espèces, soit le 2 <sup>e</sup> trimestre chez la femme et la 3 <sup>e</sup> semaine chez la rate. ( <i>tiré d'Annie Beauséjour</i> )[18] .....	15
<b>Figure 2</b> : Structure comparée des vaisseaux sanguins. ( <i>tiré de Tortora</i> )[33] .....	18
<b>Figure 3</b> : Approvisionnement sanguin à l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires ( <i>Traduit de Gabbe</i> )[25] .....	20
<b>Figure 4</b> : Organes et vaisseaux urogénitaux chez la rate. ( <i>Adapté de Chiasson</i> )[37] .....	20
<b>Figure 5</b> : Les effets directs (génomiques et non génomiques) de l'œstrogène sur les vaisseaux sanguins. ( <i>Adapté de Mendelsohn et coll.</i> )[64] .....	27
<b>Figure 6</b> : Classification de l'action non génomiques des stéroïdes statué à Mannheim, Allemagne en 1998. ( <i>Adapté de Falkenstein et coll</i> )[69] .....	29
<b>Figure 7</b> : Courbes de relaxation pour le $17\beta$ -E <sub>2</sub> dans des artères utérines arquées chez des rates gestantes et non gestantes avec ou sans L-NAME (n = 6) ( <i>Lapointe P., Sicotte B., St-Louis J., 2001, non-publié</i> ) .....	32
<b>Figure 8</b> : Structure des récepteurs $\alpha$ et $\beta$ aux œstrogènes chez l'humain. ( <i>Traduit de Mendelsohn et coll</i> )[64] .....	33
<b>Figure 9</b> : Différents composés œstrogéniques et anti-œstrogéniques.....	36
<b>Figure 10</b> : Représentation de la réaction générale d'oxydation de la L-Arginine pour produire du NO et de la L-Citrulline. ( <i>Cayman chemical, MI; USA</i> ) .....	37
<b>Figure 11</b> : Réaction globale de la synthèse du NO par les synthases de monoxyde d'azote sous forme de dimère. DR= domaine réductase DO= domaine oxygénase ( <i>adapté de Alderton W.K.</i> )[115] .....	38
<b>Figure 12</b> : Système de myographe à microvaisseaux ( <i>schéma de Sicotte B.</i> ) .....	45

- Figure 13 :** Représentation schématique d'un segment d'artère monté sur deux fils de tungstène. Les différentes variables nécessaires au calcul de la circonférence interne du vaisseau sont représenté. (schéma de Sicotte B.)..... 46
- Figure 14 :** Diamètre de l'artère utérine principale chez la rate non gestante et gestante. .... 48
- Figure 15 :** Expression par RT-PCR de l'ARN messager des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) dans les vaisseaux utérins de rates gestantes (G) et non gestantes (NG) a) et c) : exemple de rt-pcr avec 2 animaux pour chaque groupe b) et d) : comparaison entre G et NG de la quantification relative de ER $\alpha$  et ER $\beta$  respectivement. (n = 6)... 49
- Figure 16 :** Expression protéique des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) dans les vaisseaux utérins de rates gestantes (G) et non gestantes (NG). Immunobuvardages représentatifs avec cinq animaux différents dans chaque groupe. Ces résultats ont été quantifiés et compilés avec d'autres immunobuvardages pour comparer entre les deux groupes (n = 10). .... 50
- Figure 17 :** Courbes de relaxation du 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> et du 17 $\alpha$ -E<sub>2</sub> dans des artères utérines principales contractées avec de la phényléphrine (1 $\mu$ mol/L) chez des rates gestantes (G) et non gestantes (NG) (n = 10) ..... 52
- Figure 18 :** Courbes de relaxation du 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> et du 17 $\alpha$ -E<sub>2</sub> dans des artères utérines principales contractées avec de la phényléphrine (1 $\mu$ mol/L) et préincubées avec du ICI 182,780 (20 $\mu$ M) chez des rates gestantes et non gestantes (n = 10)..... 53
- Figure 19 :** Expression protéique des différentes NOS dans les vaisseaux utérins et mésentériques de rates gestantes (G) et non gestantes (NG). a : (n = 4) b,c,d,e,f : (n = 5) ..... 54
- Figure 20 :** Perspectives qui découlent de cette étude. Différentes voies d'action de l'œstrogène dans les CMLV des artères utérines chez la rate qui devront être étudié ultérieurement. .... 63

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents, Nicole et Jean-Pierre, pour tout ce que vous m'avez apporté et Dieu sait que c'est beaucoup. C'est grâce à vous si je suis devenu ce que je suis et ce que je serai demain. Je remercie mon frère et meilleur ami, Jean-David, pour les nombreux coups de main.

Un merci tout spécial à ma copine Caroline, pour sa patience, ses encouragements et son magnifique sourire. Merci Benoit Bessette, confrère depuis le secondaire et éternel coéquipier de laboratoire.

Je tiens à remercier Jean qui a été un excellent mentor et qui m'a aidé, sans compter, à faire mes premières armes dans le monde de la recherche scientifique. Merci à André et Michèle, pour les nombreux conseils et pour le « troubleshooting ».

Je remercie Benoit Sicotte pour sa patience et son humour!! Merci à Karine, Annie, Marie-Claude et toutes les filles du 1726 pour votre amitié et pour avoir agrémente tous ces jours au laboratoire. Finalement, merci à toi Georges.

## 1. Introduction

La grossesse amène des changements physiologiques extrêmement complexes et spectaculaires. Les sections suivantes feront un survol des changements hémodynamiques de la grossesse et de la prééclampsie. En second lieu, nous regarderons l'implication des œstrogènes et des synthèses de monoxydes d'azote durant la gestation.

### 1.1 Composantes hémodynamiques de la grossesse

#### 1.1.1 Grossesse normale

Chez la femme, une grossesse normale amène d'innombrables changements tant morphologiques que biologiques. Le corps de la femme se modifie pour permettre au fœtus de poursuivre un développement normal. Plus particulièrement au niveau hémodynamique, il y a un bouleversement important des systèmes régulateurs. La plupart de ces ajustements physiologiques surviennent précocement au cours de la grossesse, bien avant que les besoins du fœtus soient substantiels. Ce qui fait de la gestation une condition unique et exceptionnelle, c'est que tous les changements physiologiques, en particulier les changements cardiovasculaires, sont réversibles au *post-partum*. La durée de gestation varie selon l'espèce. La grossesse chez la femme dure en moyenne 40 semaines, mais elle peut par exemple être d'environ 22 mois chez l'éléphant comme elle peut être de seulement 22-23 jours chez le rat. Dans tous les cas, la gestation amène la naissance d'un, ou des, rejetons dont l'organogenèse est terminée, mais dont le développement a atteint un stade différent selon l'espèce.

##### 1.1.1.1 Modifications hormonales

###### Chez la femme :

Les hormones stéroïdiennes sont dérivées du cholestérol et synthétisées dans les surrénales, les ovaires, les testicules et le placenta. La gestation amène d'énormes bouleversements au niveau hormonal chez la femme. Les œstrogènes, les progestagènes et les adrénocorticoïdes sont sécrétés abondamment dans la circulation maternelle et fœtale.

L'origine des œstrogènes varie au cours de la gestation et selon les besoins. Il existe trois types d'œstrogènes présents durant la grossesse : l'œstradiol, l'œstriol et l'œstrone. L'œstradiol provient presque exclusivement des ovaires maternels pour les 6 premières semaines de gestation[1]. Par la suite, le placenta prend la relève et sécrète de grandes quantités d'œstradiol converti à partir du DHEA-S (déhydroépiandrostérone sulfate) fœtal circulant. Le DHEA-S est un stéroïde produit en grande partie par les surrénales. Après le premier trimestre, le placenta devient la principale source d'œstradiol circulant. Durant la phase folliculaire du cycle menstruel la concentration d'œstradiol est moins de 0,1ng/mL et atteint un maximum de 0,4ng/mL durant la phase lutéale [2]. Suivant la conception les taux sériques d'œstradiol croissent pour atteindre une concentration de 6 à 30 ng/mL à terme[3]. Le profil de l'œstrone est relativement semblable. La source de production de l'œstrone est sensiblement la même que l'œstradiol. Les ovaires maternels sont la principale source pour les premières 4 à 6 semaines de gestation et par la suite c'est le placenta qui prend le relais pour le restant de la gestation. La concentration normale d'œstrone durant la phase folliculaire du cycle chez la femme est de 0,1ng/mL. Suivant la conception la concentration reste à des niveaux de la phase lutéale jusqu'à la 6e ou 10e semaine. Par la suite, la concentration augmente graduellement pour atteindre de 2 à 30 ng/mL à terme[4]. Finalement, l'œstriol est quasi indétectable durant le cycle menstruel normal, car elle a une concentration de moins de 0,01ng/mL. L'œstriol provient presque uniquement du placenta par la conversion du 16 $\alpha$ -OH-DHEA-S fœtal [5]. Les taux sériques d'œstriol chez la mère commencent à être détectables à 9 semaines de gestation avec une concentration de 0,05ng/mL. À terme, l'œstriol atteint une concentration entre 10 et 30 ng/mL. Cette observation corrèle directement avec l'évolution stéroïdogénique du cortex de la surrénale du fœtus qui produit les précurseurs dont le 16 $\alpha$ -OH-DHEA-S[1].

Une autre classe d'hormones impliquée dans la gestation c'est les progestagènes. Cette catégorie d'hormones est représentée majoritairement durant la grossesse par la progestérone et le 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone. La progestérone est présente à une concentration de moins de 1ng/mL durant la phase folliculaire et graduellement tout au long de la gestation les taux sériques de progestérone augmentent pour atteindre un maximum de 100-300 ng/mL à terme.[1] D'abord, la progestérone est synthétisée par le corps jaune avant la 6<sup>e</sup> semaine de gestation et le placenta prend la relève à partir de la 7<sup>e</sup> semaine. À la 12<sup>e</sup> semaine, le placenta devient la principale source de progestérone. La

17 $\alpha$ -hydroprogestérone provient elle aussi du corps jaune durant le premier trimestre, mais les ovaires continuent d'être une source importante de 17 $\alpha$ -hydroprogestérone durant toute la grossesse. Cependant, une fois parvenu au troisième trimestre le placenta utilise des précurseurs provenant du fœtus pour sécréter des quantités croissantes de 17 $\alpha$ -hydroprogestérone [6].

Il y a plusieurs autres hormones impliquées au cours de la grossesse. Dès le 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jour de grossesse, les syncytiotrophoblastes de blastocystes produisent la gonadotrophine chorionique (hCG) qui stimule le corps jaune et prolonge sa durée de vie pour la production de progestérone et d'œstrogènes. Lorsque le placenta est pleinement fonctionnel, la sécrétion d'hCG diminue.

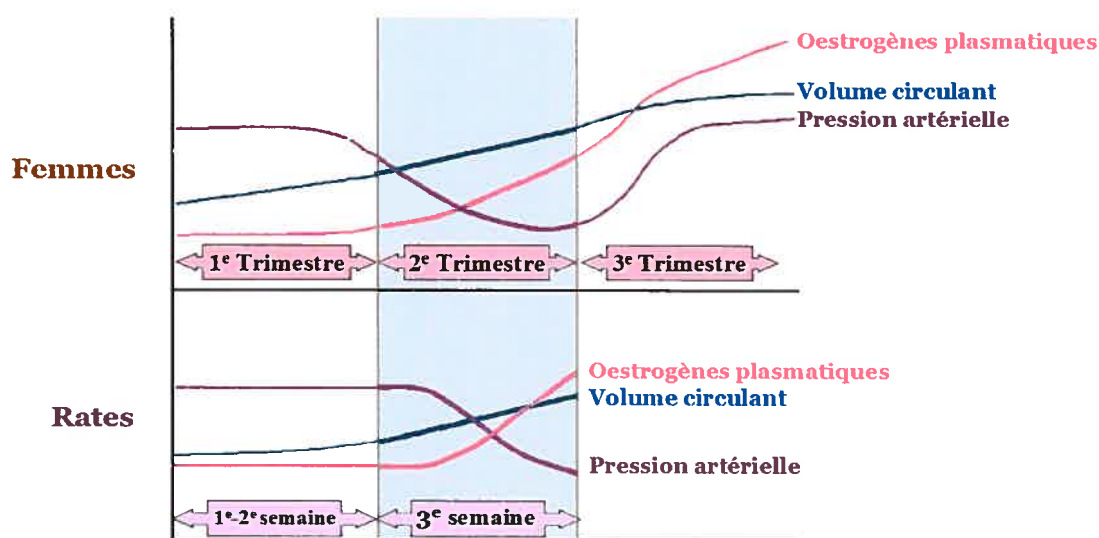
#### **Chez le rat :**

La littérature est beaucoup moins exhaustive quant aux modifications hormonales qui surviennent durant la gestation chez le rat. Il a été démontré que la concentration de progestérone est d'environ 5ng/mL en début de gestation et elle atteint un maximum (35ng/mL) au milieu de la gestation (jours 12-13) pour retourner au niveau de départ avant la parturition. L'œstrogène (œstradiol) augmente graduellement tout au long de la gestation avec une concentration d'environ 10 à 50 pg/mL au 22<sup>ième</sup> jour [7;8](Fig. 1). En revanche, une autre étude plus récente n'a pas constaté d'augmentation de la concentration d'œstradiol durant la gestation chez le rat [9]. Cette observation est surprenante, mais les auteurs ne nous éclairent pas sur cette observation puisqu'ils n'ont pas tenté de l'expliquer. D'autre part, il semble que la production de progestérone par le corps jaune soit nécessaire chez le rat. Contrairement à l'humain, le placenta ne serait pas en mesure de produire suffisamment de progestérone pour le maintien de la gestation [10]. Il a aussi été démontré que la production croissante d'œstrogène ainsi que le pic œstrogénique avant parturition serait eux aussi dépendants des ovaires maternels tout au long de la gestation [11].

La relaxine est une hormone sécrétée durant la gestation qui possède un rôle mitigé. Il s'agit d'une hormone peptidique d'environ 6 kDa qui a une structure semblable à l'insuline. Sa composition en acides aminés et la taille de sa chaîne peptidique varient considérablement selon l'espèce. Chez la femme, la relaxine devient détectable dans le sang entre la 7<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> semaine et les concentrations plasmatiques maximales surviennent avant



parturition. Par contre, il semble que l'absence de cette hormone n'ait pas de conséquence sur le déroulement d'une grossesse normale [12]. En effet, on rapporte que des femmes enceintes grâce à un don d'ovule peuvent se rendre à terme[13] malgré qu'aucune concentration de relaxine ne soit détectable[14]. Cependant, la relaxine est importante chez les espèces non-primates. Par exemple chez la rate, la relaxine permet la croissance du myomètre et de l'endomètre, une diminution de la fréquence des contractions[15] ainsi que le ramollissement du col utérin qui facilite l'accouchement[16] et le développement des mamelons [17].



**Figure 1** : Comparaison des changements hémodynamiques qui surviennent chez la femme et chez le rat. La zone bleutée correspond à la période de similitude entre les 2 espèces, soit le 2<sup>e</sup> trimestre chez la femme et la 3<sup>e</sup> semaine chez la rate. (tiré d'Annie Beauséjour)[18]

### 1.1.1.2 Modifications cardiovasculaires

Une adaptation cardiovasculaire importante durant la grossesse est sans contredit l'augmentation d'environ 50% du débit cardiaque. Dès la dixième semaine, le débit cardiaque a augmenté de 1,5L/min et va atteindre un débit moyen de 6L/min à terme [19]. L'installation précoce d'une vasodilatation artérielle au tout début de la grossesse est possiblement à l'origine de l'augmentation du débit cardiaque. La majorité de cette augmentation est dirigée vers l'utérus, le placenta et les seins. Lors du premier trimestre chez la femme l'utérus reçoit 2 à 3% du débit cardiaque pour atteindre 17% (450 à 650 mL/min) juste avant terme [20]. Cette augmentation importante de perfusion utérine est

nécessaire pour subvenir aux besoins nutritionnels et pour l'élimination des déchets métaboliques du fœtus. La fréquence cardiaque est augmentée de 15 à 20 battements par minute au repos lors de la grossesse et peut l'être encore plus lors de grossesses multiples.

On observe aussi durant la gestation une augmentation du volume sanguin circulant. Cette expansion peut atteindre jusqu'à 40% du volume sanguin initial (1,6 L) et ce, à partir de la 30<sup>e</sup> semaine de grossesse[21]. Chez la rate aussi on constate cette augmentation de volémie, d'environ 20% au début de la troisième semaine, pour ensuite atteindre 40% avant la mise bas[22;23]. Cette augmentation de volume a pour but, ici aussi, d'augmenter l'apport sanguin au niveau utéro-placentaire. En réponse à cette augmentation de volume circulant, il a été observé chez la femme un accroissement de la dimension du ventricule gauche en fin de diastole. Ceci est observé à partir du premier trimestre et s'accroît jusqu'à terme et est accompagné d'un épaississement de la paroi du ventricule qui se définit comme une hypertrophie modérée du myocarde. Ces changements structuraux du cœur s'apparentent à ceux observés en réponse à l'entraînement physique[24]. De même, le diamètre de l'oreillette gauche et droite augmente tôt dans le processus gestationnel pour atteindre un maximum à la 30<sup>e</sup> semaine. Ce remodelage serait aussi occasionné par l'augmentation du volume sanguin ce qui suggère une augmentation de la précharge[25].

Malgré cette augmentation du débit cardiaque, on observe une diminution de la pression artérielle. Cette situation est présente chez la femme[26] et chez la rate[27], mais à des périodes différentes chez les deux espèces. En fait chez la rate, la chute de pression s'amorce au milieu de la dernière semaine de gestation sur un total de trois. Tandis que chez la femme cette chute de pression survient au début du 2<sup>ème</sup> trimestre, soit entre la 8-12<sup>ème</sup> semaine pour ensuite amorcer une ascension aux alentours de la 32-34<sup>ème</sup> semaine jusqu'à parturition [28](Fig. 1). En fait, normalement la pression artérielle diminue durant la grossesse et revient graduellement au niveau auquel elle était avant le début de celle-ci[29].

De plus, la gestation est associée à une réduction de réactivité des vaisseaux sanguins. Il a été démontré que la réponse vasculaire *in vivo* et *in vitro* sur des artères systémiques (aorte, mésentérique, etc.) aux agents vasopresseurs comme l'angiotensine II (AngII), la vasopressine et la phényléphrine est diminuée chez les rates gestantes [30]. Ce phénomène a d'abord été décrit chez la femme [31] et est appelé la résistance de la

gestation aux effets des vasoconstricteurs. Cette résistance serait un facteur déterminant de la chute de résistance périphérique, elle-même liée à la diminution de pression artérielle durant la grossesse [32]. Tous ces changements ont comme principale fonction d'assurer un apport sanguin adéquat au fœtus, tout au long de son séjour intra-utérin, pour subvenir aux besoins indispensables à son développement.

