

Université de Montréal

**Étude des différences mâle/femelle au niveau de la
repolarisation cardiaque**

par
Judith Brouillette

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en pharmacie
option pharmacologie

07, 2005

© Judith Brouillette, 2005



W

4

U58

2005

V.176

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

Cette thèse intitulée :

Étude des différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque

présentée par :
Judith Brouillette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Huy Ong, président-rapporteur
Dr Céline Fiset, directrice de recherche
Dr Jacques Billette, membre du jury
Dr Isabelle Deschênes, examinatrice externe
Dr Lucie Parent, représentante du doyen de la FES

Résumé

Comparées aux hommes, les femmes ont des intervalles QT corrigés (QTc) plus longs sur l'ECG et sont plus susceptibles de développer des torsades de pointes, une arythmie ventriculaire sévère. Des études épidémiologiques suggèrent que les androgènes puissent être impliqués dans ces différences. Par contre, leurs rôles et mécanismes d'action sont inconnus. Une étude antérieure réalisée au laboratoire a démontré que la repolarisation des souris femelles était plus lente que celle des mâles. Ce retard était dû à une densité plus faible du courant potassique (K^+) à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}) et de son canal associé, Kv1.5, dans les ventricules de souris femelles. Nous avons exploité ce modèle afin de vérifier l'implication des androgènes dans ces différences. Puisque la souris possède plusieurs courants K^+ ventriculaires, nous avons d'abord validé une méthode permettant de les étudier individuellement. À l'aide de cette méthode et de techniques de biologie moléculaire, nous avons comparé la repolarisation ventriculaire (canaux/courants K^+ , potentiels d'action, intervalles QTc) de plusieurs modèles présentant divers niveaux d'androgènes. En premier lieu, nous avons démontré que des souris castrées présentaient une repolarisation plus longue que celle des mâles intacts. Fait intéressant, la repolarisation des mâles castrés ressemblait à celle des femelles. Ces résultats suggéraient fortement que les différences mâle/femelle étaient dus aux androgènes. L'accès à une lignée de souris (C57BL/6) ayant des niveaux de testostérone endogène extrêmement faibles nous a permis de confirmer ces résultats. En effet, nous avons démontré que la repolarisation ventriculaire de ces souris était similaire entre les sexes. Nous avons ensuite traité les mâles à la dihydrotestostérone et avons observé des temps de repolarisation plus courts qui étaient alors différents de ceux des femelles.

Le courant responsable des différences mâle/femelle chez la souris, I_{Kur} , n'est pas présent dans le ventricule humain. Il ne peut donc être responsable de la différence dans les intervalles QTc. Par contre, il est possible que les courants jouant un rôle similaire chez l'humain, les composantes rapide et lente du courant K^+ à rectification retardée, I_{Kr} et I_{Ks} , pourraient être impliqués. Nous avons testé cette

hypothèse en étudiant la repolarisation ventriculaire du cobaye, qui possède ces deux courants. Nos résultats ont démontré que contrairement aux humains et aux souris, les cobayes mâles et femelles présentaient des intervalles QTc de durées comparables. Une étude approfondie n'a relevé aucune différence entre les sexes au niveau des potentiels d'action et des courants/canaux K^+ . Ces résultats suggèrent que le cobaye ne soit pas un modèle optimal pour l'étude des différences reliées au sexe au niveau de la repolarisation cardiaque.

Ces données démontrent clairement que les androgènes régulent la repolarisation cardiaque et qu'ils sont grandement impliqués dans les différences mâle/femelle. Elles soulignent aussi l'importance de vérifier le statut hormonal des animaux utilisés pour des études touchant l'électrophysiologie cardiaque. Ces études constituent un précédent pour des recherches sur des tissus humains. Finalement, une augmentation des connaissances sur les différences reliées au sexe dans la physiologie cardiaque aidera à développer des stratégies thérapeutiques améliorées afin de prévenir le développement de torsades de pointes.

Mots-clés : électrophysiologie, cœur, ventricule, hormones sexuelles, souris, cobaye.

Abstract

Compared to men, women have longer rate corrected QT intervals (QTc) on the ECG and are more prone to develop torsades de pointes, a potentially lethal ventricular arrhythmia. Several epidemiological studies suggest a role for androgens in these differences. However, the precise involvement and underlying mechanisms of male sex hormones in this phenomenon remain unknown. A study from our laboratory showed that female mice had delayed ventricular repolarization compared to males. This prolonged repolarization was associated with a smaller density of the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and of its corresponding channel, Kv1.5, in female ventricle. We took advantage of this model to verify the implication of male sex hormones in this phenomenon. Since mouse possesses multiple ventricular K^+ currents that activate simultaneously, we first validated a method that allows separation of these currents. The use of this method combined with molecular biology techniques allowed us to compare ventricular repolarization (K^+ channels/currents, action potentials, QTc intervals) of several mouse models with various androgens levels.

First, we showed that androgen deficiency induced by castration leads to lengthening of ventricular repolarization in male mouse heart. Indeed, castrated male mice had prolonged ventricular repolarization compared with intact male mice but similar to that of females. These results strongly suggested that male sex hormones were involved in the observed sex differences in mouse repolarization. Access to a naturally occurring model of low androgens levels (C57BL/6 male mice) further confirmed these data. Indeed, these mice exhibited similar ventricular repolarization than their female counterparts. Furthermore, androgen replacement in the C57BL/6 male mice fastened ventricular repolarization.

The current regulated by androgens and responsible for the difference in mouse repolarization, I_{Kur} , is not present in human ventricle. In this tissue however, two others currents, the rapid and the slow component of the delayed rectifier K^+ current (I_{Kr} and I_{Ks}) contribute to the repolarization phase of the ventricular action

potential. We thus postulated that one or both of these K^+ currents could be different between men and women and may explain the longer repolarization time observed in females. To test this hypothesis, we compared repolarization in male and female guinea pigs that express these currents. As opposed to the results obtained in humans and mice, guinea pigs did not display sex difference in QTc intervals. Furthermore, a comprehensive electrophysiological study revealed comparable K^+ channels/currents densities and action potential duration between the two genders. Accordingly, guinea pig may not be a suitable model to study gender difference in cardiac repolarization.

In summary, these results provide strong evidence that androgens are involved in the sex difference observed in cardiac repolarization. Also, based on these findings, it appears that special attention should be paid to the hormonal status of the animal used when studying hormonal regulation of cardiac repolarization. These data provide guidance for future studies on human tissues. Finally, increasing knowledge about gender difference in cardiac electrophysiology will help to develop improved strategies to prevent torsades de pointes.

Keywords : electrophysiology, heart, ventricle, sex hormones, mouse, guinea pig.