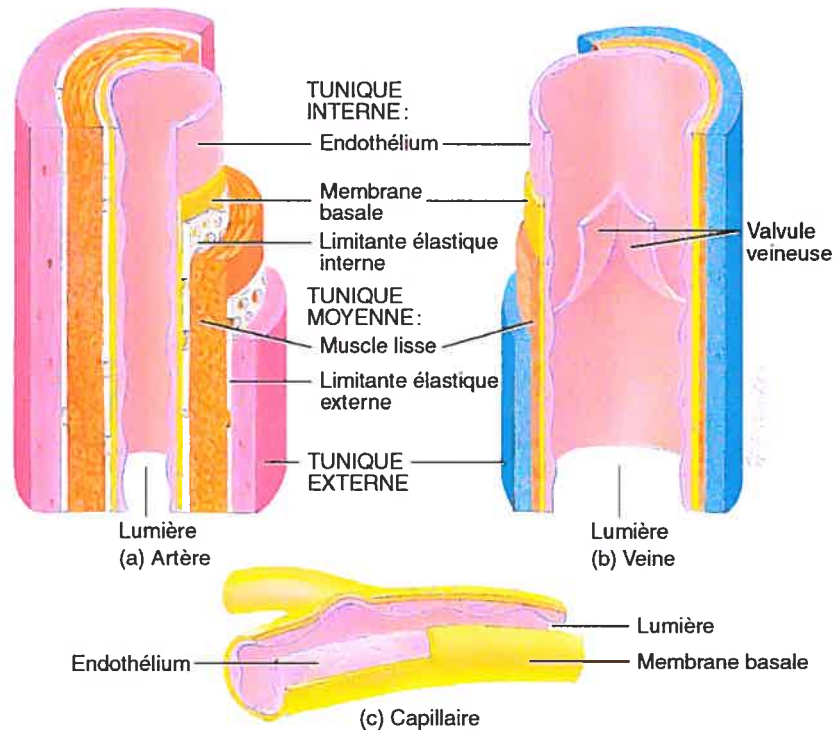
## **1.1.2 La vasculature utérine**

### **1.1.2.1 Structure des vaisseaux**

Les vaisseaux sanguins font partie d'un étonnant système de canalisation dynamique pour acheminer et contrôler le sang aux organes et tissus cibles. Les artères transportent le sang du cœur aux tissus et sont les vaisseaux les plus actifs pour contrôler l'hémodynamique. La paroi d'une artère est composée de trois revêtements principaux soit : la tunique interne, la tunique moyenne et la tunique externe. (Fig.2) La tunique interne, aussi appelé intima, est constituée d'un épithélium simple pavimenteux nommé endothélium, d'une membrane basale ainsi qu'une couche de tissu élastique appelé la limitant élastique interne. Tous les tissus élastiques des vaisseaux sanguins sont composés de fibres d'élastine entourées de plusieurs autres protéines comme la fibrilline essentielle à leur stabilité. Ces fibres élastiques peuvent s'étirer jusqu'à 150% de leur longueur et reprendre leur forme initiale. La deuxième couche est la tunique moyenne qui est composée de fibres élastiques et de myocytes formant le muscle lisse. La tunique externe est principalement constituée de fibre élastique et de fibres de collagène qui amènent un élément de rigidité aux vaisseaux sanguins. La fonction des vaisseaux sanguins diffère dépendant de leur localisation. De même, la proportion des différents éléments décrits ci-dessus se modifie selon le calibre et la fonction du vaisseau.

Bien que les veines soient essentiellement constituées des trois mêmes tuniques que les artères, l'épaisseur relative de chaque couche diffère. Les veines ont une très mince tunique interne et moyenne, mais ont une très épaisse tunique externe avec des fibres de collagène et des fibres élastiques. De nombreuses veines possèdent des valvules veineuses qui sont des minces replis de la tunique interne qui empêche la circulation rétrograde du sang. Le retour veineux, soit le volume de sang qui revient au cœur à partir des veines systémiques, dépend de deux choses. Premièrement, du gradient de pression entre les

veinules (~16 mmHg) et le ventricule droit (0 mmHg), mais aussi des contractions musculaires des membres inférieurs et du changement de pression dans le thorax et l'abdomen durant la respiration. Une veine ayant la même localisation qu'une artère est plus grosse que celle-ci, mais elle possède une paroi plus mince.



**Figure 2** : Structure comparée des vaisseaux sanguins. (tiré de Tortora)[33]

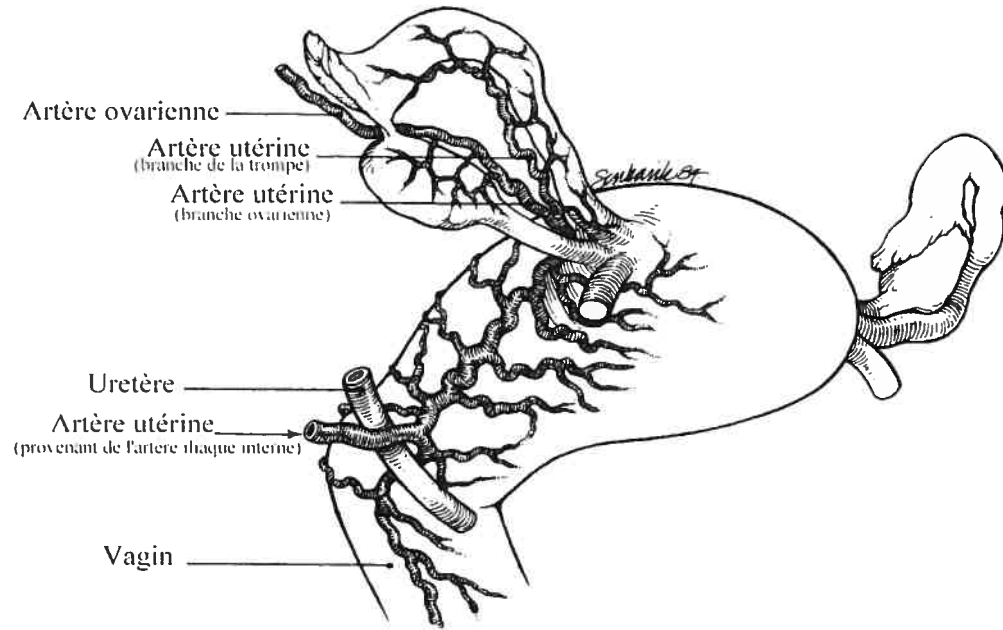
### *La circulation utérine*

Chez la femme, le sang maternel atteint l'utérus par deux voies qui se regroupent au niveau du myomètre (Figure 3). Premièrement, le sang partant de l'aorte se rend à l'artère iliaque commune et passe ensuite dans l'artère iliaque interne. De là, l'artère utérine irrigue l'utérus à partir de la base de l'utérus. La deuxième est l'artère ovarienne, qui origine de l'aorte abdominale, irrigue les ovaires et s'anastomose ensuite à l'artère utérine dans la partie supérieure de l'utérus. L'artère utérine longe les parois latérales de l'utérus en formant un plexus et abandonne de nombreux vaisseaux à direction perpendiculaire, les artères arquées. Celles-ci émettent des ramifications, les artères radiales, qui pénètrent le myomètre et vont jusqu'à l'endomètre. La vascularisation veineuse suit parallèlement la circulation artérielle. Cette circulation chez la rate est morphologiquement différente, étant

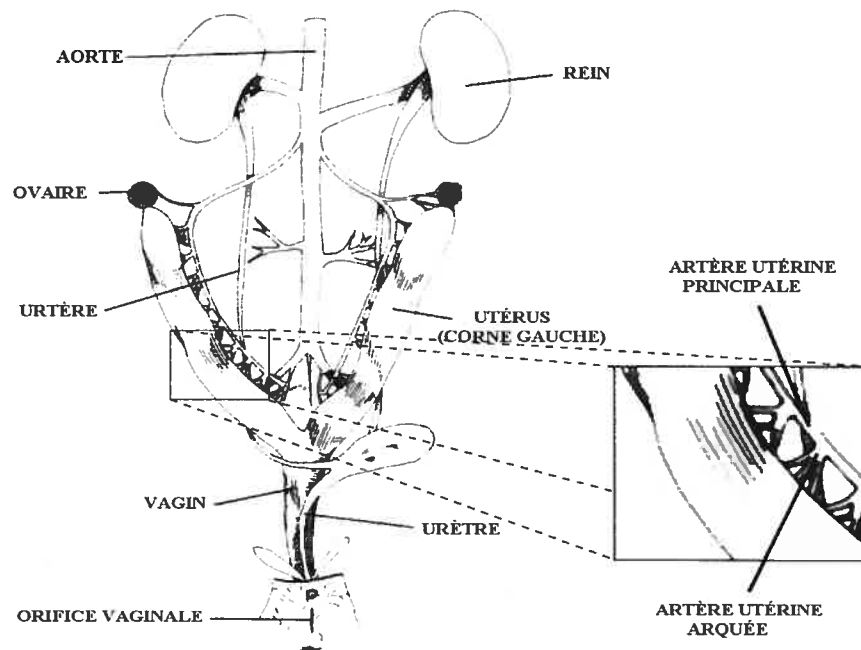
donné que les vaisseaux utérins (artères principales, arquées et radiales) sont en majorité situés à l'extérieur de la paroi utérine. (Figure 4) Cette caractéristique anatomique fait du rat un excellent outil pour étudier le fonctionnement et les caractéristiques des vaisseaux utérins.

### **1.1.2.2 Modifications des vaisseaux utérins durant la gestation**

La circulation utérine est l'objet de modifications importantes durant la grossesse. La vasculature utérine qui approvisionne l'utérus chez les mammifères subit un remodelage considérable durant la gestation pour permettre l'augmentation nécessaire du flot sanguin utérin. L'augmentation du flot utérin a pour but principal de subvenir aux besoins croissants du fœtus tout au long de la gestation et d'éliminer les déchets métaboliques de celui-ci. Le remodelage est caractérisé chez le rat par une hypertrophie et une hyperplasie de la paroi des vaisseaux [34]. Le diamètre interne de l'artère utérine arquée de la rate double durant la gestation et régresse en *post-partum*. De plus, la résistance de ces vaisseaux à l'étirement est augmentée durant la gestation et diminue elle aussi en *post-partum* [35]. Le remodelage de la circulation utérine ne touche pas seulement les artères, car les veines aussi en sont l'objet. Le diamètre de la veine utérine principale augmente près du double durant la gestation et il y a une augmentation de compliance de celle-ci [36]. On remarque aussi une augmentation de l'indice mitotique des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, ce qui indique une augmentation de leur prolifération.



**Figure 3 :** Approvisionnement sanguin à l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires (Traduit de Gabbe)[25].



**Figure 4 :** Organes et vaisseaux urogénitaux chez la rate. (Adapté de Chiasson)[37]

Comme mentionné plus tôt, les vaisseaux systémiques montrent une diminution de réactivité aux différents vasoconstricteurs durant la gestation alors que les artères utérines répondent plus fortement à différents vasoconstricteurs comme l'AngII, la phényléphrine et le KCl [35]. D'ailleurs, toutes ces amplifications de réactivité retournent aux valeurs observées chez les non gestantes dès les premiers jours de *post-partum*.

### **1.1.3 Pathologies de la grossesse et circulation utérine**

Comme mentionné précédemment, la grossesse est une condition physiologique où la pression artérielle diminue en milieu de gestation chez la femme. Même une femme chroniquement hypertendue devrait normalement voir sa pression diminuer durant la grossesse. Ce qui nous permet de dire que la gestation est une condition antihypertensive [26;27]. Cependant, dans 5 à 10% des grossesses, il arrive que l'hypertension survienne[38]. De plus, ces types de complications reliées à la grossesse sont une des causes principales de mortalité et morbidité maternelle dans le monde [39].

Par définition, l'hypertension gestationnelle est caractérisée par une pression artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mm Hg ou une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mm Hg. L'hypertension gestationnelle est souvent un signe précurseur du développement de la prééclampsie. Un diagnostic de la prééclampsie est posé en présence d'une hypertension artérielle accompagnée d'une protéinurie et/ou d'oedème après la 20<sup>e</sup> semaine de gestation. Une prééclampsie mal contrôlée peut se compliquer par une éclampsie, soit l'apparition de convulsions suite à une thrombose des vaisseaux du système nerveux central. Une pression artérielle élevée présente avant la grossesse est considérée comme une hypertension chronique qui peut être aggravée par une prééclampsie.

**Tableau 1 :** Pathologies hypertensives de la grossesse et les observations cliniques associées. (Adapté de Gabbe) [25]

<b>Observations cliniques</b>	<b>Hypertension chronique</b>	<b>Hypertension gestationnelle</b>	<b>Prééclampsie</b>
<b>Apparition de l'hypertension</b>	< 20 semaines	Habituellement lors du 3 <sup>e</sup> trimestre	≥ 20 semaines
<b>Degré de sévérité de l'hypertension</b>	Modéré ou sévère	Modéré	Modéré ou sévère
<b>Protéinurie</b>	Absente	Absente	Habituellement présente
<b>Concentration sérique d'urate &gt;0.33mmol/L</b>	Rare	Absente	Présent dans presque tous les cas
<b>Hémoconcentration</b>	Absente	Absente	Sévère
<b>Thrombocytopénie</b>	Absente	Absente	Sévère
<b>Dysfonction hépatique</b>	Absente	Absente	Sévère

L'étiologie de la prééclampsie est encore obscure, mais semble plurifactorielle et complexe. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour essayer d'expliquer ce qui peut être les causes de la prééclampsie. Dès le début de la gestation, il y aurait déjà une moins bonne placentation qui serait consécutive d'une absence de l'invasion trophoblastique des artères spiralées. Ces dernières sont alors plus contractées et plus réactives aux stimuli vasopresseurs. De même, il y aurait une mauvaise adaptation hémodynamique à la grossesse. Ceci pourrait être dû à une prédisposition génétique, à une mauvaise adaptation du système immunitaire de la mère à la grossesse ou encore à cause de maladies vasculaires déjà présentes chez la mère avant la grossesse (hypertension chronique, lupus érythémateux, syndrome antiphospholipides, déficience rénale, etc.) Cependant, une autre hypothèse serait qu'un dérèglement de la vasculature utérine pourrait amener de l'hypertension[40] et des complications pour le développement du fœtus[41].

En fait, les maladies vasculaires maternelles associés à une diminution de la perfusion utéro-placentaire seraient responsables d'environ 25-30% de tous les enfants ayant subis une restriction de croissance intrautérine (RCIU)[41]. Plusieurs modèles animaux, décrits ci-après, caractérisés par un dérèglement de la vasculature utérine ont été



développés, ce qui appuie ce concept. D'où l'importance de bien comprendre la vasculature utérine et les modifications dont elle fait l'objet durant la gestation.

### **1.1.3.1 Modèles animaux et circulation utérine**

Pour mieux cerner les manifestations pathologiques associées à la grossesse, il est nécessaire de développer un bon modèle animal. Même si plusieurs autres espèces animales (rate, lapine, brebis, etc.) ont une baisse normale de pression artérielle lors de la gestation, la prééclampsie reste une maladie hypertensive propre à l'humain et absente chez ces espèces. C'est pourquoi, il est nécessaire de développer de bons modèles animaux qui présenteraient les caractéristiques physiologiques et moléculaires de la pathologie humaine. Le texte qui suit décrit quelques modèles animaux développés pour imiter la prééclampsie. Cependant, dans plusieurs d'entre eux, on retrouve des diminutions de la circulation au niveau des vaisseaux utérins, amenant des fœtus en RCIU.

#### **Ischémie utéro-placentaire par occlusion :**

Durant la grossesse normale, on observe une augmentation du débit sanguin de 25% vers l'utérus tandis que durant la prééclampsie, elle est réduite à seulement 7.5-12.5% [42;43]. Des modèles d'ischémie utéro-placentaire ont donc été développés en ligaturant l'aorte abdominale au-dessus de l'artère utérine chez le lapin [44], le singe [45;46], la brebis [47] et le rat [40]. Ces modèles diminuent la perfusion placentaire, amènent une atteinte des reins, une augmentation de la pression artérielle et compromettent le développement (RCIU) et/ou la mortalité fœtale.

#### **Inhibition de la synthèse du NO :**

Un autre modèle a été développé en inhibant les synthèses de monoxyde d'azote (NO) par du L-NAME durant la gestation chez le rat [48]. Le NO est un vasodilatateur produit par l'endothélium et impliqué dans la régulation du tonus vasculaire. Plusieurs études démontrent que le NO contribuerait aux adaptations hémodynamiques maternelles de la grossesse normale. Par exemple, on observe une augmentation de la synthèse de NO

et des dérivés nitrés durant cette période [49]. Cette implication du NO est encore plus marquée au niveau utérin où la eNOS est augmenté chez plusieurs espèces[50;51] dont l'humain [52]. Chez les animaux, une inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique (NOS) induit une augmentation de la pression artérielle, une protéinurie, une atteinte rénale [53], et il y a une réduction significative du poids des nouveau-nés[48;54].

### **Modulation du SRAA par modification de l'apport sodique :**

Finalement, le troisième modèle considéré a été développé dans nos laboratoires. Il s'agit d'un modèle où nous modifions le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) en changeant l'apport sodique de la rate pour la dernière semaine de gestation. Pour suractiver le SRAA durant la gestation une diète faible en sodium est donnée à ces rates [22]. Comme conséquence, le volume plasmatique est réduit, comparativement à une rate gestante sous diète normale, les bébés sont plus petits et plus maigres, mais la baisse de pression normale en fin de gestation est encore présente. D'autre part, pour inhiber le SRAA un supplément sodique est donné à des rates gestantes durant la dernière semaine de gestation [55]. La surcharge sodique administrée empêche la baisse de pression artérielle caractéristique d'une gestation normale et induit des changements physiologiques similaires à ceux observés au cours de la prééclampsie humaine. Par exemple, on observe une hémococoncentration, une balance hydrique négative et une protéinurie. Encore une fois, il y a une RCIU marquée des fœtus avec le supplément 1.8% de Na<sup>+</sup>. Un avantage de ce modèle est que la modification de la pression artérielle est spécifique à la gestation, car le même supplément sodique chez des non gestantes n'a aucun effet sur la pression. Des résultats qui sont en ce moment soumis pour publication démontrent que le remodelage vasculaire utérin de ces rates, soumises à une diète faible ou riche en sodium, est altéré et que le diamètre des artères utérines arquées est réduit comparativement à une rate gestante sous diète normale (*St-Louis, Sicotte, Beauséjour, Brochu, soumis pour publication*). Tandis que, les mêmes diètes n'ont aucun effet sur le diamètre de ces artères des non gestantes. Il est aussi intéressant de souligner que le diamètre des rates gestantes soumises à la diète faible en sodium est plus petit que celui des rates gestantes avec la diète forte en sel.