Table des matières

CHAPITRE 1	Introduction	19
<i>1.1</i>	<i>Relation entre l'ECG, le potentiel d'action et les courants ioniques</i>	<i>19</i>
1.1.1	L'électrocardiogramme.....	19
1.1.2	Le potentiel d'action	19
1.1.2.1	Mécanismes cellulaires	19
1.1.2.2	Aspects physiologiques reliés à la durée du potentiel d'action	20
1.1.2.3	Aspects pathologiques reliés à la durée du potentiel d'action	21
1.1.3	Significations physiologiques de l'ECG.....	21
1.1.3.1	Controverse concernant l'onde T de la souris	23
1.1.4	Intervalle QT	24
1.1.4.1	Correction de l'intervalle QT pour le rythme cardiaque (QTc).....	25
1.1.4.1.1	Choix de la formule.....	26
1.1.5	Résumé.....	27
<i>1.2</i>	<i>Syndrome du QT long</i>	<i>28</i>
1.2.1	Syndrome du QT long congénital	28
1.2.1.1.1	LQTS1,5.....	30
1.2.1.1.2	LQTS2,6.....	31
1.2.1.1.3	LQTS3.....	31
1.2.1.1.4	LQTS4.....	32
1.2.1.1.5	LQTS7.....	32
1.2.2	Syndrome du QT long acquis.....	33
<i>1.3</i>	<i>Torsades de Pointes</i>	<i>34</i>
1.3.1	Historique.....	34
1.3.2	Caractérisation électrophysiologique des torsades de pointes	35
1.3.3	Mécanismes cellulaires responsables des torsades de pointes	36
1.3.4	Facteurs de risque.....	37
1.3.4.1	Le LQTS congénital et les situations à risque.....	37

1.3.4.1.1	Mécanismes pathologiques possiblement impliqués	38
1.3.4.2	Genre féminin.....	39
1.4	<i>Influence de l'âge et du sexe sur l'intervalle QTc</i>	40
1.5	<i>Influence du rythme cardiaque sur l'intervalle QTc</i>	41
1.6	<i>Influence des hormones sexuelles sur l'intervalle QTc</i>	42
1.7	<i>Modèles animaux utilisés pour étudier les différences mâle/femelle</i>	42
1.7.1	Introduction	42
1.7.2	Définitions.....	43
1.7.2.1	Reproduction et sexualité.....	43
1.7.2.2	Repolarisation cardiaque.....	44
1.7.3	Comparaison entre l'humain et divers modèles animaux	45
1.7.3.1	L'humain.....	45
1.7.3.2	Le chien.....	46
1.7.3.3	Le lapin.....	46
1.7.3.4	Le cobaye	47
1.7.3.5	Le rat	48
1.7.3.6	La souris	48
1.7.4	Recommandations.....	51
1.7.5	Modèle couramment utilisé.....	51
1.7.6	Choix de notre laboratoire.....	52
1.8	<i>Différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque - études expérimentales</i>	52
1.9	<i>Régulation hormonale des canaux Kv</i>	55
1.10	<i>Effet des hormones sexuelles mâles sur la repolarisation</i>	56
1.11	<i>Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse</i>	57
CHAPITRE 2	Méthode pour séparer les courants K⁺ fonctionnels dans le cœur de souris	59

CHAPITRE 3	Effet de la castration sur la repolarisation cardiaque de la souris.....	122
CHAPITRE 4	Importance des androgènes dans les différences de repolarisation reliées au sexe et à la lignée de souris.....	161
CHAPITRE 5	Caractérisation de la repolarisation cardiaque du cœur de cobayes mâles et femelles.....	198
CHAPITRE 6	Discussion.....	236
6.1	<i>Résumé des études présentées dans cette thèse.....</i>	236
6.2	<i>Comment réconcilier les résultats obtenus chez le cobaye et la souris? ..</i>	237
6.3	<i>Facteurs potentiellement impliqués dans la différence mâle/femelle</i>	238
6.3.1	Courant K^+ I_{to}	238
6.3.2	Courants ioniques autres que K^+	239
6.3.3	Sous-unités accessoires aux canaux ioniques	240
6.3.4	Régulation du calcium intracellulaire	241
6.3.5	Système nerveux autonome.....	242
6.3.6	Couplage cellulaire.....	242
6.3.7	Résumé.....	243
6.4	<i>Avancements scientifiques et impact des résultats.....</i>	243
6.4.1	Portée de la méthodologie proposée pour l'enregistrement de courants K^+ de souris	243
6.4.1.1	Essor du modèle de la souris pour l'étude du système cardiovasculaire.....	243
6.4.1.2	Importance de l'étude de la cinétique des courants K^+	244
6.4.1.2.1	Identification du rôle physiologique des courants K^+	244
6.4.1.2.2	Étude de la régulation des canaux K^+	245
6.4.1.2.3	Identification des mécanismes responsables de la prolongation de la repolarisation dans diverses situations pathologiques.....	246

6.4.1.3	Polyvalence de la méthode proposée	246
6.4.2	Progrès dans l'étude de la régulation hormonale de la repolarisation	247
6.4.2.1	Identification du rôle crucial des hormones sexuelles mâles dans la différence mâle/femelle.....	247
6.4.2.1.1	Mécanisme d'action des androgènes	248
6.4.2.1.2	Seuil d'androgènes nécessaire pour une action au niveau cardiaque... ..	249
6.4.2.1.3	Durée d'exposition requise pour un impact sur la repolarisation.....	250
6.4.2.1.4	Durée de déficience requise pour un impact sur la repolarisation.....	250
6.4.3	Importance du choix d'un modèle expérimental	251
6.4.3.1	Niveaux d'hormones et maturité sexuelle	251
6.4.3.2	Différence basale dans l'intervalle QTc	251
6.5	<i>Perspectives</i>	252
6.5.1	Régulation cardiaque par les hormones sexuelles féminines	252
6.5.2	Suite des travaux sur l'action des androgènes	254
6.5.2.1	Effet des androgènes au niveau du promoteur de Kv1.5	254
6.5.3	Suite des travaux sur la différence reliée au sexe dans la repolarisation cardiaque.	255
6.6	<i>Commentaires finaux</i>	256
	Bibliographie	257
	Liste des publications	276

Liste des tableaux

Tableau I: Formules permettant de calculer l'intervalle QTc.....	26
Tableau II: Caractéristiques des différents types de LQTS congénital.....	29
Tableau III: Liste de certains médicaments pouvant causer des torsades de pointes..	34
Tableau IV: Facteurs de risque pour les torsades de pointes	37
Tableau V: Évolution de la durée de l'intervalle QTc chez deux patients du LQTS ..	41
Tableau VI: Correspondance entre les courants et canaux K ⁺ présents dans le cœur des mammifères	45
Tableau VII: Niveaux de 17β-œstradiol et de progestérone détectés pendant le cycle sexuel des femmes et des femelles adultes de différentes espèces animales	49
Tableau VIII: Niveaux de testostérone et de DHT détectés chez les hommes et chez les mâles adultes de différentes espèces animales	49
Tableau IX: Âge de la maturité sexuelle selon le sexe et les espèces.....	50
Tableau X: Durée des différentes phases du cycle sexuel chez les femmes et chez les femelles adultes de différentes espèces animales	50