## 1.2 L'œstrogène et les hormones sexuelles

### 1.2.1 Implications durant la grossesse

#### - Œstrogènes

Les œstrogènes ont plusieurs fonctions dont la principale est le développement et le maintien des fonctions sexuelles femelles. Ils stimulent la maturation du vagin, de l'utérus et des trompes de Fallope à la puberté, le développement mammaire, les caractères sexuels secondaires et modifient la morphologie générale, la répartition du tissu adipeux et l'amincissement du derme. À l'âge adulte, ils entraînent une multiplication cellulaire intense (mitoses) de l'endomètre dont l'épaisseur augmente, ainsi qu'une prolifération des cellules du myomètre avec augmentation de leur contractilité durant les menstruations. Ils entraînent la sécrétion d'une glaire cervicale abondante qui est favorable à la pénétration des spermatozoïdes dans l'utérus. Les œstrogènes possèdent également des propriétés cardioprotectrices et ils permettent aussi de diminuer la réabsorption osseuse en antagonisant les effets de l'hormone parathyroïde.

Durant la gestation, l'œstrogène a des répercussions principalement sur la vasculature utérine, la stéroïdogénèse placentaire et la parturition. Des études expérimentales ont démontré que l'œstrogène accroît le flot sanguin dans les organes reproducteurs femelles [56]. Étant donné la très forte exposition du lit utéro-placentaire à la sécrétion directe et massive d'œstriol durant la gestation, il a été suggéré qu'elle pourrait constituer la principale substance responsable de l'augmentation du flot sanguin utérin chez la femme. Cependant, ceci ne peut pas être le cas chez la rate étant donné qu'il n'y a pas de production d'œstriol chez cette espèce. D'autre part, des mécanismes régulés par l'œstrogène permettraient au fœtus de gérer la production et la sécrétion de la progestérone durant le troisième trimestre. Ceci découle du fait qu'il a été démontré chez le babouin que l'œstrogène contrôle la biosynthèse de progestérone placentaire en régulant la disponibilité du LDL cholestérol pour la conversion en pregnénone et les stéroïdes découlant de celle-ci [57]. D'autre part, les œstrogènes fœto-placentaires agissent sur la parturition, car ils sont intimement reliés à l'irritabilité myométriale, la contractilité et le travail. L'œstrogène augmente d'une part la sensibilité à l'ocytocine en augmentant la biosynthèse des prostaglandines [58]. Étant donné que la relâche placentaire d'œstrogène est liée à l'axe

hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) fœtal, il semble que cet axe ajuste la synchronisation de la parturition. Ceci serait effectué en partie via la signalisation de l'axe HHS sur la production d'œstrogène placentaire. Chez l'humain le travail est soit trop tôt ou trop tard lorsque les fœtus sont anencéphaliques. Ceci a été démontré chez le macaque avec des fœtus dont l'encéphale a été retiré chirurgicalement [59;60].

### **- Progestérone**

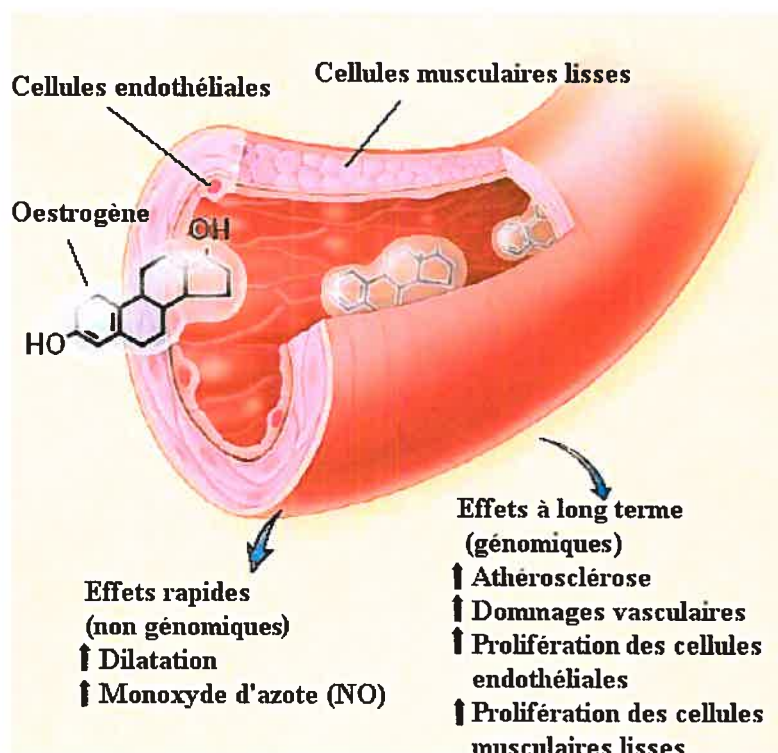
La progestérone est rapidement éliminée de la circulation sanguine, car elle possède une demi-vie d'environ 5 minutes. La progestérone est impliquée dans le développement glandulaire des seins et prépare l'utérus à la nidation en combinaison avec l'œstrogène. Au niveau de l'endomètre, elle entraîne un arrêt des mitoses provoquées par les œstrogènes et amène l'apparition d'un aspect sécrétoire, dit « de dentelle utérine », avec vacuoles remplies de glycogène. Au niveau du col utérin, elle supprime la glaire cervicale induite par les œstrogènes. Elle a aussi un effet hyperthermique responsable de l'augmentation de la température basale d'environ 0,5°C au cours de la deuxième partie du cycle menstruel. De plus, elle inhibe la sécrétion des gonadostimulines hypophysaires (LH, FSH) qui régulent le cycle ovarien et le déclenchement de l'ovulation.

Durant la gestation, la progestérone provenant du corps jaune amènerait une relaxation de la mobilité des trompes de Fallope, pour balancer l'effet activateur de l'œstrogène [61]. Ce qui permet au conceptus de voyager jusqu'à l'utérus pour l'implantation. De plus, la progestérone en combinaison avec l'hCG et le cortisol inhiberait la réponse immunologique et le rejet du conceptus et du placenta en développement [62]. Elle contrebalancerait aussi l'effet de l'œstrogène en atténuant l'augmentation du flot sanguin utérin [63]. Cet effet opposé à l'œstrogène est aussi vrai pour ce qui est de la parturition. La progestérone relaxe l'utérus en inhibant la synthèse et sécrétion de prostaglandines. Tandis que l'œstrogène fait tout simplement l'inverse.

## **1.2.2 Modes d'action sur les vaisseaux sanguins**

L'œstrogène est une hormone sexuelle faisant partie de la famille des stéroïdes qui agissent principalement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires (Figure 5). Les

œstrogènes ont été caractérisés comme étant des molécules capable d'exercer plusieurs effets sur le système cardiovasculaire à la fois par une voie génomique et non génomique.



**Figure 5 :** Les effets directs (génomiques et non génomiques) de l'œstrogène sur les vaisseaux sanguins. (*Adapté de Mendelsohn et coll.*)[64]

### 1.2.2.1 Les effets génomiques

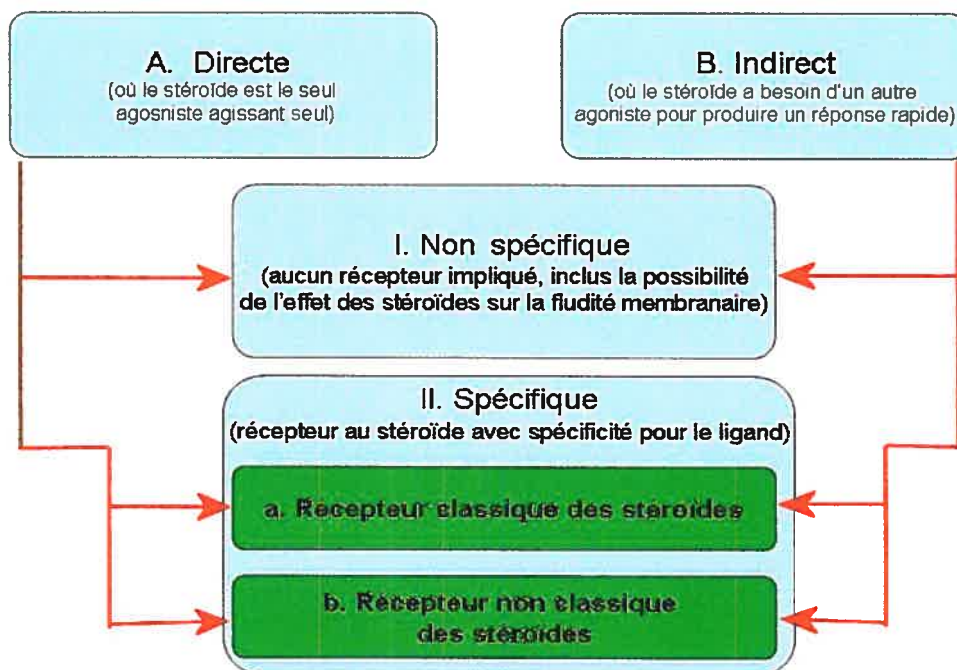
Les œstrogènes agissent via les récepteurs aux œstrogènes (ER), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription. Ils permettent de régulariser l'expression des gènes contrôlés par ces hormones. La voie de l'activation d'un gène par l'œstrogène est la suivante : il y a d'abord un passage passif de l'œstrogène libre au travers de la membrane pour entrer dans la cellule. Il se lie ensuite à son récepteur ce qui va entraîner la dissociation de chaperonnes de la famille des protéines activées par choc thermique « *heat shock proteins* » (ex : Hsp90, Hsp56). Celles-ci stabilisent le récepteur et augmentent son affinité pour l'œstrogène [65]. Cette dissociation des HSP va permettre la dimérisation du récepteur. Ce complexe va agir comme facteur de transcription en se liant à l'ADN au site de l'élément de réponse spécifique (ERE) ou

« estrogen response element » du gène cible. En plus du complexe stéroïde-récepteur dimérisé, plusieurs co-activateurs sont recrutés pour initier la transcription du gène cible [66;67]. Ces voies peuvent être bloqué en utilisant des inhibiteurs non spécifiques de la synthèse protéique (ex.: cycloheximide) ou de la transcription (ex.: actinomycine D). Cette voie de régulation par l'œstrogène est présente dans les vaisseaux sanguins. Le groupe de Charles Rosenfeld a démontré chez la brebis qu'en inhibant la synthèse protéique avec de la cycloheximide l'augmentation du flot utérin induit par le 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) était considérablement réduit suggérant des événements transcriptionnels dans ces réponses [68].

Les effets non génomiques

Depuis quelques années, plusieurs études ont montré des effets spécifiques des stéroïdes qui ne semblent pas être médiés par une action génomique de l'hormone. En effet, les différentes évidences sont : 1- une action très rapide qui ne peut résulter de l'expression de gènes (de l'ordre de la seconde à la minute), 2- les effets observés dans des cellules qui ne possèdent pas la machinerie de synthèse d'ARNm et de protéine comme les spermatozoïdes, 3- une réponse insensible aux inhibiteurs de transcription ou de synthèse protéique 4- l'effet est observé avec de l'œstrogène est couplée à de l'albumine (BSA) qui empêche l'hormone de pénétrer à l'intérieur de la cellule, 5- ces effets peuvent être observés même en présence d'antagonistes spécifiques des ERs (ICI 162,780; Tamoxifène; etc.). [69]

Avec l'augmentation importante du nombre d'études référant à des effets non génomiques des stéroïdes, il est apparu nécessaire d'établir une classification de ces actions (Mannheimen, Allemagne, 1996). La figure 6 résume cette classification.



**Figure 6 :** Classification de l'action non génomiques des stéroïdes statué à Mannheim, Allemagne en 1998. (Adapté de Falkenstein et coll)[69]

### 1.2.2.2 Les effets non génomiques

Les effets non génomiques des œstrogènes sont de plus en plus caractérisés, et ce, dans plusieurs tissus. Les effets sur les cellules nerveuses ont été parmi les premiers observés. Déjà dans les années 80, on a remarqué que l'œstrogène est capable de modifier la conductance ionique et de moduler l'excitabilité de cellules nerveuses en quelques secondes après l'application [70]. Il a été démontré que l'œstrogène agit via l'interaction avec un récepteur spécifique à la membrane des neurones pour amener son effet. [71] Des études plus récentes ont démontré que l'œstrogène active la formation d'AMPc [72], la phosphorylation de CREB [73], la formation d'inositol triphosphate (IP3) [74] et l'activation de MAPKs dans des cellules de neuroblastomes [75]. Dans la même optique, une étude récente a démontré que le traitement au  $17\beta$ -E<sub>2</sub> ou à de l'œstrogène conjugué à du BSA augmente la croissance des neurites et des embranchements de neurones dopaminergiques en déclenchant une relâche de Ca<sup>+</sup> intracellulaire quelques secondes après

le traitement. De plus, cet accroissement est inhibé par des antagonistes des voies AMPc/PKA et du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais pas par le ICI 182,780 [76].

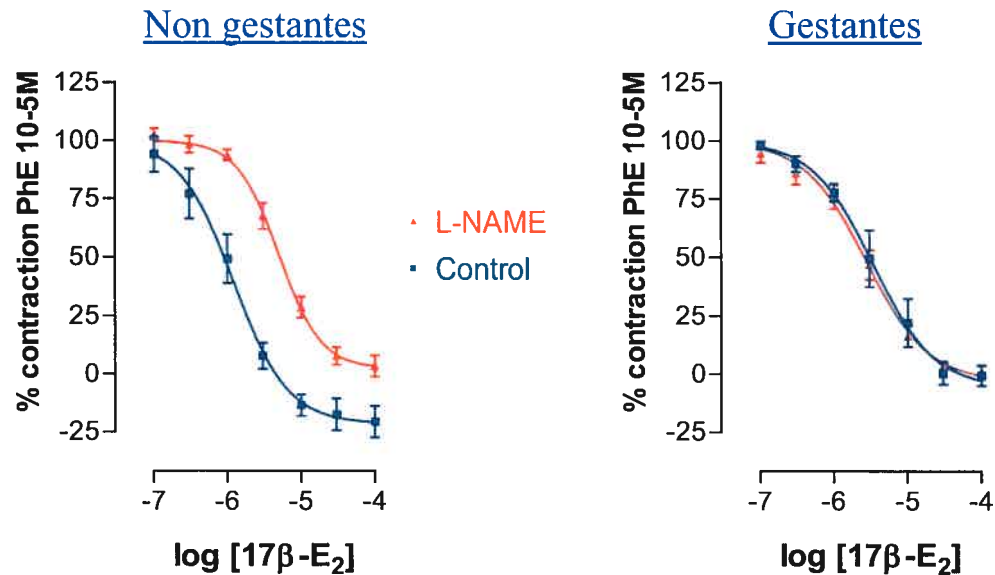
Également, les effets non génomiques des œstrogènes jouent un rôle important sur les tissus vasculaires. De façon générale, *in vivo* la vasodilatation occasionnée par l'œstrogène est présumée indirecte, c'est-à-dire en agissant sur l'endothélium qui lui sécrète des substances vasorelaxantes. Par exemple, il a été démontré que l'œstrogène agit sur les cellules endothéliales en activant les MAPK et en augmentant la transcription de gènes, la prolifération cellulaire et en augmentant l'expression de la synthase de monoxyde d'azote endothéliale (eNOS). Il semble que les effets contraires sont observés *in vitro* avec des cellules musculaires lisses d'aorte porcine [77] Étant donné les propriétés liposolubles de l'œstrogène, il est probable qu'il agissent directement *in vivo* sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). On a décrit avec des coronaires d'humain et de porc ou des aortes de rat que l'éthinylestradiol ou le  $17\beta\text{-E}_2$  amenaient des relaxations aiguës significatives [78-80]. Ceci a été suggéré comme mécanisme pouvant expliquer l'effet cardioprotecteur des traitements hormonaux de remplacement chez la femme ménopausée. Dans des cellules endothéliales isolées d'artère pulmonaire de fœtus de mouton, l'œstrogène amène une augmentation de l'activité de eNOS en moins de 5 minutes. Par contre, cette activation des eNOS peut-être complètement inhibée par le tamoxifène ou le ICI 182,780 [81], mais pas l'actinomycine D [82]. Ces expériences nous démontrent qu'il s'agit d'une action non génomique de l'œstrogène de classe A.IIa (Fig. 6). D'autres études ont montré que cette activation de eNOS s'effectuait sans augmentation de calcium intracellulaire,[83] mais se produisait via l'activation de la voie PI3K/Akt [84]. Fait étonnant, le  $17\beta\text{-E}_2$  amène une relaxation rapide des artères de la queue de rates, mais pas chez les mâles [85]. Le mécanisme par lequel cette différence se manifeste est encore inconnu.

Comme mentionné précédemment, l'œstrogène pourrait dans une autre mesure amener ses effets via une action directe sur CMLV. Pour qu'un vaisseau sanguin puisse relaxer il faut diminuer la concentration de calcium activateur dans les CMLV. Étant donné que l'œstrogène amène un vasorelaxation rapide, il doit réussir à diminuer la concentration de  $\text{Ca}^+$  intracellulaire des CMLV d'une manière ou d'une autre. Jusqu'à présent, une étude a démontré, dans les coronaires de porc, que l'œstrogène diminuerait la relâche de calcium



venant du réticulum sarcoplasmique [86]. Plusieurs autres études ont plutôt observé une diminution de l'influx de calcium dans les CMLV de porcs [87;88] ou alors une augmentation de la sortie de calcium [89]. Des études de patch-clamp sur des CMLV de rat et de lapin suggèrent que l'œstrogène inhibe l'entrée de calcium par l'inhibition de canaux calciques de type L [90]. Une autre possibilité par laquelle l'œstrogène pourrait diminuer l'influx de calcium, c'est en ouvrant des canaux potassiques situés à la membrane plasmique. En suractivant les canaux  $K^+$  la cellule devient hyperpolarisée ce qui rend limite l'ouverture des canaux  $Ca^{+}$  dépendants du voltage. Des études de patch-clamp ont démontré que l'œstrogène active les canaux potassiques de grande conductance activés par le potentiel et le calcium ( $BK_{Ca}$ ) dans des myocytes de coronaire [91]. Il semblerait qu'environ 70% de la relaxation aiguë induite par l'œstrogène serait dépendant de l'activité des  $BK_{Ca}$  [92]. Il a été démontré que des concentrations physiologiques d'œstrogène sur des myocytes d'artère coronaire permettraient l'ouverture des  $BK_{Ca}$  [93]. Même si ceci est vrai pour des monocytes d'artère de mouton, de porc et d'humain, les  $BK_{Ca}$  de coronaire de rat ne répondent pas directement à l'œstrogène [94].