Liste des figures

Figure 1: Bases cellulaires sous-jacentes au potentiel d'action ventriculaire d'humain	20
Figure 2: Représentation schématique de la formation de signaux électriques pendant le déroulement d'une excitation au niveau d'un faisceau myocardique	22
Figure 3: Relation entre les potentiels d'action et l'ECG de l'homme et de la souris..	23
Figure 4: Bases cellulaires sous-jacentes à la repolarisation d'un potentiel d'action ventriculaire de souris	23
Figure 5: Illustration d'un ECG de souris comprenant un battement cardiaque	24
Figure 6: Relations entre l'intervalle QT, les intervalles QTc obtenus à l'aide de deux différentes formules et l'intervalle RR	27
Figure 7: Relation entre l'intervalle QT, le potentiel d'action et les courants ioniques	28
Figure 8: Exemple d'enregistrement de torsades de pointes	35
Figure 9: Fréquence des diverses situations dans lesquelles surviennent les symptômes cliniques des patients LQTS1-3	38
Figure 10: Potentiels d'action de myocytes ventriculaires isolés de souris mâles et femelles.	54
Figure 11: Courant K^+ $I_{K_{ur}}$ de myocytes ventriculaires de souris mâles et femelles ..	54
Figure 12: Relation entre les niveaux de DHT et la densité de $I_{K_{ur}}$ dans les différents modèles de souris étudiés dans cette thèse.....	248

Contribution des auteurs

Chapitre 2

Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of Physiology*. 2004; **559**: 777-798.

- Dr Clark, Giles et Fiset ont eu l'idée initiale du projet et ont établi les stratégies électrophysiologiques et pharmacologiques. J'ai suggéré des expériences additionnelles et ai fait l'acquisition de la moitié des résultats expérimentaux. J'ai compilé et analysé les données brutes sous la supervision de ma directrice de recherche. Dr Fiset a rédigé l'article en intégrant les commentaires de tous les auteurs.

Chapitre 3

Brouillette J, Trépanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *Journal of Physiology*. 2003; **546**: 403-413.

- Dr Fiset et moi avons élaboré le protocole de l'étude. J'ai réalisé la majeure partie des expériences, ai compilé, analysé et interprété les résultats. J'ai aussi rédigé la version initiale de l'article. Véronique Trépanier-Boulay a participé aux enregistrements d'électrophysiologie. Dr Fiset a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de l'article.

Chapitre 4

Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex- and Strain-Differences in Adult Mouse Cardiac Repolarization: Importance of Androgens. *Cardiovas Res.* 2005; **65**(1):148-157.

- J'ai fait une revue de la littérature qui a permis d'émettre l'hypothèse testée dans cet article. J'ai fait l'acquisition, la compilation et l'analyse des résultats électrophysiologiques. De plus, j'ai fait certains dosages d'hormones. Katy Rivard a effectué la majorité des dosages d'hormones et avec Éric Lizotte, a réalisé les études de "Western blot". J'ai rédigé la version initiale et Dr Fiset a produit la version finale de l'article.

Chapitre 5

Brouillette J, Lupien M-A, St-Michel C, Fiset C. Characterization of Cardiac Repolarization Between Male and Female Guinea Pig (soumis à *Cardiovas Res*).

- J'ai adapté et mis sur pied les protocoles expérimentaux qui ont été utilisés dans cette étude. J'ai fait l'acquisition de la majorité des résultats expérimentaux, aidée de Marie-André Lupien pour l'électrophysiologie et de Chantale St-Michel pour l'étude des cœurs isolés. Marie-Andrée Lupien a effectué les études de biologie moléculaire. J'ai compilé, analysé et interprété les résultats. J'ai ensuite rédigé la première version de l'article. Dr Fiset a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de l'article.

Liste des sigles et abréviations

4-AP: 4-aminopyridine

APD_{xx}: durée de potentiel d'action mesurée à xx % de la repolarisation ("action potential duration")

bpm: battement par minute

Ca²⁺: calcium

DHT: dihydrotestostérone

EAD: dépolarisation précoce ("early afterdepolarization")

ECG: électrocardiogramme

ERKO: "estrogen receptor knock out"

FORKO: "FSH receptor knock out"

FSH: hormone folliculostimulante

I_{Ca-L}: courant Ca²⁺ de type L

I_{K1}: courant K⁺ à rectification entrante

I_{Kr}: composante rapide du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Ks}: composante lente du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Kur}: courant K⁺ sortant à rectification retardée ultrarapide

I_{Na}: courant Na⁺

IP₃: inositol triphosphate

I_{ss}: courant K⁺ sortant soutenu

I_{to}: courant K⁺ transitoire sortant indépendant du Ca²⁺

JLN: Jervell-Lange-Nielsen

K⁺: potassium

LH: hormone lutéinisante

LQTS: syndrome du QT long ("long QT syndrome")

LQTSa: syndrome du QT long acquis

LQTSc: syndrome du QT long congénital

Na⁺: sodium

ORC: castré ("orchietomized")

OVX: ovariectomie, ovariectomisé

QTc: intervalle QT corrigé pour le rythme cardiaque

RR: intervalle entre deux complexes QRS consécutifs

RW: Romano-Ward

TdeP: torsades de pointes

*Je dédie cette thèse aux précieux êtres
de mon entourage qui, par leur bonne
humeur, leur ouverture et leur
confiance, me font encore plus aimer la
vie.*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Dr Céline Fiset, pour son encadrement exceptionnel. Tout au long de mes études supérieures, elle a été d'une disponibilité et d'une aide sans égal. De plus, sa très vaste connaissance du monde scientifique y a facilité mon entrée ainsi que mon développement. Finalement, ses conseils, sa gentillesse et ses encouragements m'ont motivée et ont accru ma confiance en moi. Je lui en suis extrêmement reconnaissante.

Les études présentées dans cette thèse sont le fruit d'un beau travail d'équipe. Je tiens donc à remercier chaleureusement mes collaborateurs(trices) Véronique Trépanier-Boulay, Chantale St-Michel, Marie-Andrée Lupien, Katy Rivard, Éric Lizotte, Wayne R. Giles, Robert B. Clark, Jade Huguet, Marc-Antoine Gillis et Louis-Robert Villeneuve.