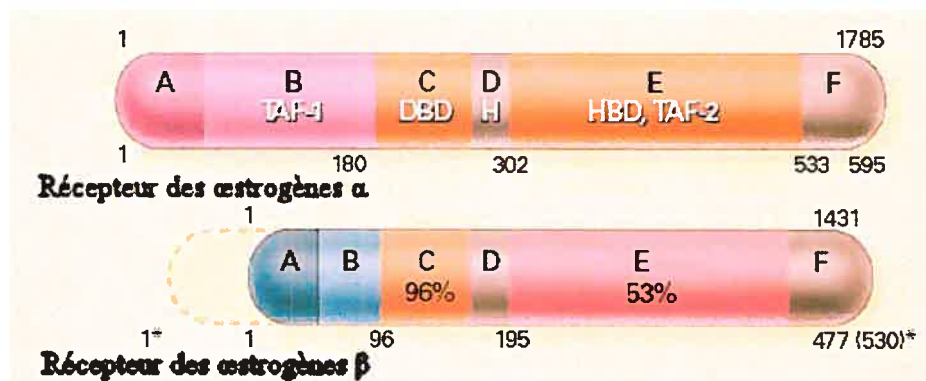
Des expériences préliminaires de notre laboratoire ont démontré l'effet vasorelaxant aiguë du  $17\beta-E_2$  sur des artères utérines arquées dénuées d'endothélium. De plus, la relaxation relative obtenue dans les artères de rates non gestantes est plus importante que celles des gestantes, comme illustré à la figure 7. D'ailleurs, cette plus grande relaxation observée chez les non gestantes est réduite au niveau des gestantes lorsque les vaisseaux sont préincubés avec du L-NAME. Ce qui suggère un rôle du NO dans les muscles lisses des artères utérines arquées qui est perdu durant la gestation.



**Figure 7 :** Courbes de relaxation pour le 17β-E<sub>2</sub> dans des artères utérines arquées chez des rates gestantes et non gestantes avec ou sans L-NAME (n = 6) (*Lapointe P., Sicotte B., St-Louis J., 2001, non-publié*)

### 1.2.3 Les récepteurs des œstrogènes

Comme décrit plus haut (Fig. 6), l'œstrogène exerce ses actions génomiques via l'interaction avec les récepteurs des œstrogènes. Également, les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ont aussi la possibilité de permettre à cette hormone d'agir via des mécanismes non génomiques. Nous allons nous attarder dans cette section à décrire la structure des récepteurs aux œstrogènes afin de mieux comprendre leur fonction. Les récepteurs aux œstrogènes sont définis comme des facteurs de transcription dépendants de la liaison de l'hormone.



**Figure 8 :** Structure des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  aux œstrogènes chez l'humain. (*Traduit de Mendelsohn et coll*)[64]

Il existe deux récepteurs aux œstrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$ , qui font partie de la superfamille des récepteurs aux stéroïdes. Le premier récepteur à être identifié fut ER $\alpha$ , cloné en 1985 [95]. Environ dix ans plus tard, un second récepteur (ER $\beta$ ) a été cloné [96;97]. Celui-ci a été décrit comme ayant des caractéristiques structurales (12 hélices) et fonctionnelles très semblables au ER $\alpha$ . Ils ont tous deux la même structure modulaire composée de six domaines (A à F). Malgré que ces protéines soient le produit de deux gènes différents, ils partagent une très grande homologie de séquence pour le domaine de liaison à l'ADN ( $\approx 96\%$ ) et aussi pour le domaine de liaison au ligand ( $\approx 53\%$ ). Le domaine « E », en plus d'être responsable de la liaison avec le ligand, permet l'homodimérisation et la localisation nucléaire du récepteur. De plus, le domaine « E » contient une fonction d'activation dépendante du ligand (AF-2). Il existe aussi une autre fonction d'activation (AF-1) située, dans le domaine A/B qui est indépendante du ligand [98]. Des études ont démontré que le domaine AF-2 interagit avec différentes protéines qui servent de corégulateurs pour la transcription de gènes cibles [99;100]. Les deux ERs reconnaissent la même séquence consensus qui se nomme l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE). La séquence minimale consensus est une séquence palindromique de 13 pb (5'-GGTCAnnnTGACC-3'). Récemment, il a été démontré par analyse génomique que la plupart de gènes cibles des récepteurs des estrogènes contiennent diverses variations des éléments ERE [101;102].

Malgré ces ressemblances entre les deux types de récepteurs, certaines études ont démontré des nuances d'affinités pour différents ligands comme la génistéine, le raloxifène

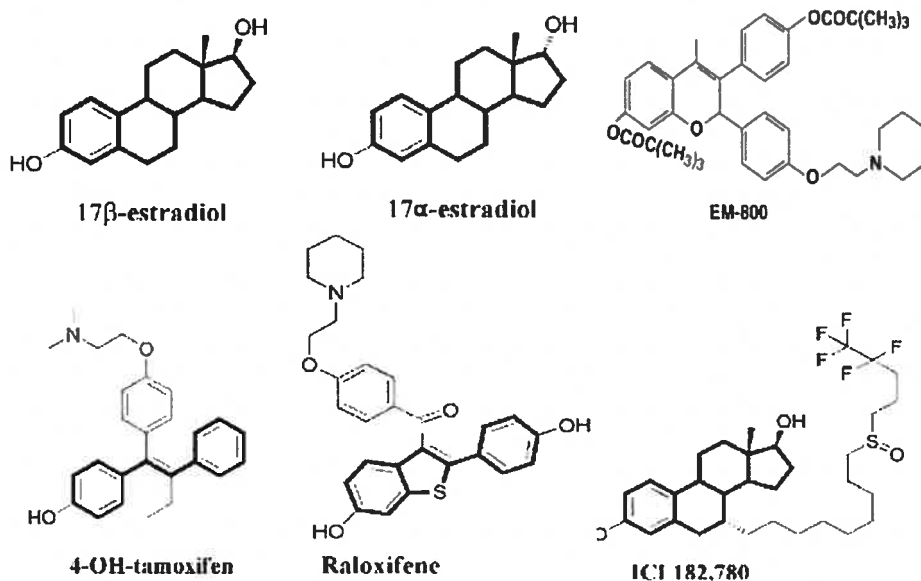
et le tamoxifène [103;104]. De même, il a été démontré que ces deux récepteurs pouvaient recruter plusieurs cofacteurs communs, mais que chacun d'eux pouvait aussi mobiliser des cofacteurs spécifiques [105]. Afin de voir l'implication des différents récepteurs, des modèles animaux où les gènes ER $\alpha$  (ER $\alpha$ KO) et/ou ER $\beta$  (ER $\beta$ KO) ont été inactivés. La souris ER $\alpha$ KO est viable et se développe jusqu'à l'âge adulte avec un phénotype visible normal. Cependant, les femelles sont infertiles et les mâles ont une diminution marquée de leur fertilité. On observe chez les femelles une hypoplasie de l'utérus, l'absence de développement mammaire et des ovaires sans corps jaunes [105]. D'ailleurs, un homme a été diagnostiqué comme ayant une mutation bi-allélique inactivant le gène de ER $\alpha$ . Ce patient avait une apparence normale avec des organes génitaux normaux, mais il souffrait d'ostéoporose et sa croissance n'était pas terminée à l'âge de 28 ans [106]. Les souris ER $\beta$ KO ont un phénotype externe normal et elles sont fertiles, mais elles ont de plus petites portées à cause d'une réduction de leur efficacité d'ovulation. Les mâles, quant à eux, développent avec l'âge une hypertrophie de la prostate et de la vessie [107]. Il est intéressant de noter que dans les deux modèles de knock-out, comme chez les souris sauvages, le 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> protège les vaisseaux de façon similaire, suite à une lésion vasculaire, en réduisant l'épaississement de la paroi et en inhibant la prolifération des CMLV. Ceci suggère que ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent se compenser l'un l'autre pour certaines fonctions ou que le rôle protecteur de l'œstrogène dans la protection vasculaire est indépendant des ERs. Les mêmes expériences ont été effectuées sur des souris double knock-out des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha\beta$ KO). Les résultats sont différents étant donné que le traitement au 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> réduit l'épaississement de la tunique moyenne seulement chez les souris de type sauvage et pas chez les ER $\alpha\beta$ KO. Étonnamment, comme pour les souris de type sauvage, le 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> amène une augmentation du poids utérin et inhibe la prolifération des CMLV des ER $\alpha\beta$ KO [108]. Ces résultats suggèrent qu'un type de récepteurs, ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , est nécessaires pour certaines fonctions, comme l'inhibition de l'épaississement de la media dans le cas présent. De plus, ces résultats suggèrent que les différentes actions de l'œstrogène dans la réponse suivant une blessure vasculaire ne sont pas toutes dépendantes des récepteurs aux œstrogènes. Mais, ceci reste à être prouvé avec un meilleur knock-out étant donné que ER $\alpha\beta$ KO exprime un variant d'épissage de ER $\alpha$  qui peut lier l'E<sub>2</sub> et médier l'expression de gènes suite à la liaison à l'hormone [109].

Une autre caractéristique importante qui apporte une utilité supplémentaire au fait d'avoir deux récepteurs quasi identiques, c'est l'évidence que ER $\beta$  aurait comme rôle de réguler l'expression de ER $\alpha$  [110]. Il semblerait que le domaine A/B d'ER $\beta$  agirait efficacement comme répresseur avec des concentrations sous-saturantes d'œstrogène. De plus, dans des cellules HepG2 lorsque ER $\beta$  est exprimé, le tamoxifène perd son effet d'agoniste partiel via ER $\alpha$ . Ce qui indique que l'expression relative des deux différents récepteurs pourrait être un déterminant clé dans la réponse d'un tissu donné aux agonistes et antagonistes des ERs.

### 1.2.3.1 Les antiœstrogènes et antagonistes des ERs

Il existe plusieurs antagonistes des récepteurs aux œstrogènes. Les antiœstrogènes agissent en compétition avec l'œstrogène sur le domaine de liaison du récepteur favorisant une conformation à celui-ci qui est inadéquat pour remplir son rôle de régulateur transcriptionnel. Il existe deux types d'antagoniste des ERs, soit les antiœstrogènes totaux et les antiœstrogènes partiels ou SERMs (selective estrogen receptor modulators). (Fig.9) Les SERMs ont la particularité d'être à la fois antagoniste et agoniste dépendamment du tissu. Trois SERM connus sont le tamoxifène, le raloxifène et clomifène. Le tamoxifène, qui agit via son métabolite l'hydroxytamoxifène, est surtout utilisé contre les tumeurs mammaires par son effet antagoniste dans cet organe. Cependant, il a également un effet œstrogénique au niveau de l'endomètre et de l'os, ce qui fait qu'un traitement prolongé augmente l'incidence de cancer de l'endomètre. Même si le raloxifène possède une structure assez différente du tamoxifène, il agit lui aussi comme antagoniste au niveau des seins et de l'endomètre. Par contre, il a un effet œstrogénique sur les os ce qui peut prévenir l'ostéoporose. Le clomifène a comme principal effet d'inhiber le rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire assuré par l'œstradiol. Son administration pendant quelques jours provoque une décharge de FSH, puis de LH, susceptible de déclencher une ovulation. Le clomifène est donc utilisé dans le traitement des stérilités par anovulation. Les antagonistes totaux comme leur nom l'indique bloquent complètement l'activité des récepteurs aux œstrogènes et amènent la dégradation de ceux-ci. Deux exemples connus sont le ICI 182,780 et le EM-800 [111]. L'affinité relative du ICI 182,780 est de 0,89 comparé à l'œstradiol (1,00) [112], donc une affinité d'environ 100 fois supérieur au

tamoxifène pour ER $\alpha$ , mais sans présenter d'activité agoniste de l'œstrogène dans les différents tissus [113].



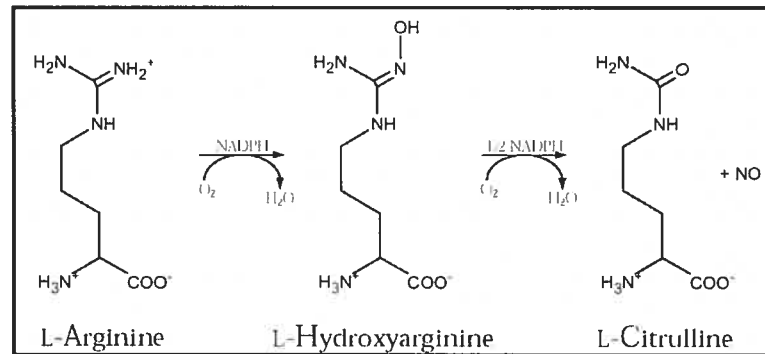
**Figure 9** : Différents composés œstrogéniques et anti-œstrogéniques

### 1.3 Monoxyde d'azote et ses synthèses

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène, un gaz volatile et vasodilatateur. Sa découverte provient d'expériences qui avaient montré que l'endothélium pouvait libérer, dans certaines conditions, une substance vasodilatatrice initialement appelée EDRF, «Endothélium-derived relaxing factor». Ainsi, l'acétylcholine provoque la relaxation d'un vaisseau isolé lorsqu'il est intact, mais pas lorsque son endothélium a été enlevé [114]. L'acétylcholine active des récepteurs muscariniques liés aux protéines G qui, par l'intermédiaire de la phospholipase C et la formation d'IP3 provoquent une augmentation du calcium intracellulaire, lequel en s'associant à la calmoduline active la eNOS constitutive déjà présente dans le tissu. Le NO, au niveau vasculaire, agit via l'activation de la guanylate cyclase qui provoque la transformation du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'augmentation de ce second messager est responsable de la modulation de l'activité de diverses protéines kinases

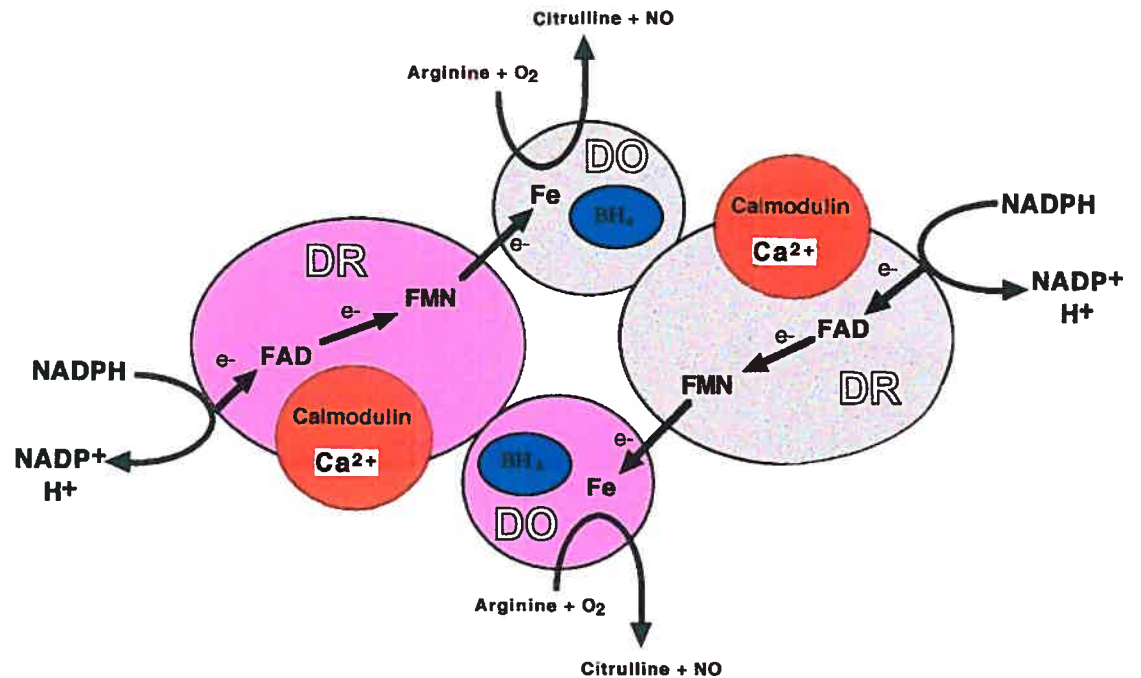
qui, en favorisant la sortie de potassium et de calcium hors de la cellule, provoquent une repolarisation ayant pour conséquence une relaxation des fibres vasculaires lisses, c'est-à-dire la vasodilatation.

### 1.3.1 La chimie des NOS



**Figure 10 :** Représentation de la réaction générale d'oxydation de la L-Arginine pour produire du NO et de la L-Citrulline. (Cayman chemical, MI; USA)

La synthèse de NO (Fig.10) s'effectue à partir de la L-arginine grâce à la NO-synthase, enzyme dont la structure ressemble à celle du cytochrome P-450. En présence de NADPH, d'oxygène, de fer, de tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), de flavine mononucléotide (FMN) et de flavine-adénine dinucléotide (FAD), la NOS transforme l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en NO et citrulline. La NOS est fonctionnelle sous forme de dimère où le domaine réductase de l'une est couplé au domaine oxygénase de l'autre. (Fig.11)



**Figure 11** : Réaction globale de la synthèse du NO par les synthases de monoxyde d'azote sous forme de dimère. DR= domaine réductase DO= domaine oxygénase (*adapté de Alderton W.K.*)[115]

### 1.3.2 Les isoformes de NOS

On distingue trois isoformes de NOS : l'isoforme nNOS est présente principalement dans les neurones et les tissus innervés, l'isoforme iNOS est exprimé dans différents types de cellules, dont les macrophages, après induction par des cytokines, et la eNOS est présente essentiellement dans les cellules endothéliales. La eNOS et nNOS sont activées par le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline et entraînent une libération de NO immédiate et de courte durée. Elles peuvent aussi être activées par phosphorylation, comme démontré lors d'une augmentation des forces de cisaillements sur les parois [116]. Des trois types d'enzyme, seule la eNOS possède des sites de myristoylation et de palmitoylation dans la portion N-terminale. Cette caractéristique fait en sorte que contrairement aux autres isoformes qui se retrouvent libres dans le cytosol, la eNOS est ancrée à la membrane des caveolae [117]. La caveoline, qui est abondante dans les caveolae, inhibe l'activité de eNOS, mais aussi celle de la nNOS. Il a aussi été démontré que Hsp90, dont l'expression est augmenté par le VEGF, l'histamine ou les forces de cisaillement, augmente substantiellement l'activité de



eNOS [115]. Un complexe nNOS et Hsp90 a aussi été identifié, mais il n'augmente pas son activité [118].

La iNOS est exprimée dans les macrophages, les neutrophiles et les hépatocytes sous l'influence de cytokines, notamment l'interleukine-1, du facteur de nécrose tumoral (TNF), de l'interféron  $\gamma$  et de lipopolysaccharides. Il semblerait que la régulation de iNOS se fait principalement au niveau transcriptionnel, quoiqu'il a été démontré qu'une protéine dans le système nerveux central, nommée Kalirin, inhiberait l'activité de la iNOS en l'empêchant de se dimériser [119].

### **1.3.3 Les agents pharmacologiques**

Il existe des donneurs pharmacologiques de NO, tels que le nitroprussiate de sodium, la molsidomine et la linsidomine ainsi que les dérivés nitrés. Ils sont principalement, mais non exclusivement utilisés comme agents vasodilatateurs (antiangineux), afin de prévenir les maladies cardiovasculaires. Expérimentalement il est possible d'utiliser des inhibiteurs de synthèse du NO pour mesurer l'effet de celui-ci. Un des premiers fut le L-Nitro-arginine méthylester (L-NAME) qui est hydrolysé par les estérases de la cellule pour donner du N-nitroso-L-arginine (L-NNA) qui est un inhibiteur relativement spécifique à la eNOS et nNOS en compétitionnant pour le site de liaison de l'arginine. Le  $K_i$  pour la iNOS est 1000 fois plus faible que pour les deux autres isoformes. Un composé semblable, le L-monométhyl arginine citrate (L-NMMA), est l'inhibiteur classique non spécifique des NOS. Finalement, le L-NIL est un inhibiteur relativement sélectif de iNOS. (Cayman chemical inc. )

### **1.3.4 Implications durant la grossesse**

Le NO est un important médiateur qui agit de manière paracrine dans plusieurs processus liés à la reproduction chez la femme, dont l'ovulation, l'implantation, le maintien de la grossesse, le travail et la parturition. En fait, les dérivés nitrés sont augmentés durant le développement du follicule, corrélant avec l'augmentation d'œstrogène, pour diminuer immédiatement après l'ovulation [120]. Il semble que l'inhibition de iNOS amène une diminution de 50% de l'ovulation chez le rat [121]. Il a été démontré chez la rate que le NO aurait un rôle à jouer dans l'implantation. En effet, on remarque une augmentation

d'expression de iNOS et eNOS au site d'implantation. D'autre part, iNOS a été détecté dans l'épithélium endométriale et d'autres types cellulaires durant les menstruations chez la femme [122]. Durant la gestation, la production myométriale de NO est augmentée contribuant ainsi, en combinaison avec la progestérone, à maintenir l'utérus quiescent. Peu avant terme, la production de NO s'affaiblit, ce qui permet d'avoir des contractions efficaces durant le travail [123]. Le NO agirait aussi au niveau de la maturation du col de l'utérus. Les trois isoformes de NOS sont exprimées dans le col et l'expression de iNOS et nNOS est augmentée durant le travail. De plus, l'inhibition des NOS avec le L-NAME amène une prolongation du temps de l'accouchement ainsi que l'intervalle entre chaque bébé chez le rat [124].

Enfin, une implication importante du NO, est son apport vasorelaxant dans la circulation systémique et utérine durant la gestation. Il a été démontré dans plusieurs études que la eNOS était augmentée dans les vaisseaux utérins durant la gestation [50-52]. De plus, le modèle de souris knockout pour la eNOS amène de l'hypertension de grossesse [125]. Comme il a été mentionné à la section 1.1.3.1, un modèle animal d'inhibition des NOS durant la gestation amenait un état semblable à la l'hypertension de grossesse et prééclampsie chez le rat [48]. Par contre, il a aussi été montré que l'administration de CGRP (calcitonin gene-related peptide) réduit la mortalité fœtale et élimine l'hypertension observée dans ce modèle [126]. Ceci ne démontre pas de lien direct entre NO et prééclampsie, mais plutôt que la vasoconstriction occasionnée par la diminution de NO peut conduire à de la prééclampsie. Ainsi, l'administration d'un agent vasorelaxant via la génération de NO ou non pourrait éviter cette pathologie.

## 1.4 Objectif et Hypothèse de travail

Un des intérêts de notre laboratoire est de caractériser les modifications vasculaires qui surviennent durant la gestation. Plus particulièrement, nos études visent à caractériser le remodelage de la vasculature utérine durant la gestation et déterminer quels sont les éléments déclencheurs de ce remodelage. Des travaux antérieurs (Lapointe P., Sicotte B., St-Louis J., 2001, non-publié) ont montré que les œstrogènes, dont les niveaux sont considérablement augmentés durant la gestation, sont responsables d'une relaxation rapide des artères utérines arquées dénudées de leur endothélium. De plus, une partie de cette relaxation serait le résultat d'une libération de NO musculaire seulement présente chez les rates non gestantes. À la lumière de ces informations, nous avons émis l'hypothèse que l'effet vasorelaxant aigu des œstrogènes dans les vaisseaux utérins est en partie médié par une NOS musculaire présente chez les non gestantes et l'activation de cette enzyme est dépendant des récepteurs aux œstrogènes. Pour ce faire, mes objectifs sont de comparer dans les vaisseaux utérins de rates gestantes et non gestantes : 1) l'expression des NOS 2) l'expression des récepteurs aux œstrogènes ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) 3) les effets vasorelaxants aigus de l'œstrogène 4) les influences de certains modulateurs pharmacologiques sur ces relaxations.

## 2. Matériels et méthodes :

### *Produits utilisés*

Tous les produits utilisés sous forme de sel dans ces expériences (tampons, solutions de Krebs, etc.) étaient de grade analytique provenant de Fisher Scientific et Bio-Rad. Nous nous sommes procuré le  $17\alpha$ -E<sub>2</sub> et le  $17\beta$ -E<sub>2</sub> chez Sigma Chemical Co. et le ICI182,780 provient de chez Tocris Chemicals. Les différents anticorps utilisés pour les immunobuvardages western : anti-eNOS souris IgG1 clone 3 (BD Transduction laboratories; #610297) 1/1000; anti-iNOS souris IgG1 clone 54 (BD Trans. Lab.; #610432) 1/5000; anti-nNOS souris IgG2a clone 16 (BD Trans. Lab.; #610309) 1/1000; anti-beta actine souris IgG1 clone AC-15 (Abcam Inc; #ab6276) 1/10000; anti-ER $\alpha$  lapin polyclonal IgG H-184 (Santa Cruz biotech., #sc-7207) 1/1000; anti-ER $\beta$  lapin polyclonal IgG H-150 (SantaCruz biotech., #sc-8974) 1/1000; Anti-souris IgG provenant du mouton et conjugué à une peroxydase “Horseradish” (Amersham Bioscience; # NA931) 1/2000; Anti-lapin IgG provenant de l’âne et conjugué à une peroxydase “Horseradish” (Amersham Bioscience; # NA934) 1/4000. Les amorces utilisées pour le RT-PCR sont détaillées dans le tableau 2.

### *Animaux*

Des rates Sprague-Dawley (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) d’environ 225-250g sont croisées avec un mâle fertile. Le lendemain matin lorsque des spermatozoïdes sont retrouvés dans les frottis vaginaux, on considère la rate à son jour 1 de gestation sur 22. Des rates non gestantes d’âge comparable prise au hasard dans leur cycle œstral ont servi de contrôle. Au 22<sup>e</sup> jour de gestation les rates sont sacrifiées par décapitation et les vaisseaux utérins sont aussitôt prélevés. Les rats ont accès tout le long de leur séjour à la nourriture (Teklad Rodent Chow) et l’eau du robinet *ad libitum*. Ils sont hébergés dans un environnement avec luminosité (de 6:00 à 18:00) et température (21±3°C) contrôlées. Cette étude a été approuvée par le comité local de protection des animaux qui est accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux.

**Tableau 2 :** Les amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR des récepteurs aux œstrogènes.

Gène cible		Séquence 5'-3'	Amplicon
ER $\alpha$ (RT)		GATCACAAGTGGACTTGGCCAAAGG	372 bp
ER $\alpha$ (PCR)	Sens	GGTCCAATTCTGACAATCGACGCC	
	Anti-sens	CCAAGTCATCTCTCTGACGCTTGTGC	
ER $\beta$ (RT)		GGGACGGCTCACCAGCACATTGG	405 bp
ER $\beta$ (PCR)	Sens	GAAGCAAGATCACTAGAGCACACC	
	Anti-sens	GCTCAGGCAGTGTACCTGCTCGC	
GAPDH	Sens	GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGT	205 bp
	Anti-sens	GACCCCTTCATTGACCTCAACTACA	

#### *Immunobuvardage de type Western*

Les vaisseaux utérins ou mésentériques destinés à l'immunobuvardage de type Western ont été placés après dissection dans une solution froide de Krebs bicarbonate (KBS) oxygénée, composée de (en mmol/L) : 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, et 5.5 dextrose. Les tissus adipeux et conjonctifs sont retirés pour ne laisser que les vaisseaux sanguins qui sont aussitôt congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Lors de l'expérience, les tissus sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur (Tissue-Tearor™, Biospec inc.) dans un tampon d'homogénéisation (250 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA). L'homogénat est ensuite centrifugé 10 minutes à 3000rpm (Sorval RMC14) et le surnageant est conservé. La concentration en protéine de l'homogénat est évaluée par dosage de Bradford [127] (Bio-Rad). Du tampon de chargement (Laemmli)[128] est ajouté à chaque échantillon dans une proportion 1:4 (volume/volume). Quarante-cinq microgrammes de protéines sont déposés dans chaque puit. La migration se fait par SDS-PAGE avec un gel concentrateur 5% acrylamide et un gel séparateur de 7,5% acrylamide pour les NOS et 10% acrylamide pour

les ERs. La migration se fait en une heure sous un courant constant de 150V. Le transfert sur membrane de nitrocellulose se fait à 75V pendant 2 heures suivant la méthode de Towbin [129]. Pour l'analyse western, la membrane est incubée durant toute la nuit avec une solution de blocage de TBS-Tween (150mM NaCl, 50mM Tris, 0,1%(v/v) Tween 20, pH 7.5) contenant 5% lait évaporé. L'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage se fait pendant une heure et l'incubation avec l'anticorps secondaire correspondant se fait pendant 30 minutes, tous deux à température ambiante. La révélation s'effectue avec le kit ECL d'Amersham et l'exposition se fait sur des films ECL. La quantification de l'intensité des bandes a été effectuée par le logiciel Alpha Imager (Alpha Innotech Inc). L'expression de la  $\beta$ -actine est évaluée pour chaque échantillon et sert à standardiser la quantité de protéines dans chaque puit.

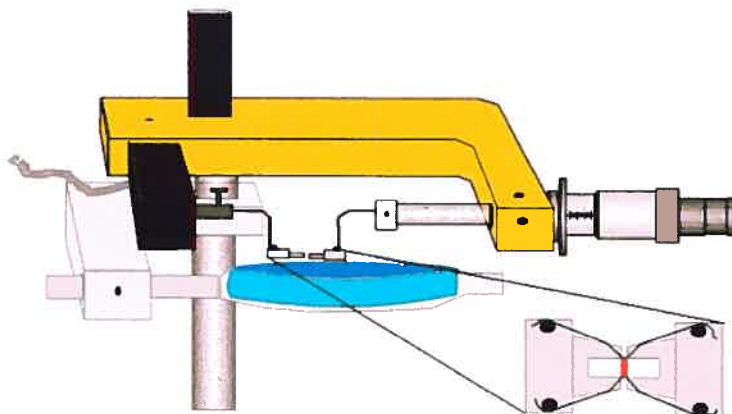
#### *Réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une transcription inverse (RT-PCR)*

À partir des tissus congelés (voir section précédente) l'ARN total de ces tissus fut extrait suivant la technique de Chomczynski & Sacchi [130] utilisant le TRIzol™ (Invitrogen) et quantifié par spectrophotométrie. À partir de cet ARN total, nous avons synthétisé l'ADN complémentaire (ADNc) spécifique à l'aide de la Transcriptase inverse Superscript II™ (Invitrogen) et d'une amorce spécifique au gène d'intérêt. À partir de cet ADNc, nous avons amplifié par PCR utilisant la Taq DNA polymérase (Invitrogen) une région spécifique du gène d'intérêt en utilisant des amorces internes (nested primers). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. Les signaux sont révélés en incubant le gel dans une solution de bromure d'éthidium 0,02%. L'intensité des bandes est ensuite quantifiée en utilisant le logiciel Alpha Imager (Alpha Innotech Inc). Pour chaque échantillon nous amplifions également l'ARNm du GAPDH qui est notre gène rapporteur afin de standardiser la quantité d'ARN de chaque échantillon.

#### *Études pharmacologiques des effets aigus de l'œstrogène*

Immédiatement après avoir sacrifié les animaux, les deux cornes utérines avec leur vasculature sont retirées et immergées dans du KBS froid oxygéné. Un segment de l'artère utérine principale entre 1,5 et 2 mm de longueur est isolé et nettoyé des tissus conjonctif et adipeux. Pour étudier l'effet de l'œstrogène sur les muscles lisses des vaisseaux nous avons éliminé l'endothélium. Ceci est obtenu en plaçant une canule dans le vaisseau que nous

perfusons avec une solution aqueuse de Triton X-100 (0,03%) et rinçons avec du KBS. Deux fils de tungstène sont ensuite introduits dans la lumière du vaisseau. Les extrémités des fils sont attachées sur les supports du myographe à microvaisseaux (Kent scientific, modifié)



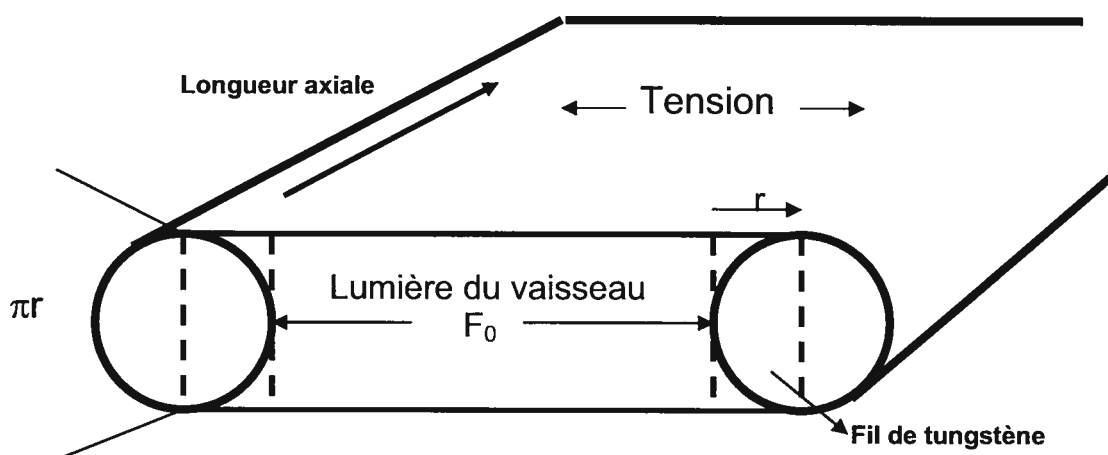
**Figure 12** : Système de myographe à microvaisseaux (*schéma de Sicotte B.*)

Un des supports est relié à un transducteur de force (Kent Scientific) et l'autre à un micromètre gradué. Les étirements sont enregistrés sous forme de tension par un ordinateur en utilisant un système d'acquisitions de données par le logiciel PolyVIEW (Grass-Telefactor). Le segment d'artère utérine est baigné dans 5 mL de solution de Krebs oxygénée (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>), à pH 7.4. La solution est changée aux 15 minutes environ. Le vaisseau est d'abord étiré durant une période de 10 min. et laissé à reposer sans tension 10 minutes. Cette opération se fait trois fois consécutive, elle permet d'éviter l'hystérèse du vaisseau lors des étapes subséquentes. Nous effectuons ensuite des étirements cumulatifs de 50 µm avec une période de stabilisation (~ 3 minutes) entre chaque étirement. Nous distendons le vaisseau jusqu'à atteindre ~ 2 à 3 mN/mm (1mN = 102 mg) dépendamment du diamètre du segment vasculaire. Ceci nous permet de tracer une courbe longueur-tension passive spécifique au vaisseau. On détermine la longueur d'étirement ( $F_{60}$ ) nécessaire pour obtenir une circonférence équivalente à une tension passive de 60 mmHg sur le vaisseau suivant la loi de Laplace ( $L_{60}$ ). Après une équilibration du vaisseau à  $L_{60}$  pendant 30 minutes, la réactivité du segment vasculaire est évaluée par l'application de à 1 µM de phényléphrine. Une fois le plateau de réponse atteint, nous vérifions si de l'endothélium fonctionnel est encore présent en ajoutant 10 µM carbachol, un agoniste cholinergique et vasodilatateur dépendant de l'endothélium. Ensuite, le KBS baignant les tissus est changé

plusieurs fois et celui-ci est laissé à reposer 60 minutes. À ce moment, on ajoute un des modulateurs pharmacologiques (L-NAME 0.1 mmol/L, ICI 182,780 20  $\mu\text{M}$ ). Après quinze minutes, on stimule le vaisseau avec 1  $\mu\text{M}$  de phényléphrine et au plateau de réponse, nous appliquons des concentrations croissantes cumulatives d'œstrogène (17 $\alpha$ -E<sub>2</sub> ou 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) afin d'obtenir une courbe concentration-relaxation

#### *Mesure du diamètre interne des vaisseaux*

Le diamètre interne de chacun des vaisseaux sanguins est mesuré à l'aide du système de myographe. Pour déterminer la circonférence interne au repos ( $L_0$ ), nous devons mesurer la longueur maximale entre les 2 fils de tungstène qui ne provoque pas de lecture sur le transducteur à pression ( $F_0$ ). À partir de cette mesure, nous sommes capables de calculer la circonférence interne du vaisseau au repos avec la formule suivante :  $L_0 = 2F_0 + 4r + 2\pi r$  où  $r$  est le rayon d'un fil de tungstène (12,5  $\mu\text{M}$ ). Une représentation de ce concept est illustrée à la figure 13. Une fois que nous avons le  $L_0$ , il devient simple d'obtenir le diamètre interne :  $D_{\text{int}} = L_0 \div \pi$ .



**Figure 13 :** Représentation schématique d'un segment d'artère monté sur deux fils de tungstène. Les différentes variables nécessaires au calcul de la circonférence interne du vaisseau sont représentées. (Schéma de Sicotte B.)



### *Analyse des résultats*

Pour les immunobuvardages western, l'intensité de chaque bande a été rapportée par comparaison à l'intensité de la  $\beta$ -actine du même échantillon. L'intensité standardisée des échantillons de chaque groupe a été comparée aux autres en utilisant un test de « t » pour des données non paires. La même analyse a été faite pour les expériences de RT-PCR en standardisant l'intensité de chaque échantillon par comparaison à l'expression du GAPDH.

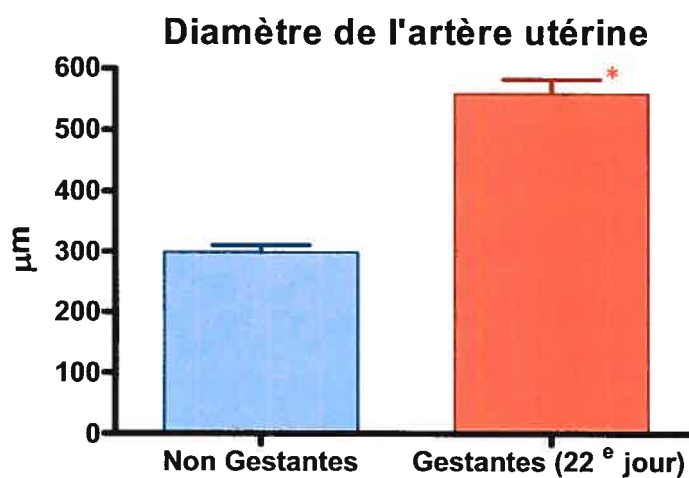
Pour les expériences pharmacologiques, les courbes longueur-tension ont été modélisées à l'équation exponentielle suivante  $y = Ae^{\beta c}$  où « A » est la tension à  $L_{60}$ , «  $\beta$  » représente la variation proportionnelle de la circonférence requise pour modifier la tension de la paroi de son état de repos et « c » est la variation proportionnelle de la circonférence interne du segment d'artère à l'étirement imposé.