Un merci tout spécial aux gens de mon laboratoire (V.T-B, C.St-M, M-A.L, K.R, E.L, Frédéric Mercier et Gracia El-Gabeily) et ceux des autres laboratoires et départements (Catherine Lavoie, Nathalie Éthier, Julie Guimond et Sylvain Durocher) qui par leur entregent et leur bonne humeur créent un environnement de travail stimulant et agréable. Finalement, je tiens à souligner la gentillesse et l'excellence de l'ensemble des membres du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal.

Je remercie mes parents, Lucie et Jacques, et ma sœur Véronique pour leur soutien inconditionnel et mon chum (maintenant mari) Florentin pour ses multiples encouragements prodigués tout au long de mes études et plus particulièrement dans les moments difficiles.

Finalement, je tiens à souligner l'aide financière des organismes CRSNG et IRSC dont j'ai bénéficié tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Je remercie aussi la faculté des études supérieures, l'Actualité pharmaceutique, la compagnie Aventis, le FRSQ ainsi que les fondations J.A de Sève, Bombardier et Marc Bourgie pour les bourses et prix reçus durant mes études supérieures.

CHAPITRE 1 Introduction

1.1 Relation entre l'ECG, le potentiel d'action et les courants ioniques

1.1.1 L'électrocardiogramme

L'électrocardiogramme (ECG) mesure l'activité électrique du cœur générée à chacun des battements cardiaques. Cette technique permet d'étudier le fonctionnement des cellules des nœuds sinusal et atrio-ventriculaire, des oreillettes et des ventricules. Ces cellules ont un point en commun: lorsqu'elles sont excitées, elles sont capables d'engendrer des événements électriques appelés potentiels d'action. C'est en fait la différence de voltage induite par les potentiels d'action qui est captée par l'ECG. Il est donc possible de corréliser chacune des ondes de l'ECG avec les phases des potentiels d'action des différentes cellules du cœur. Puisque cette thèse traite d'une arythmie ventriculaire, je ne traiterai que des signaux ventriculaires de l'ECG, soit le complexe QRS et l'intervalle QT. Avant de faire ces corrélations, définissons d'abord le potentiel d'action ventriculaire.

1.1.2 Le potentiel d'action

1.1.2.1 Mécanismes cellulaires

Le potentiel d'action ventriculaire est généré par le mouvement d'ions se dirigeant vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule. Il peut être divisé en cinq phases, de 0 à 4 (voir Figure 1, p.20). Tout d'abord, les canaux Na^+ s'ouvrent et laissent entrer massivement du Na^+ dans la cellule, ce qui la dépolarise (phase 0). Ensuite, ces canaux s'inactivent alors que le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}) s'active et cause la première phase de la repolarisation (phase 1). À leur tour, les courants Ca^{2+} de type-L et les composantes rapide et lente du courant K^+ à rectification retardée (I_{Kr} et I_{Ks}) s'activent, ce qui résulte en un

équilibre entre l'entrée d'ions Ca^{2+} et la sortie d'ions K^+ (phase 2; plateau). À leur tour, les canaux Ca^{2+} s'inactivent et les courants I_{Kr} , I_{Ks} ainsi que le courant K^+ à rectification entrante I_{K1} complètent la repolarisation (phase 3). Finalement, la pompe Na^+/K^+ -ATPase et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'affèrent à restaurer les gradients ioniques afin de permettre la génération du prochain potentiel d'action et le courant I_{K1} maintient le potentiel de repos stable (phase 4).

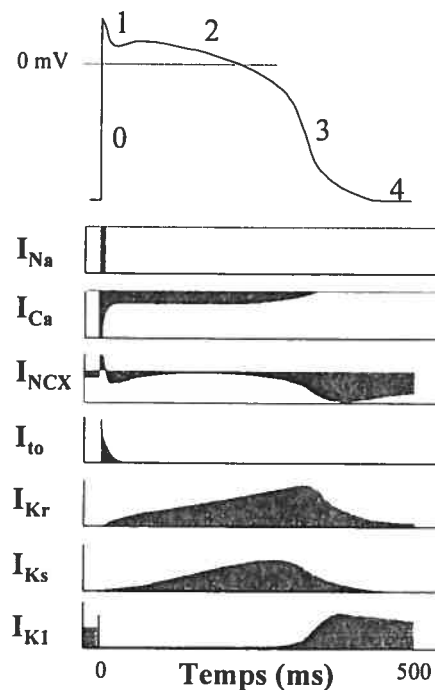


Figure 1: Bases cellulaires sous-jacentes au potentiel d'action ventriculaire d'humain
Adapté de ¹

1.1.2.2 Aspects physiologiques liés à la durée du potentiel d'action

Maintenant que l'aspect biophysique des potentiels d'action a été décrit, il est important d'exposer leur rôle. Les potentiels d'action sont essentiels à la bonne fonction du muscle cardiaque puisqu'ils synchronisent la contraction et permettent une éjection efficace du sang hors des ventricules. La durée du potentiel d'action régit deux paramètres très importants. Premièrement, elle détermine la période réfractaire, c'est-à-dire le temps durant lequel une cellule ne peut être stimulée. Cette période d'insensibilité est cruciale puisqu'elle prévient une contraction prématurée ainsi

qu'une contraction continue du muscle cardiaque. Ainsi, pendant ce temps, le ventricule peut se remplir et accumuler assez de sang pour la prochaine contraction. Deuxièmement, la durée du potentiel d'action détermine la quantité de calcium qui entre dans la cellule et par le même fait, la force de contraction. La durée du potentiel d'action est donc un paramètre crucial de la fonction cardiaque qui doit être finement contrôlé. Les canaux K^+ y jouent un grand rôle puisqu'ils sont les principaux responsables de la repolarisation.

1.1.2.3 Aspects pathologiques reliés à la durée du potentiel d'action

Il est connu qu'une variation à la hausse ou à la baisse de la durée du potentiel d'action peut être arythmogénique. En effet, un potentiel d'action trop court permet la réexcitation d'une cellule déjà stimulée et peut engendrer une déviation de l'influx électrique et des phénomènes de réentrée, qui sont liés à certains types d'arythmies. Un potentiel d'action trop long augmente l'incidence de dépolarisations précoces (EAD; "early afterdepolarization"). Ces dépolarisations peuvent exciter des myocytes adjacents et sont pressenties comme étant le point de départ de certaines arythmies.