Chaque courbe concentration-relaxation a été analysée par régression non linéaire par ordinateur selon l'équation (Prism, Graphpad software):  $Y = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{(\text{Log}EC_{50} - X) \text{Pente}}}$  où « X » est le logarithme de la concentration de l'agoniste et « Y » est la réponse obtenue (% relaxation). Le  $EC_{50}$  est la concentration d'œstrogène nécessaire pour obtenir 50% de la réponse maximale. Les courbes ont été comparées entre elles avec un test de F (Prism), en partageant le paramètre comparé ( $EC_{50}$  ou  $E_{\max}$ ).

### 3. Résultats

#### *Remodelage de l'artère utérine*

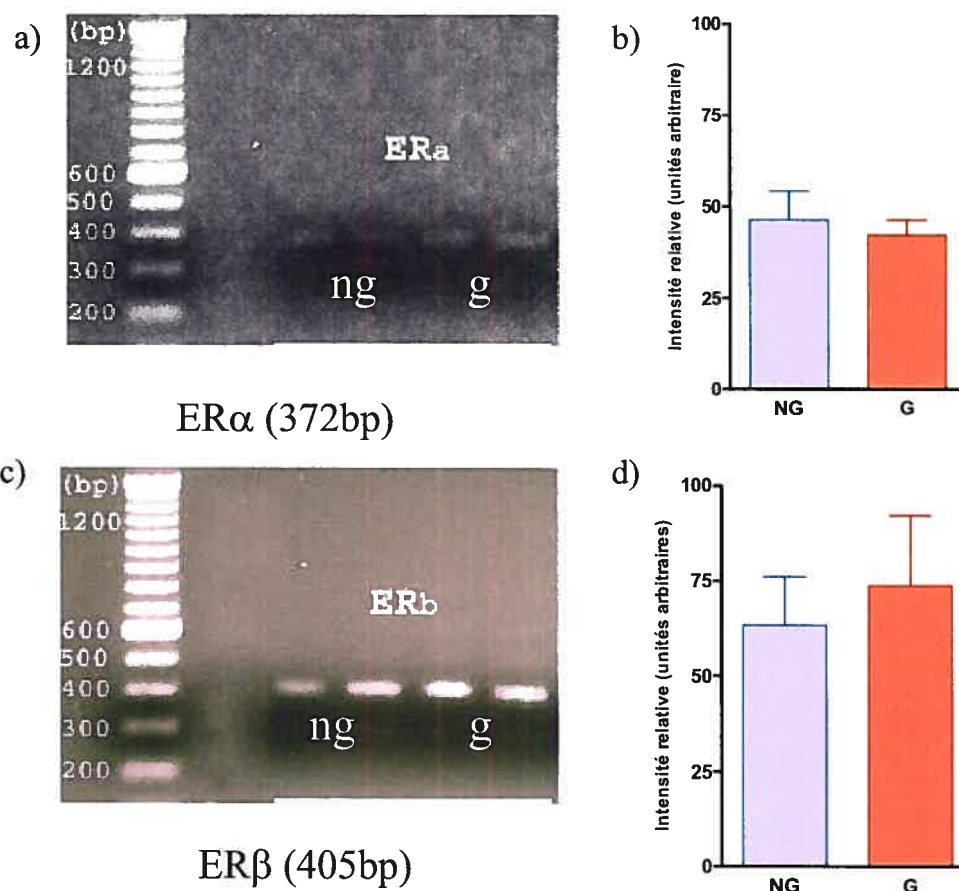
Il a été démontré que le diamètre de l'artère utérine arquée doublait en fin de gestation [35]. La figure 14 montre que le même phénomène est observé sur l'artère utérine principale. Le diamètre moyen de l'artère utérine chez la rate non gestante est de  $300 \pm 12 \mu\text{m}$  et de  $559 \pm 24 \mu\text{m}$  durant la gestation pour un échantillon de 12 rates dans chaque groupes. Ce qui suggère fortement un remodelage dans ces artères durant la gestation.



**Figure 14 :** Diamètre de l'artère utérine principale chez la rate non gestante et gestante. (n = 12) (\* p<0,001)

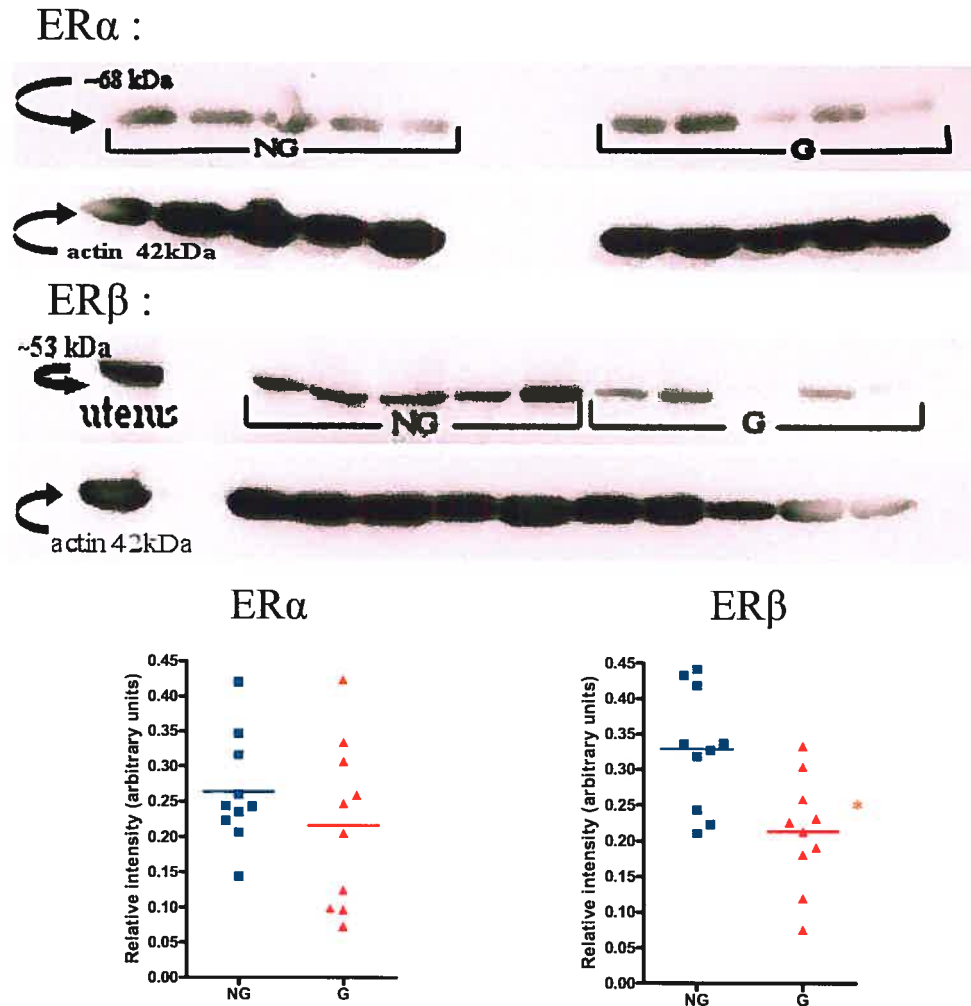
#### *Expression des récepteurs aux œstrogènes*

Contrairement au GAPDH, l'expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans la vasculature utérine semblent être relativement faible. En effet, l'amplification des messagers de ER $\alpha$  et ER $\beta$  par une simple RT-PCR n'était pas suffisante. Pour obtenir un signal visible avec du bromure d'éthidium sur gel d'agarose nous devions à partir de 5uL de produit de RT-PCR refaire une deuxième amplification. Les résultats obtenus avec ces expériences (Fig.15) ne nous ont pas permis de constater une différence significative de l'expression des différents messagers durant la gestation.



**Figure 15 :** Expression par RT-PCR de l'ARN messager des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) dans les vaisseaux utérins de rates gestantes (G) et non gestantes (NG) a) et c) : exemple de RT-PCR avec 2 animaux pour chaque groupe b) et d) : comparaison entre G et NG de la quantification relative de ER $\alpha$  et ER $\beta$  respectivement. (n = 6).

Nous nous sommes alors tourné vers des immunobuvardages de type western avec des anticorps dirigés spécifiquement contre ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . La figure 16 nous montre l'expression de ces protéines dans la vasculature utérine de rates non gestantes et gestantes. Nous observons donc une nette diminution de l'expression de ER $\beta$  en fin de gestation dans la vasculature utérine, alors que l'expression de ER $\alpha$  n'est pas changée.



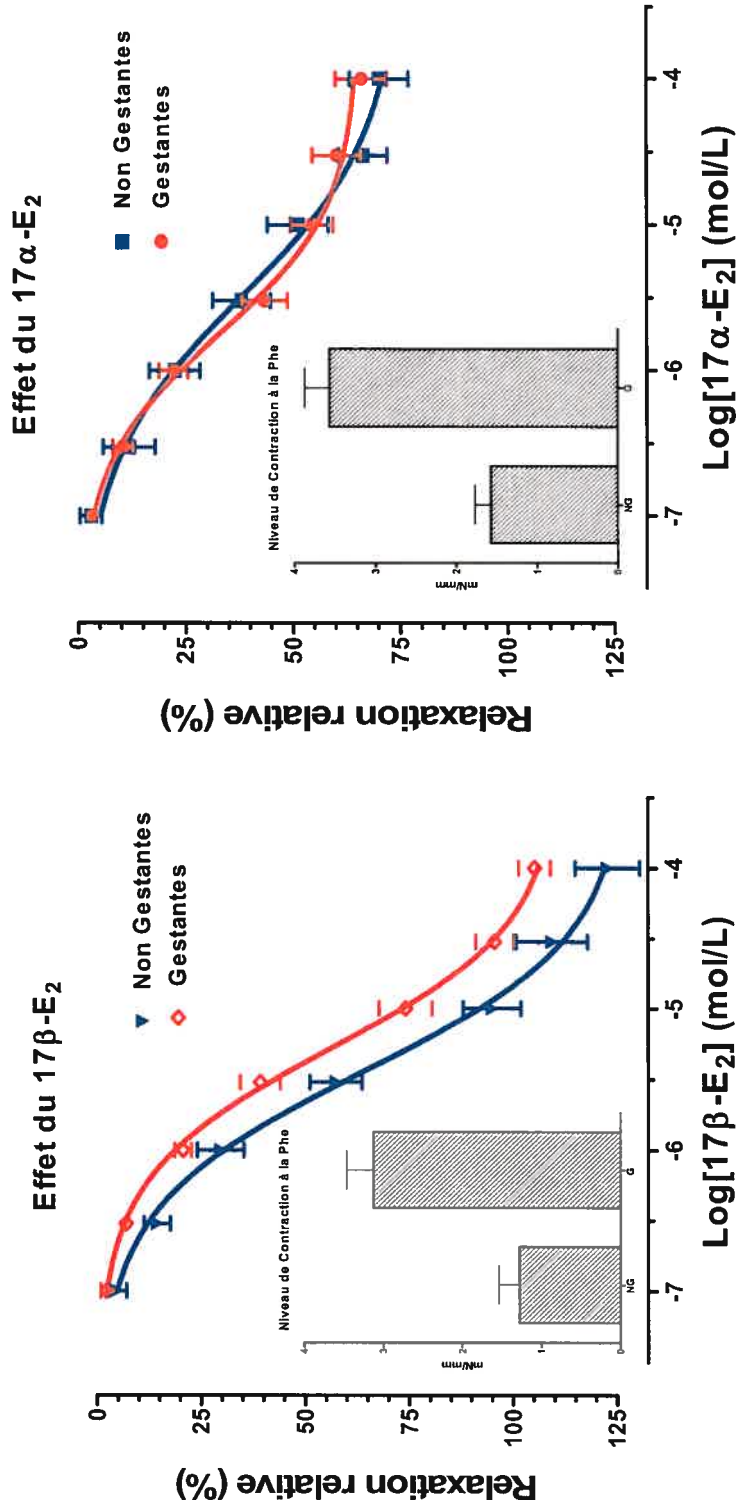
**Figure 16 :** Expression protéique des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) dans les vaisseaux utérins de rates gestantes (G) et non gestantes (NG). Immunobuvardages représentatifs avec cinq animaux différents dans chaque groupe. Ces résultats ont été quantifiés et compilés avec d'autres immunobuvardages pour comparer entre les deux groupes (n = 10). (\* p<0,01)

#### *Les effets non génomiques des œstrogènes*

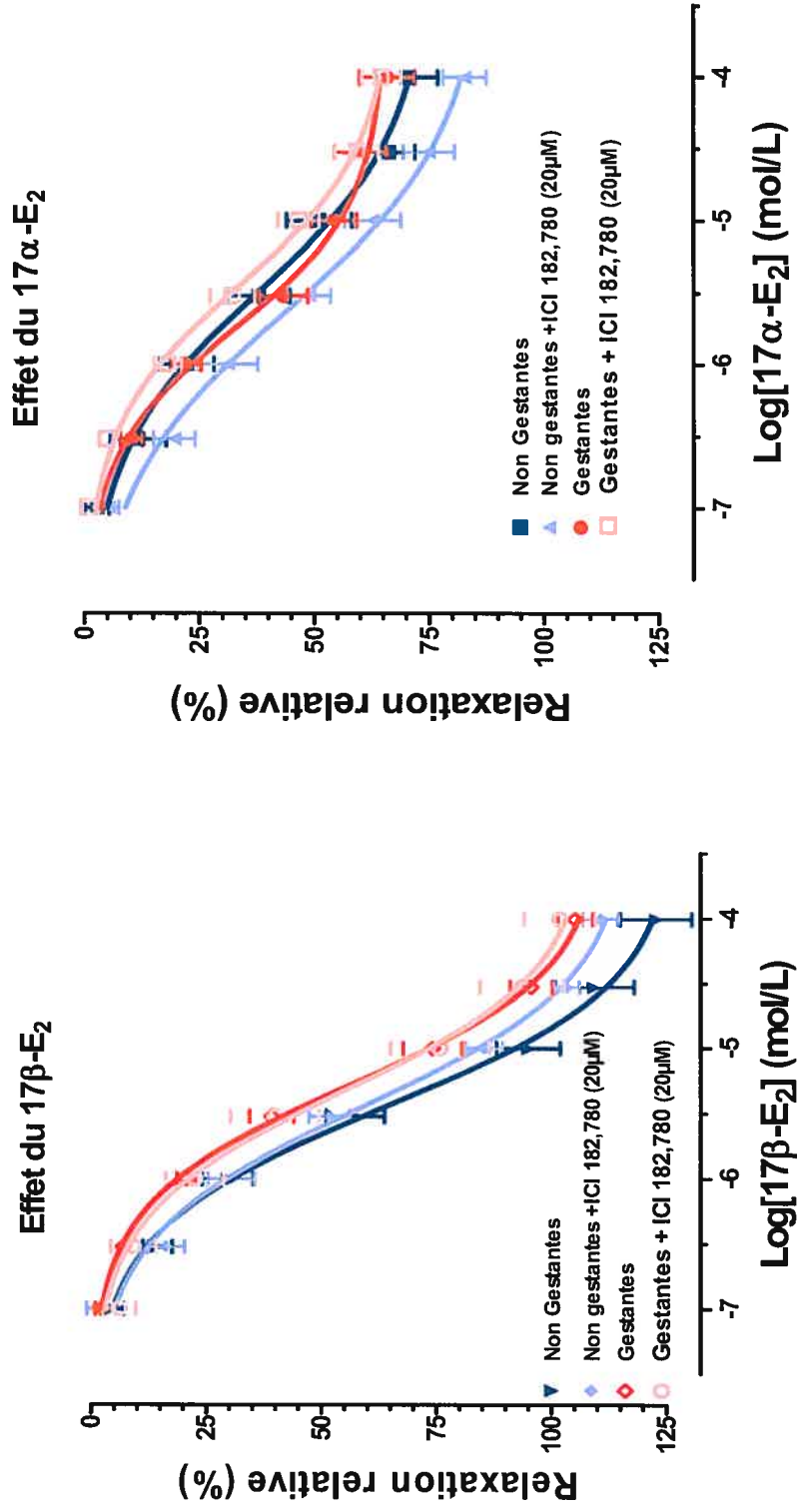
Les expériences de relaxation avec l'œstrogène ont été faites avec des artères utérines dénudées d'endothélium qui ont été précontractées avec de la Phe (1 $\mu$ M). L'absence d'endothélium fonctionnel est confirmée lorsque aucune relaxation n'est obtenue

en ajoutant 10  $\mu\text{M}$  carbachol, un agoniste cholinergique et vasodilatateur dépendant de l'endothélium, après contraction à la Phe. Dans un premier temps, nous avons vérifié si les artères utérines principales, comme les artères arquées montraient une différence de réactivité au  $17\beta\text{-E}_2$  durant la gestation. La Figure 17 montre que la relaxation observée dans les artères utérines de rates non gestantes ( $127.9 \pm 8.4\%$ ) au  $17\beta\text{-E}_2$  est significativement plus importante que chez les gestantes ( $111.7 \pm 5.7\%$ ). Par la suite, nous avons mesuré la relaxation induite par le  $17\alpha\text{-E}_2$ . Ce stéréo-isomère de l'œstradiol endogène, le  $17\beta\text{-E}_2$ , se lie aux récepteurs des œstrogènes avec une affinité beaucoup plus faible [103]. À la figure 17, on observe que le  $17\alpha\text{-E}_2$  induit aussi une relaxation dépendante de la concentration ( $75.8 \pm 9.6\%$  pour NG), qui est cependant la moitié de celle obtenue avec le  $17\beta\text{-E}_2$  ( $127.9 \pm 8.4\%$ ). D'autre part, la réponse au  $17\alpha\text{-E}_2$  n'est pas modifiée par la gestation ( $75.8 \pm 9.6\%$  pour NG et  $67.8 \pm 3.9\%$  pour G). Pour vérifier si la concentration élevée de molécule hydrophobe pouvait être la cause de la relaxation observée en altérant la fluidité des membranes plasmiques des CMLV. Pour ce faire, nous avons refait ces travaux en remplaçant l'œstrogène par du cholestérol. Le cholestérol n'amène aucune relaxation des artères utérines principale aux mêmes concentrations que celles utilisées pour les œstrogène (résultats non montrés).

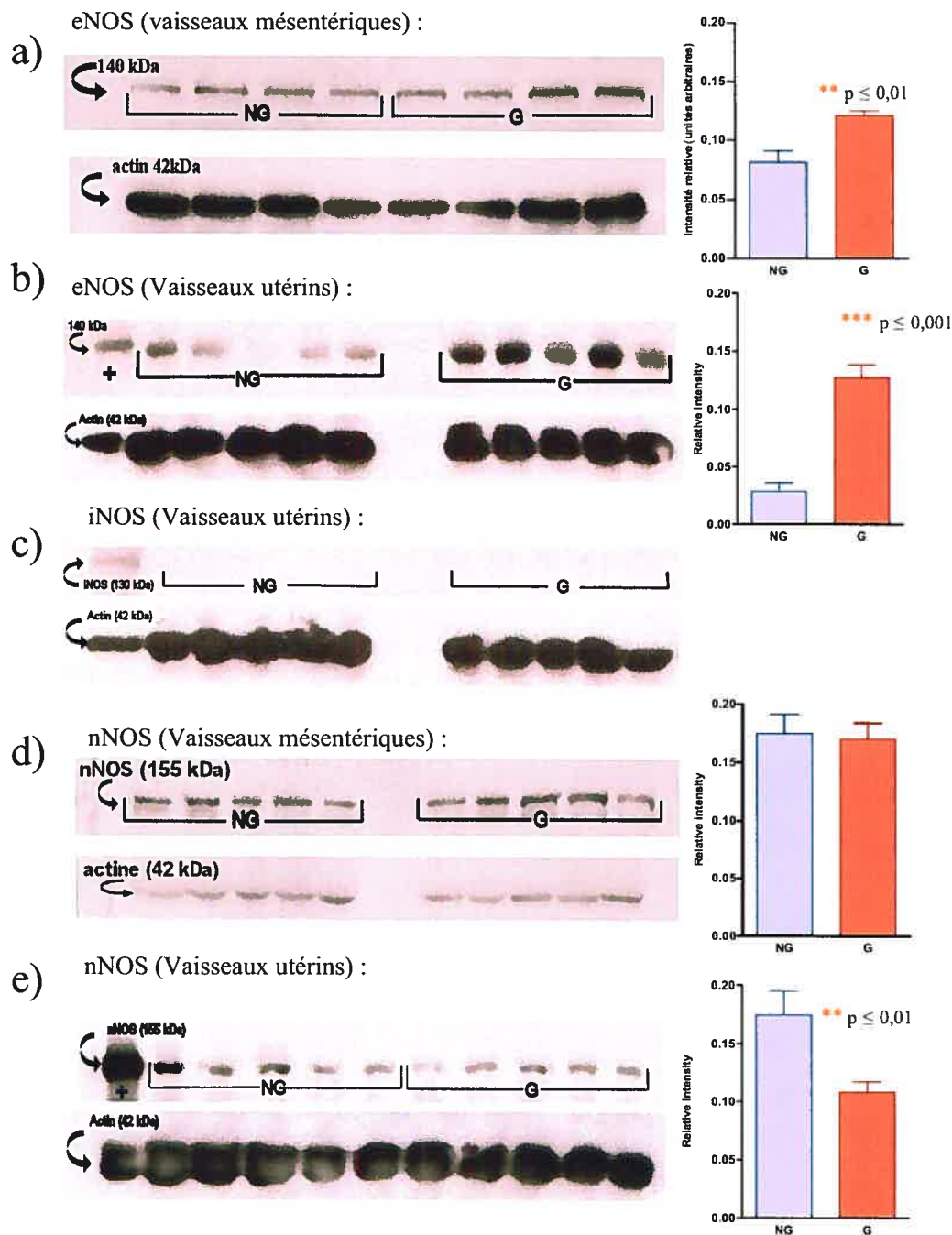
Pour mieux comprendre la nature de cet effet relaxant, nous avons préincubé les vaisseaux en présence de ICI 182,780 20 $\mu\text{M}$  (un antagoniste « pure » des récepteurs aux œstrogènes décrit à la section 1.2.3.1). On constate que le ICI 182,780 n'a aucun effet sur les relaxations induites par le  $17\beta\text{-E}_2$  et le  $17\alpha\text{-E}_2$  (Fig.18) sur les artères des rates gestantes et non gestantes. Ceci montre que l'effet vasorelaxants des deux œstradiols, sur les artères utérines n'est pas véhiculé par un récepteur nucléaire aux œstrogènes, ER $\alpha$  ou ER $\beta$ .



**Figure 17 :** Courbes de relaxation du 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> et du 17 $\alpha$ -E<sub>2</sub> dans des artères utérines principales contractées avec de la phényléphrine (1  $\mu$ mol/L) chez des rates gestantes (G) et non gestantes (NG) (n = 10)



**Figure 18 :** Courbes de relaxation du 17β-E<sub>2</sub> et du 17α-E<sub>2</sub> dans des artères utérines principales contractées avec de la phényléphrine (1μmol/L) et préincubées avec du ICI 182,780 (20μM) chez des rates gestantes et non gestantes (n = 10)



**Figure 19** : Expression protéique des différentes NOS dans les vaisseaux utérins et mésentériques de rates gestantes (G) et non gestantes (NG). a : (n = 4) b,c,d,e,f : (n = 5)

Pour évaluer les quantités en NOS dans les artères en fonction de la gestation, nous avons effectué des immunobuvardages de type western avec des anticorps spécifiques pour les différents isoformes de NOS. Nous avons premièrement évalué l'expression de la eNOS



dans les vaisseaux utérins et dans les vaisseaux mésentériques, comme exemple de vaisseaux systémique. Dans la figure 19, nous remarquons que dans les deux types de vasculature, l'expression de eNOS est significativement augmentée en fin de gestation. Plus particulièrement, l'augmentation observée dans les vaisseaux utérins (~4,5X) est plus importante que dans les vaisseaux mésentériques (~1,5X) (Fig.19a et 19b). D'autre part, la synthèse de NO inductible (iNOS) n'est pas détectable dans les vaisseaux utérins ni avant ou pendant la gestation (Fig. 19e). La situation est identique dans les vaisseaux mésentériques (non montré). Contrairement à la eNOS, la nNOS est diminuée en fin de gestation comparativement aux non gestantes, mais seulement dans les vaisseaux utérins (Fig. 19e). L'expression de la nNOS dans les vaisseaux mésentériques n'est pas changée en fin de gestation comparativement aux non gestantes (Fig. 19d).

Ces résultats montrent que la eNOS est considérablement augmentée dans les artères utérines de rates gestantes; ce qui ne devrait pas être impliqué dans les réponse myotropes obtenues (Fig. 17), puisque les tissus étaient dépourvus d'endothélium. Par contre, la nNOS est significativement diminuée ce qui est en accord avec les données fonctionnelles (Fig. 17).

## 4. Discussion

Le but de la présente étude était de caractériser l'effet vasorelaxant de l'œstrogène sur les artères utérines. Nous voulions évaluer les rôles possibles des différentes NOS et des récepteurs aux œstrogènes vis-à-vis de la relaxation rapide induite par les œstrogènes. Nous avons utilisé le remodelage de la circulation utérine durant la gestation pour tenter de mieux cerner le rôle de ces paramètres.

Nous avons tout d'abord démontré que le diamètre de l'artère utérine double avant parturition, comparativement aux rates non gestantes, suggérant que les vaisseaux utérins subissent un remodelage important durant la gestation. Ceci démontre que le remodelage qui s'opère sur l'artère utérine principale durant la gestation est comparable à celui observé dans les artères utérines arquées, comme décrit antérieurement [35]. Étant anatomiquement plus grosses, car les artères arquées sont des embranchements de l'artère principale, elles subissent un remodelage aussi important qui est proportionnel à leur calibre de départ.

Il a été démontré que l'œstrogène accroît le flot sanguin vers les organes reproducteurs femelles [56], ce qui corrèle avec l'augmentation de flot sanguin durant le cycle œstral et la gestation. Cependant, le mécanisme par lequel s'effectue l'augmentation du flot sanguin utérin induit par les œstrogènes demeure encore obscur. Nous voulions alors comparer l'expression des récepteurs aux œstrogènes au niveau des vaisseaux utérins en fonction de la gestation. Par RT-PCR, nous avons évalué l'expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans les vaisseaux utérins était très faible puisqu'il était nécessaire d'effectuer deux étapes d'amplification successives pour arriver à détecter un signal d'expression. Dans ces conditions, il est difficile de comparer de façon quantitative les niveaux d'expression en fonction de la gestation. Très peu d'études ont réussi à démontrer des variations des récepteurs aux œstrogènes dans les artères utérines avec cette technique. Jusqu'à présent seulement des études utilisant des cultures de cellules endothéliales d'artère utérine humaine [131] ou de CMLV humain[132] ont été publiées.

C'est pourquoi nous avons choisi par la suite la technique d'immunobuvardage de type western pour vérifier la présence des récepteurs aux œstrogènes. Dans la littérature, une étude datant de 1993 rapporte une augmentation de la liaison de l'œstrogène dans une préparation d'artère utérine en fin de gestation [8]. Cette étude ne discrimine pas entre les

deux sous-types de récepteur, le récepteur  $\beta$  n'étant pas encore identifié. Plus récemment, une étude a mesuré l'expression des deux sous-types de récepteurs dans l'artère utérine de rat Sprague-Dawley par immunohistochimie [133]. Malgré l'augmentation du flot sanguin utérin, les auteurs n'ont pas observé de différence d'expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  durant le cycle œstral. Pour notre part, nous n'avons observé aucun changement de l'expression de ER $\alpha$  tandis que ER $\beta$  était significativement moins abondant en fin de gestation dans les vaisseaux utérins. Ceci laisse à penser qu'une partie des effets de l'œstrogène, qui permettent d'augmenter le flot sanguin durant la gestation, est due à la diminution de ER $\beta$ , ce qui permettait une augmentation relative de l'activité de ER $\alpha$ . Car, comme il a été mentionné précédemment (section 1.2.3), des évidences suggèrent que ER $\beta$  agit comme répresseur de l'activité de ER $\alpha$ , à des concentrations non saturantes d'œstrogène [110]. Une autre possibilité est que le nombre de récepteurs soit diminué par la présence d'œstrogène. Ce phénomène a été décrit pour ER depuis quelques années et se nomme l'autorégulation négative (autologous down-regulation) [134]. Cependant, on ne sait pas encore si ER $\beta$  subit le même type de régulation. Une étude récente suggère que ER $\beta$  n'est pas régulé par ce mécanisme dans des cellules musculaires lisses d'aorte humaine, mais il l'est dans les cellules MCF-7 [135]. Les recherches devront être poursuivies pour expliquer pourquoi nous observons une diminution de ER $\beta$  mais pas de ER $\alpha$  dans les artères utérines durant la gestation. Pour ce qui est de l'étude de Leiberman [8] il est aussi possible que l'augmentation de liaison observée soit simplement due à l'hyperplasie des cellules de l'artère utérine qui augmenterait le nombre total de sites liaisons dans la vasculature entière sans pour autant signifier une augmentation de l'expression des récepteurs de la part de ces cellules.

L'objectif suivant de ce projet était d'évaluer les effets vasorelaxants aigus de l'œstrogène et de voir l'influence de certains modulateurs pharmacologiques sur ces relaxations. Mais avant tout, considérons que les effets vasorelaxant aigus des œstrogènes sont généralement observés à des concentrations pharmacologiques, i.e. significativement plus élevées que les concentrations physiologiques de l'hormone. Cependant, l'expérience en elle-même et la sensibilité de détection de l'instrumentation amènent ce biais, car pour être capable de mesurer les effets vasorelaxants des œstrogènes nous devons induire un tonus dans le vaisseau sanguin qui permet une relaxation mesurable. Il est convenu d'utiliser dans ses conditions un vasoconstricteur à un concentration supérieure à l'EC<sub>50</sub>. Ce faisant, les concentrations de l'agent vasorelaxant que nous devons utiliser sont aussi

supraphysiologiques. Ajoutons que l'œstrogène circulant n'existe pas seulement sous forme libre, mais aussi liée à l'albumine ou encore à des globulines liant les hormones sexuelles (*sex hormone binding globuline*). Ces œstrogènes liés à des protéines peuvent se dissocier dans les capillaires et ainsi permettre une concentration d'œstrogènes libres au tissu cible d'au moins dix fois supérieure à celles mesurées dans le plasma [136]. Il a aussi été démontré que des cellules pourraient synthétiser leurs propres œstrogènes. Par exemple, les surrénales chez les humains et d'autres primates sécrètent dans la circulation d'importante quantité d'un précurseur des œstrogènes, le DHEA. Celui-ci peut être ensuite converti en œstrogène dans les cellules cibles ou bien être directement converti et agir dans la même cellule où il est synthétisé [137]. Une autre étude a démontré que les CMLV chez l'humain, mais pas l'endothélium, exprime l'aromatase (i.e. l'œstrogène synthétase) [138]. Cette enzyme catalyse l'étape finale de la biosynthèse des œstrogènes. Ce qui suggère fortement que l'œstrogène peut agir de façon paracrine ou autocrine dans les muscles lisses vasculaires. Même si d'autres études sont requises pour confirmer ces observations, il n'en demeure pas moins que ces travaux avec des concentrations élevées d'œstrogènes nous apparaissent pertinents.

Nous avons démontré que le  $17\beta$ -E<sub>2</sub> induit une relaxation de l'artère utérine. Comme ce fut le cas dans les artères arquées, la relaxation maximale est plus importante chez les non gestantes que les gestantes. À notre connaissance, aucune étude n'a comparé ce phénomène ou démontré cette différence. Nous avons ensuite montré que le stéréoisomère  $17\alpha$ -E<sub>2</sub> permet, lui aussi, une relaxation de l'artère utérine chez les deux groupes de rates, quoique l'effet maximal est environ la moitié de celui produit par le  $17\beta$ -E<sub>2</sub>. Nous avons utilisé ce stéréoisomère comme un exemple d'œstrogène qui se lie aux récepteurs classiques des œstrogènes avec une très faible affinité par comparaison au ligand endogène, le  $17\beta$ -E<sub>2</sub>. En fait, l'affinité de liaison relative pour chacun des récepteurs des œstrogènes a été mesurée en prenant comme référence le  $17\beta$ -E<sub>2</sub> avec une valeur de 100. Donc, l'affinité du  $17\alpha$ -E<sub>2</sub> pour ER $\alpha$  est 58 et 11 pour ER $\beta$  [103]. Dans la littérature, une étude rapporte que la relaxation rapide de l'artère mésentérique induite par le  $17\alpha$ -E<sub>2</sub> est identique à celle obtenue avec le  $17\beta$ -E<sub>2</sub> [139], alors qu'une autre démontre que le  $17\alpha$ -E<sub>2</sub> amène une faible relaxation comparée au  $17\beta$ -E<sub>2</sub> [140]. Nos travaux s'apparentent plus à cette dernière étude, mais la comparaison demeure difficile, étant donné qu'elles n'ont pas été effectuées chez des artères utérines, mais bien mésentériques chez des rats mâles. Ces

deux vasculatures ont des fonctions et propriétés différentes. Par exemple, la réactivité à phényléphrine durant la gestation dans les artères mésentériques est diminuée [141], tandis qu'elle est augmentée dans les artères utérines arquées [35]. Toutefois, nos résultats comparatif des effets du  $17\alpha\text{-E}_2$  et du  $17\beta\text{-E}_2$  nous suggèrent que le premier agirait comme agoniste partiel de l'effet vasorelaxant des oestrogènes. Pour tenter d'expliquer cette observation, nous avons mesuré les effets des deux stéréoisomères d'oestrogènes en préincubant nos segments d'artères avec un antagoniste pur des ERs, le ICI 182,780. Cet antagoniste des ERs n'a pas bloqué la relaxation engendrée par le  $17\alpha\text{-E}_2$  et le  $17\beta\text{-E}_2$ . Cette dernière observation suggère l'implication, dans la relaxation induite par  $\text{E}_2$ , d'un site de liaison différent des ERs. À notre connaissance, aucune autre étude n'a rapporté une telle observation dans les artères utérines. Par contre, une relaxation induite par les oestrogènes, non bloquée par un antagoniste des ERs, a aussi été décrite dans d'autres types vasculaires, comme les vaisseaux mésentériques de rat [140] et les coronaires de chien [142]. Cependant, l'effet vasorelaxant du  $17\beta\text{-E}_2$  est partiellement inhibé par le ICI 182,780 dans l'aorte de rat [143]. Ce qui pourrait suggérer que le mécanisme par lequel l'oestrogène exerce cette relaxation serait différent d'un type vasculaire à l'autre. Ceci nous amène plutôt à suggérer que l'œstradiol induit la relaxation des artères utérines via un mécanisme qui n'implique pas les ERs, mais qui doit quand même être stéréospécifique puis que le  $17\alpha\text{-E}_2$  amène une relaxation significative plus faible que l'oestrogène endogène, donc agissant comme agoniste partiel, mais avec la même affinité.

Nous avons démontré que les artères utérines relaxent en réponse au  $17\beta\text{-E}_2$  de façon identique à nos observations antérieures dans les artères utérines arquées (Lapointe, Sicotte et St-Louis; non publié). C'est-à-dire que la relaxation suivant une stimulation à la phényléphrine dans ces artères dénudées d'endothélium est plus importante chez les non gestantes que chez les gestantes. De plus, cette relaxation augmentée des non gestantes a été caractérisée dans les artères arquées comme provenant de la production de NO musculaire.

Nous avons démontré par immunobuvardage que l'expression de eNOS augmente durant la gestation dans les vaisseaux mésentériques et utérins de rat. Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres études effectuées chez d'autres espèces [50;51], dont l'humain [52]. De plus, nous avons aussi observé que l'augmentation relative de eNOS dans les

vaisseaux utérins est plus élevée que celle dans les vaisseaux mésentériques. Encore une fois, ceci est identique à ce qui a été observé chez la brebis [51]. Malgré tout, ces augmentations d'expression de eNOS ne peuvent pas être corrélées avec les relaxations engendrées par l'œstrogène que nous avons obtenues, étant donné que ces expériences pharmacologiques ont été effectuées sur des artères utérines dénudées d'endothélium et que la eNOS se retrouve presque exclusivement dans l'endothélium [144].

Ensuite, nous n'avons pas été en mesure de détecter la iNOS ni dans les vaisseaux utérins ni dans les vaisseaux mésentériques. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui n'ont pas détecté de iNOS dans les vaisseaux utérins ou dans des vaisseaux de résistances [144;145] d'animaux ou d'humain [52]. Il faut néanmoins spécifier que cela ne permet pas de conclure qu'il n'y a pas d'expression de iNOS. Mais, du moins, la quantité est excessivement faible et ne peut pas être détectée par immunobuvardage western.