1.1.3 Significations physiologiques de l'ECG

Sur l'ECG, la dépolarisation des myocytes ventriculaires se reflète par le complexe QRS et la repolarisation par l'onde T. La polarité de ces deux ondes est positive malgré le fait qu'elles soient associées respectivement à des courants négatifs (entrée de cations dans la cellule) et positifs (sortie de cations de la cellule). L'explication de ce paradoxe apparent se trouve dans l'ordre d'activation des couches ventriculaires. En effet, la dépolarisation se fait de la couche endocardique (interne) vers la couche épicaudique (externe) alors que la repolarisation se fait en sens opposé. Des courants négatifs et positifs voyageant en sens opposés engendrent sur l'ECG des signaux de même polarité, ce qui explique que le complexe QRS et l'onde T sont tous deux positifs (voir Figure 2, p.22). Par ailleurs, ce phénomène révèle que le potentiel d'action endocardique est plus long que celui de l'épicarde puisqu'il est le premier à être activé et le dernier à se repolariser. Cette hétérogénéité dans la durée des

potentiels d'action génère l'onde T. En effet, le pic de l'onde T, qui correspond à la plus grande différence de voltage observée pendant la repolarisation, est atteint lorsque le potentiel d'action de la cellule épocardique se termine alors que celui de la cellule endocardique se poursuit. La fin de l'onde T survient lorsque les deux types de cellules ont terminé leur repolarisation. À ce moment, le voltage des deux types de cellules est le même (potentiel de repos), ce qui fait une différence de voltage nulle et un signal plat sur l'ECG. Par conséquent, le temps entre le pic et la fin de l'onde T est une mesure de la dispersion des durées de potentiels d'action des deux couches.

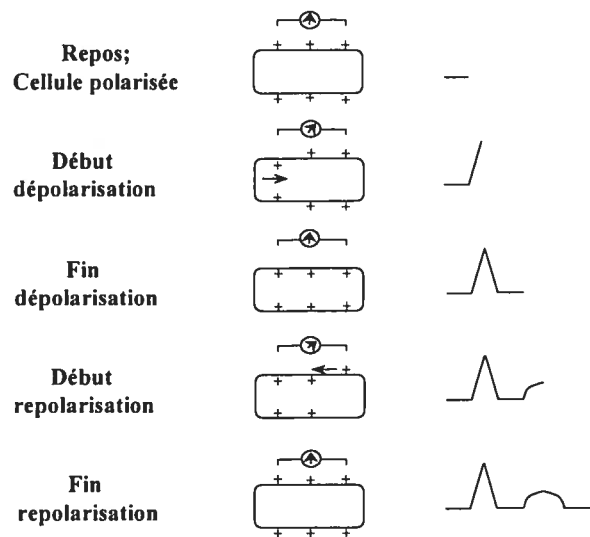


Figure 2: Représentation schématique de la formation de signaux électriques pendant le déroulement d'une excitation au niveau d'un faisceau myocardique. Noter que la dépolarisation et la repolarisation voyagent en sens inverse. Adapté de ²

En plus de refléter l'hétérogénéité des durées de potentiels d'action des diverses couches du myocarde, les caractéristiques de l'onde T varient aussi en fonction de la configuration des potentiels d'action. Par exemple, l'onde T de la souris est très différente de celle de l'humain puisque la morphologie de leurs potentiels d'action diffère grandement. En fait, l'onde T du rongeur comporte une phase rapide positive et une phase lente négative. La Figure 3, p.23, fait le parallèle entre les potentiels d'action et l'ECG et illustre bien les différences dans ces paramètres entre l'homme et la souris. Cette dissemblance provient entre autres de la différence de

composition et de densité des courants K^+ . La Figure 4, p.23, montre un potentiel d'action ventriculaire de souris ainsi que les courants K^+ impliqués dans la repolarisation. Il est possible de comparer ces courants à ceux de l'humain en se référant à la Figure 1, p.20.

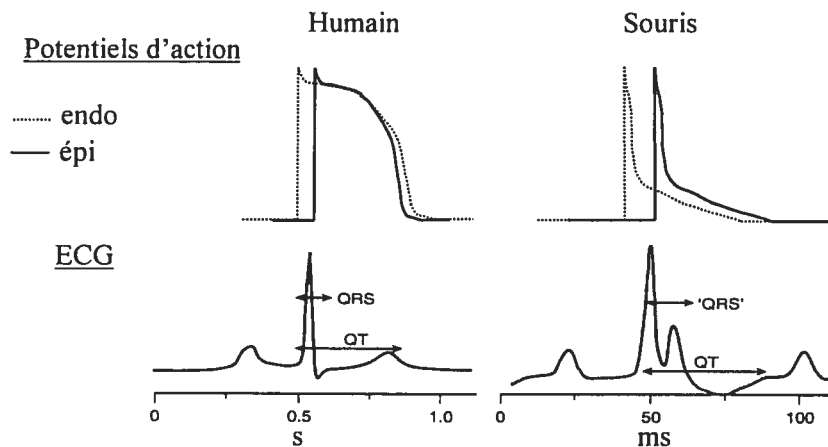


Figure 3: Relation entre les potentiels d'action et l'ECG de l'homme et de la souris
Adaptée de ³

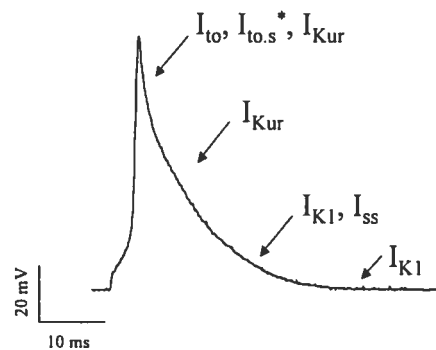


Figure 4: Bases cellulaires sous-jacentes à la repolarisation d'un potentiel d'action ventriculaire de souris

* Myocytes du septum seulement

1.1.3.1 Controverse concernant l'onde T de la souris

La forme non-conventionnelle de l'onde T de la souris a engendré un débat sur la détermination de l'intervalle QT. Tel qu'illustré à la Figure 5 (p.24), trois

possibilités ont été suggérées pour la fin de cet intervalle. En plus des caractéristiques inhabituelles de l'onde T, un aspect technique a contribué à cette controverse. En effet, la partie négative comprise par le QT₃ est de faible amplitude et donc plus difficile à détecter, si bien que certains ont cru que l'onde T n'apparaissait pas sur l'ECG de souris.⁴ Toutefois, un placement adéquat des électrodes et la réduction du bruit électrique extérieur viennent généralement à bout de cette difficulté technique. Au fil des années, plusieurs évidences en faveur du QT₃ comme mesure valide de l'intervalle QT ont été dévoilées. Tout d'abord, deux laboratoires différents, incluant le nôtre (données non publiées), ont enregistré simultanément un ECG de surface et des potentiels d'action monophasiques ventriculaires.⁵ La fin du potentiel d'action survenait au retour de la phase négative à la ligne isoélectrique, prouvant qu'elle faisait bel bien partie de la repolarisation ventriculaire. Par ailleurs, une équipe de recherche a observé qu'une baisse de courant K⁺ était associée à l'élargissement de l'onde négative⁶ alors qu'une surexpression de courant K⁺ abolissait presque entièrement cette onde.⁷ Ainsi, la modulation de la phase négative par les courants de repolarisation confirme son inclusion dans l'intervalle QT.

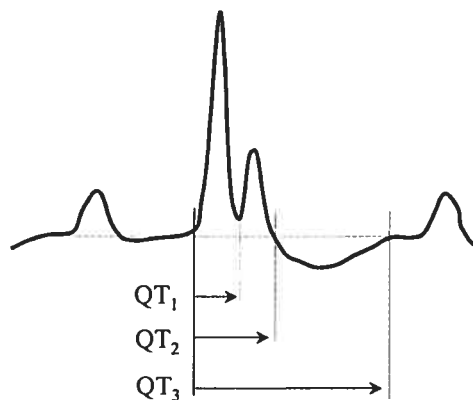


Figure 5: Illustration d'un ECG de souris comprenant un battement cardiaque. QT₁₋₃ représentent les mesures suggérées pour la fin de l'intervalle QT. Adapté de ⁵

1.1.4 Intervalle QT

Puisque l'intervalle QT englobe le complexe QRS et l'onde T, il correspond approximativement à la durée du potentiel d'action ventriculaire (Figure 7, p.28). La

durée de l'intervalle QT varie en fonction du rythme cardiaque: plus il est rapide, plus l'intervalle QT est court.⁸ Ainsi, au cours d'une même journée, un individu aura des durées d'intervalle QT différentes dépendant de son rythme cardiaque, d'où la nécessité de corriger ce paramètre avant de comparer différents groupes.

1.1.4.1 Correction de l'intervalle QT pour le rythme cardiaque (QTc)

Idéalement, la formule de correction devrait être propre à chacun des sujets à l'étude. Cette approche est toutefois extrêmement difficile à appliquer puisqu'elle nécessite l'accès à de multiples données d'intervalles QT enregistrés à divers rythmes cardiaques pour un même sujet. C'est pourquoi la majorité des formules utilisées sont basées sur des études de population (voir Tableau I, p.26). Dans ces analyses, des paires de données (QT, RR) recueillies d'un certain nombre de sujets sont mises sous forme de graphique. Des formules sont ensuite élaborées afin de représenter et de corriger la relation entre les intervalles QT et RR. Le type de formule choisi est parfois log-linéaire (Bazett, Fridericia, Koren) ou linéaire (Framingham, Carmeliet). Le choix de la formule ainsi que le nombre de données utilisées pour générer la courbe influence la correction. À cet égard, il est surprenant de constater que la formule la plus utilisée, celle de Bazett, a été basée sur une analyse de 39 individus seulement. Il s'avère que cette formule est fidèle pour les rythmes cardiaques moyens. Par contre, elle sous-estime et surestime les valeurs d'intervalles QTc associés à des rythmes cardiaques lents et rapides, respectivement. La formule de Framingham, basée sur une cohorte de cinq mille personnes, corrige ces points.

Les formules de Bazett et de Framingham ont servi de modèle pour celles de Koren et Carmeliet, adaptées pour la souris. Par exemple, la formule de Koren rajoute simplement une normalisation de 100 au niveau du dénominateur de l'équation de Bazett. Ce chiffre correspond à l'intervalle RR moyen d'une souris consciente (100 ms; 600 battements par minute; bpm). De son côté, la formule de Carmeliet est similaire à celle Framingham mais corrige par rapport à un intervalle RR de 170 ms, qui correspond environ à 350 bpm, rythme pouvant être observé chez la souris sous anesthésie.

Formules de correction de l'intervalle QT			
	QTc	RC de référence	Taille de la cohorte étudiée
<i>Humain</i>			
Bazett ⁹	QT/\sqrt{RR}	60	n=39
Fridericia ¹⁰	$QT/\sqrt[3]{RR}$	60	n=50
Framingham ¹¹	$QT + 0.154(1-RR)$	60	n=5018
<i>Souris</i>			
Koren ¹²	$QT/\sqrt{(RR/100)}$	600	n=6 durant 24h
Carmeliet ¹³	$QT + 0.3173(170-RR)$	350	

Tableau I: Formules permettant de calculer l'intervalle QTc
 RC: rythme cardiaque
 Adapté de ¹⁴

1.1.4.1.1 Choix de la formule

Toutes les formules de correction contiennent un rythme cardiaque de référence, qui correspond généralement au rythme cardiaque moyen de la population étudiée. Ce paramètre devrait être considéré dans le choix d'une formule puisqu'il est au cœur de la correction. En effet, un intervalle QT enregistré au rythme cardiaque de référence ne subira aucune correction alors qu'un autre enregistré à un rythme cardiaque éloigné subira une grande correction. Plus la correction est grande, plus les risques d'erreur augmentent. Ainsi, le rythme cardiaque de référence de la formule choisie devrait être comparable à celui de la population à l'étude.

Il est aussi possible de tester l'effet des formules sur nos données en comparant les relations QTc versus RR obtenues avec les diverses formules. La meilleure formule sera celle qui générera le plus faible degré d'association entre ces deux paramètres. Ainsi, dans l'exemple illustré à la Figure 6 (p.27), la formule A est supérieure à la formule B.

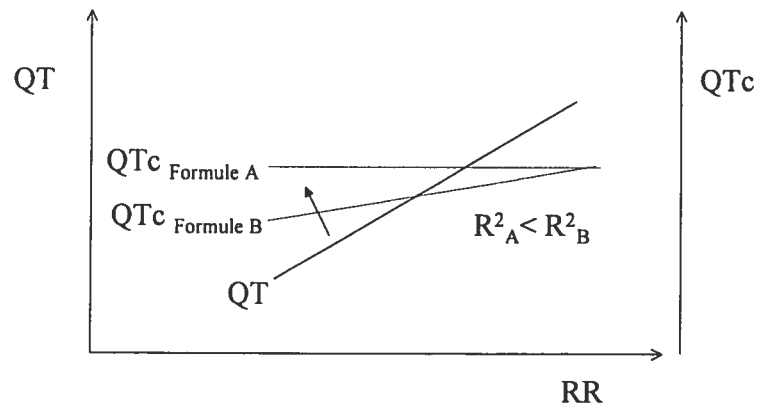


Figure 6: Relations entre l'intervalle QT, les intervalles QTc obtenus à l'aide de deux différentes formules et l'intervalle RR
Adapté de ¹⁴

1.1.5 Résumé

L'intervalle QT, les potentiels d'action et les courants ioniques sont des phénomènes électriques intimement liés. Un changement au niveau d'un courant se répercute aux deux autres niveaux. Par exemple, la réduction d'un courant sortant ou l'augmentation d'un courant entrant entraîne une prolongation du potentiel d'action et de l'intervalle QT (Figure 7, p.28). Le syndrome du QT long (LQTS; "Long QT Syndrome") fournit un très bel exemple de cette relation.