En dernier lieu, nous avons démontré que l'expression de la nNOS ne variait pas dans les vaisseaux mésentériques, mais qu'elle était significativement diminuée dans les vaisseaux utérins en fin de gestation. Ces résultats sont plutôt surprenants puisque jusqu'à présent, la nNOS a été détectée dans les artères utérines humaines, mais les auteurs n'ont pas été en mesure de voir une différence d'expression durant la gestation [52]. Cependant, d'après les auteurs, à cause de certaines difficultés dans l'obtention de ces résultats, ceux-ci devraient être réétudiés. En effet, la méthode de dissection est semble-t-il très difficile et plusieurs échantillons n'avaient pas de nNOS détectable. Le groupe de Rosenfeld a rapporté une augmentation d'expression de nNOS dans l'artère utérine de brebis suivant l'administration de  $17\beta$ -E<sub>2</sub> quotidiennement [146]. Quoiqu'il en soit, nous suggérons que la nNOS serait responsable de la production de NO dans les CMLV de l'artère utérine des non gestantes. Et cette production de NO permet la plus grande relaxation induite par le  $17\beta$ -E<sub>2</sub> et serait perdue chez la gestante lorsque l'expression de nNOS est substantiellement diminuée.

## 5. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que l'artère utérine principale est l'objet d'un remodelage qui amène son diamètre à doubler en fin de gestation. Nous avons démontré que durant la gestation il y a une diminution de l'expression de ER $\beta$ , alors que celle de ER $\alpha$  est inchangée. Nos résultats suggèrent que la relaxation des artères utérines induite par l'œstrogène est indépendante des récepteurs nucléaires aux œstrogènes. Finalement, la relaxation au 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> réduite dans les vaisseaux utérins chez les gestantes serait due à la diminution de nNOS dans ces vaisseaux.

À la lumière de tous ces résultats, nous devons réfuter partiellement l'hypothèse que nous avons émise au départ. En effet, nous avons suggéré que l'effet vasorelaxant aigu des œstrogènes dans les vaisseaux utérins est en partie médié par une NOS musculaire présente chez les non gestantes et que l'activation de cette enzyme est dépendante des récepteurs aux œstrogènes. Nos résultats suggèrent plutôt que l'effet vasorelaxant de l'œstrogène sur les muscles lisses vasculaires des artères utérines serait en partie médié chez les non gestantes par du NO musculaire provenant des nNOS et passerait par une voie indépendante des récepteurs aux œstrogènes, mais qui possède néanmoins une certaine stéréospécificité.

## 6. Perspectives :

Cette étude amène d'autres perspectives de recherche. Il serait très intéressant à court terme de pouvoir identifier par quel effecteur l'œstrogène agit sur les CMLV pour amener la plus grande partie de la relaxation qui n'est pas occasionnée par la libération de NO de la nNOS. Le modèle proposé (Fig.20) montre les différentes possibilités d'action de l'œstrogène. Il sera intéressant de vérifier si cette relaxation pourrait être occasionnée par une activation de canaux potassiques. Ce qui aurait comme conséquence d'hyperpolariser la cellule et de nuire à l'entrée de calcium dans la cellule. Alternativement, l'œstrogène pourrait agir directement sur des canaux calciques membranaires, ce qui diminuerait significativement l'entrée de calcium dans les CMLV. Une autre possibilité de l'action relaxante de l'œstrogène sur les CMLV serait qu'il se lierait sur un récepteur ou un site de liaison autre que les récepteurs des œstrogènes connus. Ce nouvel effecteur pourrait se retrouver à la membrane, confirmant des études utilisant de l'œstrogène conjugué à la BSA [76]. Ce récepteur, pourrait être le récepteur ER-X proposé par le groupe de Toran-Allerand [147] ou bien un tout autre récepteur[148]. Des études supplémentaires seront nécessaires pour parfaire les connaissances sur les effets de l'œstrogène.





## 6. Bibliographie

- [1] Tulchinsky D, Hobel CJ. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117: 884-893.
- [2] Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, Hopper K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34: 312-318.
- [3] Lindberg BS, Johansson ED, Nilsson BA. Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17beta and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1974; 32: 21-36.
- [4] Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112: 1095-1100.
- [5] Klopper A, Masson G, Campbell D, Wilson G. Estriol in plasma. A compartmental study. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117: 21-26.
- [6] Tulchinsky D, Simmer HH. Sources of plasma 17alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35: 799-808.
- [7] Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MRA, Milne CM. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: Correlation with renal studies. *J Endocrinol* 1987; 113: 435-444.
- [8] Leiberman JR, Wiznitzer A, Glezerman M, Feldman B, Levy J, Sharoni Y. Estrogen and progesterone receptors in the uterine artery of rats during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 51: 35-40.
- [9] de Rijk EPCT, van Esch E, Flik G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 271-282.
- [10] Gibori G. The corpus luteum of pregnancy. In *The Ovary*. New York: Raven press; 1994: 261-317.
- [11] Bedford CA, Challis JRG, Harrison FA, Heap RB. The role of oestrogens and progesterone in the onset of parturition in various species. *J Reprod Fert* 1972; 16: 1-23.
- [12] Kamath SG, Kelley LK, Friedman AF, Smith CH. Transport and binding in calcium uptake by microvillous membrane of human placenta. *Am J Physiol* 1992; 262: C789-C794.

- [13] Friedman F, Jr., Copperman AB, Brodman ML, Shah D, Sandler B, Grunfeld L. Perinatal outcome after embryo transfer in ovum recipients. A comparison with standard in vitro fertilization. *J Reprod Med* 1996; 41: 640-644.
- [14] Johnson MR, Abdalla H, Allman AC, Wren ME, Kirkland A, Lightman SL. Relaxin levels in ovum donation pregnancies. *Fertil Steril* 1991; 56: 59-61.
- [15] Knobil E, Neill J, Sherwood OD. *The physiology of Reproduction*, 2nd ed. ed. New York: Raven Press; 1994: 861-1009.
- [16] Burger LL, Sherwood OD. Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat. *Endocrinology* 1995; 136: 4820-4826.
- [17] Hwang JJ, Lee AB, Fields PA, Haab LM, Mojonier LE, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. V. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts development of the mammary apparatus and, hence, lactational performance in rats. *Endocrinology* 1991; 129: 3034-3042.
- [18] Beauséjour A. Un supplément sodique au cours de la gestation chez la rate: modèle proposé de pré-éclampsie. Université de Montréal; 2002.
- [19] Blanc B, Compte M, Boubli L. Les constantes biologiques au cours de la grossesse. In *Encyclopédie Médico-chirurgicale*. 1988: 1-24.
- [20] Ueland K, Metcalfe J. Heart disease in pregnancy. *Clin Perinatol* 1974; 1: 349-367.
- [21] Duvekot JJ, Peeters LL. Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: 830-839.
- [22] Roy-Clavel E, Picard S, St Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 608-613.
- [23] Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 296-302.
- [24] Duvekot JJ, Peeters LL. Maternal cardiovascular hemodynamic adaptation to pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: S1-14.
- [25] Gabbe SG, Neibyl JR, Simpson JL. *Obstetrics: Normal and problem pregnancies*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2001: 1-1500.
- [26] Moutquin JM, Bilodeau R, Raynault P, Amyot G, Blair JF, Labelle L, Rainville C, Gagnon L. [Prospective study of arterial pressure during pregnancy. Prediction of hypertensive complications]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1982; 11: 833-837.

- [27] St-Louis J, Massicotte G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1985; 37: 1351-1357.
- [28] Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Von Oeyon P, Papera S, Sealey JE, Laragh JH. Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med* 1980; 68: 97-104.
- [29] MacGillivray I, Rose GA, Rowe B. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci* 1969; 37: 395-407.
- [30] St Louis J, Massicotte G, Parent A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Medecine Science* 1988; 6: 358-365.
- [31] Abdul-Karim R, Assali NS. Pressor response to angiotensin in pregnant and non pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1961; 82: 246-251.
- [32] Dunne FP, Barry DG, Ferriss JB, Grealy G, Murphy D. Changes in blood pressure during the normal menstrual cycle. *Clin Sci (Lond)* 1991; 81: 515-518.
- [33] Tortora GJ, Grabowski SR. *Principes d'anatomie et de physiologie*, 9e edition ed. Éditions du nouveau pédagogique inc.; 2001.
- [34] Cipolla M, Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 805-811.
- [35] St-Louis J, Paré H, Sicotte B, Brochu M. Increased reactivity of uterine arcuate artery throughout pregnancy and postpartum. *Am J Physiol* 1997; 273: H1148-H1153.
- [36] Page KL, Celia G, Leddy G, Taatjes DJ, Osol G. Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1647-1652.
- [37] Chiasson RB. *Laboratory anatomy of the white rat*, second edition ed. Dubuque, Iowa: WM. C. Brown company publishers; 1958: 1-81.
- [38] Samadi AR, Mayberry RM, Zaidi AA, Pleasant JC, McGhee N, Jr., Rice RJ. Maternal hypertension and associated pregnancy complications among African-American and other women in the United States. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 557-563.
- [39] Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *N Engl J Med* 1996; 335: 257-265.
- [40] Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP. Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 2001; 37: 1191-1195.
- [41] Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 490-496.

- [42] Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 1983; 245: R720-R729.
- [43] Lunell NO, Lewander R, Mamoun I, Nylund L, Sarby S, Thornstrom S. Uteroplacental blood flow in pregnancy induced hypertension. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1984; 169: 28-35.
- [44] Abitbol MM, Gallo GR, Pirani CL, Ober WB. Production of experimental toxemia in the pregnant rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 124: 460-470.
- [45] Abitbol MM, Ober MB, Gallo GR, Driscoll SG, Pirani CL. Experimental toxemia of pregnancy in the monkey, with a preliminary report on renin and aldosterone. *Am J Pathol* 1977; 86: 573-590.
- [46] Combs CA, Katz MA, Kitzmiller JL, Brescia RJ. Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 215-223.
- [47] Clark KE, Durnwald M, Austin JE. A model for studying chronic reduction in uterine blood flow in pregnant sheep. *Am J Physiol* 1982; 242: H297-H301.
- [48] Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1316-1320.
- [49] Jo T, Takauchi Y, Nakajima Y, Fukami K, Kosaka H, Terada N. Maternal or umbilical venous levels of nitrite/nitrate during pregnancy and at delivery. *In Vivo* 1998; 12: 523-526.
- [50] Ni Y, Meyer M, Osol G. Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 856-864.
- [51] Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol* 1997; 272: H1730-H1740.
- [52] Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong Y-L, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 2000; 87: 406-411.
- [53] Baylis C, Vallance P. Nitric oxide and blood pressure: effects of nitric oxide deficiency. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 80-88.
- [54] Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1458-1466.

- [55] Beausejour A, Auger K, St Louis J, Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H375-H383.
- [56] Rosenfeld CR, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G. Effect of estradiol-17, on the magnitude and distribution of uterine blood flow in nonpregnant, oophorectomized ewes. *Pediatr Res* 1973; 7: 139-148.
- [57] Henson MC, Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxytriphethyl (MER-25). *Biol Reprod* 1991; 45: 43-48.
- [58] Challis JR. Molecular aspects of preterm labor. *Bull Mem Acad R Med Belg* 1998; 153: 263-270.
- [59] Walsh SW, Kittinger GW, Novy MJ. Maternal peripheral concentrations of estradiol, estrone, cortisol, and progesterone during late pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and after experimental fetal anencephaly and fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 37-42.
- [60] Ducsay C, Seron-Perre M, Germain A. Endocrine and uterine activity rhythms in the perinatal period. *Semin Reprod Endocrinol* 1993; 11: 285.
- [61] Punnonen R, Lukola A. Binding of estrogen and progestin in the human fallopian tube. *Fertil Steril* 1981; 36: 610-614.
- [62] Moriyama I, Sugawa T. Progesterone facilitates implantation of xenogenic cultured cells in hamster uterus. *Nat New Biol* 1972; 236: 150-152.
- [63] Hsueh AJ, Peck EJ, Jr., Clark JH. Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 1975; 254: 337-339.
- [64] Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811.
- [65] Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997; 18: 306-360.
- [66] Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000; 14: 121-141.
- [67] McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002; 108: 465-474.
- [68] Rosenfeld CR, Roy T, Cox BE. Mechanisms modulating estrogen-induced uterine vasodilation. *Vascul Pharmacol* 2002; 38: 115-125.
- [69] Falkenstein E, Tillmann H-C, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-555.

- [70] Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A. Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science* 1986; 233: 226-228.
- [71] Towle AC, Sze PY. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem* 1983; 18: 135-143.
- [72] Gu Q, Moss RL. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci* 1996; 16: 3620-3629.
- [73] Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* 1996; 137: 2163-2166.
- [74] Favit A, Fiore L, Nicoletti F, Canonico PL. Estrogen modulates stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by norepinephrine in rat brain slices. *Brain Res* 1991; 555: 65-69.
- [75] Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 1997; 138: 4030-4033.
- [76] Beyer C, Karolczak M. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J Neurosci Res* 2000; 59: 107-116.
- [77] Gerald P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res* 2003; 93: 399-405.
- [78] Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 1994; 89: 52-60.
- [79] Salas E, Lopez MG, Villarroya M, Sanchez-Garcia P, De PR, Dixon WR, Garcia AG. Endothelium-independent relaxation by 17-alpha-estradiol of pig coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 1994; 258: 47-55.
- [80] Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995; 91: 1154-1160.
- [81] Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997; 273: L119-L126.
- [82] Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.

- [83] Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 1997; 81: 885-892.
- [84] Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 677-682.
- [85] McNeill AM, Duckles SP, Krause DN. Relaxant effects of 17 beta-estradiol in the rat tail artery are greater in females than males. *Eur J Pharmacol* 1996; 308: 305-309.
- [86] Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 17 beta-Estradiol inhibits Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release induced by thromboxane A<sub>2</sub> in porcine coronary artery. *Circulation* 1995; 91: 2619-2626.
- [87] Stice SL, Ford SP, Rosazza JP, Van Orden DE. Role of 4-hydroxylated estradiol on reducing Ca<sup>2+</sup> uptake of uterine arterial smooth muscle cells through potential-sensitive channels. *Biol Reprod* 1987; 36: 361-368.
- [88] Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1034-1040.
- [89] Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases Ca<sup>2+</sup> efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: H926-H934.
- [90] Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol* 1997; 499 ( Pt 2): 497-511.
- [91] White RE, Darkow DJ, Falvo-Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK<sub>Ca</sub> channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995; 77: 936-942.
- [92] Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H319-H328.
- [93] White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, Catravas JD, Snead C, Carrier GO, Zhu S, Yu X. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 650-661.
- [94] Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 1996; 79: 1024-1030.



- [95] Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, . Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7889-7893.
- [96] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5925-5930.
- [97] Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 353-365.
- [98] Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51: 941-951.
- [99] Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 1994; 264: 1455-1458.
- [100] Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1167-1177.
- [101] Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH, Mader S. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1411-1427.
- [102] O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1859-1875.
- [103] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138: 863-870.
- [104] Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 105-112.
- [105] Warnmark A, Almlöf T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E. Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 2001; 276: 23397-23404.
- [106] Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056-1061.
- [107] Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15677-15682.

- [108] Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 2001; 89: 534-539.
- [109] Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 1441-1454.
- [110] Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140: 5566-5578.
- [111] Tremblay A, Tremblay GB, Labrie C, Labrie F, Giguere V. EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1998; 139: 111-118.
- [112] Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 1991; 51: 3867-3873.
- [113] Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer* 2000; 89: 817-825.
- [114] Allain P. *Pharmacologie, Les médicaments*, third edition ed. CdM Éditions; 2000: 1-500.
- [115] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
- [116] Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 81-88.
- [117] Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1361-1366.
- [118] Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 1472-1478.
- [119] Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, McMillan A, Bao C, Kozlovsky C, Hand TA, Johnson RC, Mains RE, Eipper BA, Lowenstein CJ. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 993-999.
- [120] Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1543-1552.

- [121] Shukovski L, Tsafirri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 1994; 135: 2287-2290.
- [122] Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 3: 96-111.
- [123] Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor. *J Perinat Med* 1998; 26: 448-457.
- [124] Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod* 1996; 11: 1755-1766.
- [125] Hefler LA, Tempfer CB, Moreno RM, O'Brien WE, Gregg AR. Endothelial-derived nitric oxide and angiotensinogen: blood pressure and metabolism during mouse pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R174-R182.
- [126] Yallampalli C, Dong YL, Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases the fetal mortality in pre-eclampsia rats induced by NG-nitro-Lmethyl ester. *Hum Reprod* 1996; 11: 895-899.
- [127] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- [128] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. In, 227 ed. 1970: 680-683.
- [129] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
- [130] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- [131] Hodges YK, Richer JK, Horwitz KB, Horwitz LD. Variant estrogen and progesterone receptor messages in human vascular smooth muscle. *Circulation* 1999; 99: 2688-2693.
- [132] Tschugguel W, Dietrich W, Zhegu Z, Stonek F, Kolbus A, Huber JC. Differential regulation of proteasome-dependent estrogen receptor alpha and beta turnover in cultured human uterine artery endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2281-2287.
- [133] Andersson C, Lydrup ML, Ferno M, Idvall I, Gustafsson J, Nilsson BO. Immunocytochemical demonstration of oestrogen receptor beta in blood vessels of the female rat. *J Endocrinol* 2001; 169: 241-247.

- [134] Saceda M, Lippman ME, Chambon P, Lindsey RL, Ponglikitmongkol M, Puente M, Martin MB. Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 1157-1162.
- [135] Barchiesi F, Jackson EK, Imthurn B, Fingerle J, Gillespie DG, Dubey RK. Differential regulation of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2373-2381.
- [136] Pardridge WM. Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones. *Am J Physiol* 1987; 252: E157-E164.
- [137] Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 185-212.
- [138] Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H, Takagi Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res* 1999; 84: 1285-1291.
- [139] Naderali EK, Walker AB, Doyle P, Williams G. Comparable vasorelaxant effects of 17alpha- and 17beta-oestradiol on rat mesenteric resistance arteries: an action independent of the oestrogen receptor. *Clin Sci (Lond)* 1999; 97: 649-655.
- [140] Shaw L, Taggart MJ, Austin C. Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 555-565.
- [141] St-Louis J, Paré H, Roy B, Brochu M. Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: Effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Invest* 1995; 2: 516-522.
- [142] Sudhir K, Chou TM, Mullen WL, Hausmann D, Collins P, Yock PG, Chatterjee K. Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 807-814.
- [143] Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Pinto A, Cirino G. 17- $\beta$ -oestradiol-induced vasorelaxation *in vitro* is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1695-1700.
- [144] Salhab WA, Shaul PW, Cox BE, Rosenfeld CR. Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am J Physiol* 2000; 278: H2134-H2142.
- [145] Vagnoni KE, Shaw CE, Phernetton TM, Meglin BM, Bird IM, Magness RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. III. Ovarian and estrogen effects on NO synthase. *Am J Physiol* 1998; 275: H1845-H1856.

- [146] Rosenfeld CR, Chen C, Roy T, Liu X. Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 205-215.
- [147] Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 2002; 22: 8391-8401.
- [148] Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 2004; 145: 1069-1074.