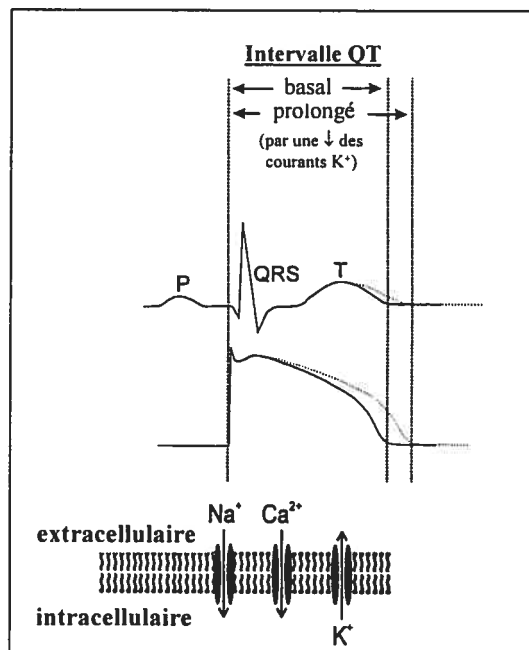


Figure 7: Relation entre l'intervalle QT, le potentiel d'action et les courants ioniques
Adapté de ¹⁵

1.2 Syndrome du QT long

Le LQTS est associé à une repolarisation prolongée et un risque accru de torsades de pointes, une arythmie décrite en détail à la section 1.3, p.34. Il existe deux types de LQTS, congénital et acquis. Le LQTS *congénital* (LQTSc) réfère à des maladies génétiques autosomiques associées à une dysfonction de protéines impliquées dans le potentiel d'action ventriculaire. Le LQTS *acquis* (LQTSa) réfère à la prise de médicaments qui prolongent la repolarisation de façon excessive.

1.2.1 Syndrome du QT long congénital

Un des critères du diagnostic du LQTS est une durée d'intervalle QTc supérieure à 0.45 seconde pour un homme et à 0.46 seconde pour une femme.¹⁶ À ce jour, sept différents types de LQTSc (1-7) sont connus, nommés selon la chronologie de leur découverte. Il s'agit pour la plupart de mutations dans les gènes codant pour des canaux ioniques ou des protéines régulant leur fonction. Les canaux impliqués

dans ce syndrome sont les canaux K^+ et Na^+ . Les divers types de syndromes varient en fréquence, en sévérité et ont des caractéristiques qui leur sont propres sur l'ECG (voir Tableau II, p.29). Les LQTSc sont divisés en deux sous-catégories, selon leur mode de transmission génétique. Les syndromes Romano-Ward (RW) ont une transmission dominante et sont associés à une mutation hétérozygote du gène impliqué. De leur côté, les syndromes Jervell-Lange-Nielsen (JLN) sont de nature récessive et sont dus à une mutation homozygote du gène *KCNQ1* ou *KCNE1*. La transmission des LQTS2,3,4,6 est exclusivement dominante (RW) alors que celle des LQTS1,5 peut être dominante ou récessive.^{17,18}

Type	Gène chromosome	Fonction de la protéine (nom)	Fréquence	Degré de sévérité	Caractéristique de l'ECG
1	<i>KCNQ1</i> 11	sous-unité α d' I_{Ks} (KvLQT1)	50-60%	+	onde T large
2	<i>KCNH2</i> 7	sous-unité α d' I_{Kr} (HERG)	30-35%	+++	onde T bossue, de faible amplitude
3	<i>SCN5A</i> 3	sous-unité α d' I_{Na}	10-15%	++	long segment ST, onde T étroite
4	<i>Ankyrin-B</i> 4	protéine adaptatrice; impact sur Ca^{2+}_i et I_{Na}			
5	<i>KCNE1</i> 21	sous-unité β d' I_{Ks} (minK)			
6	<i>KCNE2</i> 21	sous-unité β d' I_{Kr} (?) (miRP1)			
7	<i>KCNJ2</i> 17	sous-unité α d' I_{K1} (Kir2.1)			présence d'une onde U

Tableau II: Caractéristiques des différents types de LQTS congénital
Adapté de ^{14,15,19-22}

1.2.1.1.1 LQTS1,5

Des mutations dans les gènes des sous-unités α (*KCNQ1*) et β (*KCNE1*) du courant K^+ I_{Ks} causent les LQTS 1 et 5, respectivement. Le LQTS1 est la forme la plus fréquente de tous les LQTS. Tel que mentionné précédemment, les LQTS1,5 regroupent les syndromes RW et JLN. Ces deux types de syndromes sont associés à des problèmes cardiaques. Par contre, les patients JLN souffrent aussi de surdité, témoignant de l'importance du courant I_{Ks} dans le cœur et dans l'oreille interne.¹⁷

Les parents d'enfants atteints du syndrome JLN possèdent une mutation hétérozygote et sont peu affectés, contrairement aux patients RW, eux aussi hétérozygotes. L'étude de l'impact des diverses mutations sur la fonction du courant I_{Ks} explique cette contradiction apparente. Tout d'abord, il est important de préciser qu'un canal K^+ fonctionnel est composé de quatre sous-unités α , qui forment le pore, et de quatre sous-unités β , qui modulent sa fonction et parfois son expression. L'étude de l'effet des diverses mutations des gènes *KCNQ1* et *KCNE1* a révélé deux types d'impact : une perte de fonction associée ou non à un effet dominant négatif.²³ Les canaux sans effet dominant négatif ne s'associent jamais avec les sous-unités fonctionnelles, soit parce qu'ils ont perdu leur capacité d'association ou soit parce qu'ils sont retenus dans le réticulum endoplasmique.²⁴ Ceci fait en sorte que les canaux présents à la membrane sont totalement fonctionnels. Étonnamment, leur plus faible densité (50%) ne cause pas de prolongation de la repolarisation chez le porteur. Cette observation suggère que le myocyte cardiaque possède plus de courant K^+ que nécessaire et/ou que le courant I_{Ks} joue un rôle limité en conditions basales et qu'il constitue une réserve utilisée dans certaines conditions. Quant aux canaux dominants négatifs, ils s'associent aux sous-unités saines et nuisent à leur fonction. Ainsi, seuls les canaux composés de quatre sous-unités intactes seront totalement fonctionnels, soit environ 6% du nombre total. En résumé, les mutations hétérozygotes associées au syndrome RW sont beaucoup plus dommageables que celles du JLN puisqu'elles codent pour des sous-unités qui, en plus d'être dysfonctionnelles, entravent la fonction des protéines saines. Cette particularité explique le caractère dominant du syndrome RW.

Par ailleurs, il existe aussi des mutations entraînant un phénotype intermédiaire dû à un faible pouvoir dominant négatif.²⁴ Ceci corrèle bien le fait que certains porteurs soient asymptomatiques mais présentent des durées d'intervalles QTc à la limite supérieure de la normale.

1.2.1.1.2 LQTS2,6

Le LQTS2 est associé à des mutations dans le gène de la sous-unité α (*KCNH2*) du courant K^+ I_{Kr} . Il est le type le plus sévère de tous les LQTS.¹⁹ Fait intéressant, les femmes en souffrent beaucoup plus que les hommes. En effet, une étude a montré que les patientes du LQTS2 avaient quatre fois plus de chance de vivre un épisode de torsades de pointes avant 40 ans que les hommes.¹⁹ Plusieurs types de mutations ont été identifiés et caractérisés. Leurs effets sur la fonction du canal sont très variés. Certains réduisent ou suppriment le courant alors que d'autres altèrent les propriétés cinétiques du canal.²⁰

De son côté, le LQTS6 est relié à des mutations dans le gène *KCNE2*, dont le produit (miRP1) est considéré comme la sous-unité β de I_{Kr} .²⁵ Il existe toutefois une controverse à ce sujet puisque la combinaison de HERG et miRP1 dans des systèmes d'expression de cellules de mammifères ne reconstitue pas toutes les propriétés attribuées au courant natif.²⁶ Par ailleurs, cette sous-unité peut aussi s'associer avec les canaux $Kv4.x$,²⁷ $KvLQT1$ ²⁸ et *HCN2*,²⁹ ce qui complexifie la situation. Manifestement, d'autres études sont requises afin de préciser le(s) rôle(s) exact(s) de miRP1 dans la repolarisation cardiaque. Son importance demeure toutefois indéniable puisque les mutations de *KCNE2* prédisposent aux arythmies.²⁰

1.2.1.1.3 LQTS3

À l'opposé des types de LQTS précédemment décrits, qui entraînent une perte de fonction d'un canal ionique, le LQTS3 est associé à un gain de fonction du courant Na^+ . Les mutations impliquées dans ce syndrome affectent l'inactivation du canal et la rendent incomplète.²⁰ Ceci permet l'entrée de charge positive supplémentaire dans la cellule. Puisque les canaux Na^+ sont constitués d'une seule sous-unité α , une mutation

hétérozygote affecte 50% des canaux. Une plus grande proportion d'hommes que de femmes souffre du LQTS3.¹⁵

1.2.1.1.4 LQTS4

Les premiers cas de LQTS4 ont été répertoriés en 1995. Plusieurs membres d'une famille française présentaient des intervalles QTc prolongés en plus de souffrir d'un dysfonctionnement du nœud sinusal et de fibrillation auriculaire. Une analyse génétique a révélé une mutation dans le gène de la protéine ankyrin-B, une protéine adaptatrice du cytosquelette dont le rôle cardiovasculaire n'était pas encore connu. Quelques années plus tard, l'accès à une souris transgénique déficiente en ankyrin-B a dévoilé son implication dans la signalisation du Ca^{2+} intracellulaire via une interaction avec la pompe Na^+/K^+ -ATPase, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le récepteur à l'inositol triphosphate (IP_3).³⁰ Il semble que l'ankyrin-B soit aussi impliquée dans la régulation des canaux Na^+ puisque les souris transgéniques possédaient un plus grand courant Na^+ soutenu, possiblement impliqué dans la prolongation du potentiel d'action observée chez celles-ci.²² Le LQTS4 est le seul type de LQTS qui n'est pas associé à une mutation d'une sous-unité d'un canal ionique.

1.2.1.1.5 LQTS7

Connu aussi sous le nom du syndrome d'Anderson, le LQTS7 est dû à une mutation dans le gène *KCNJ2*, codant pour la sous-unité α du courant K^+ à rectification entrante, I_{K1} . Ce courant est présent dans les muscles cardiaque et squelettique. Ainsi, en plus de souffrir de problèmes cardiaques, les patients du LQTS7 sont parfois atteints de paralysies périodiques. Leur phénotype cardiaque est distinct et moins sévère que celui des autres formes de LQTS. En effet, bien que ces patients souffrent de tachycardies ventriculaires, ils développent très peu de torsades de pointes et de fibrillation ventriculaire. De plus, aucune mort subite n'a été rapportée chez les patients souffrant du LQTS7.²¹

1.2.2 Syndrome du QT long acquis

Les antiarythmiques de classes IA et III bloquent les courants K^+ et prolongent ainsi le potentiel d'action et l'intervalle QTc. En règle générale, une prolongation du potentiel d'action, et donc de la période réfractaire, protège le tissu ventriculaire d'une ré-excitation précoce et d'une tachycardie. Par contre, une prolongation excessive peut être pro-arythmique et déclencher des torsades de pointes. Le médicament cardiovasculaire provoquant le plus de torsades de pointes est la quinidine (classe IA), avec un taux de 1-8%.³¹ Étonnamment, plusieurs médicaments non-cardiovasculaires incluant l'érythromycine, la terfénadine et le cisapride ont aussi été impliqués dans des cas de torsades de pointes.³² Des études ont montré que ces agents, en plus de leurs actions pharmacologiques spécifiques, bloquent le courant potassique I_{Kr} et prolongent la repolarisation.³³⁻³⁵ Deux de ces médicaments, la terfénadine et le cisapride, ont même été retirés du marché à cause de leur potentiel pro-arythmique. Afin de prévenir l'entrée sur le marché de médicaments possédant ce même effet secondaire, la "Food and Drug Administration" oblige maintenant les compagnies pharmaceutiques à inclure des études électrocardiographiques dans la phase I du développement de tous les nouveaux médicaments afin de tester un effet possible sur l'intervalle QTc. Le Tableau III de la p.34 présente une liste non exhaustive de médicaments susceptibles de provoquer des torsades de pointes.

Par ailleurs, des études suggèrent que certains cas de torsades de pointes médicamenteuses puissent être liés à des prédispositions génétiques. Napolitano et coll. ont examiné l'ADN d'une patiente ayant souffert de torsades de pointes suite à la prise de cisapride et ont découvert une mutation hétérozygote dans le gène *KCNQ1*.³⁶ Une autre étude a comparé le gène *KCNE2* de 98 patients sensibles à des médicaments prolongeant la repolarisation et ont découvert trois mutations sporadiques et un polymorphisme commun (une variation génétique recensée chez plusieurs membres de la population).³⁷ Les mutations entraînaient une perte de courant alors que le polymorphisme induisait une sensibilité accrue aux médicaments. Ainsi, par divers mécanismes, des variabilités génétiques latentes pourraient

complexes qui ont tantôt la pointe en haut et tantôt la pointe en bas... avec une amplitude... progressivement variable."³⁸

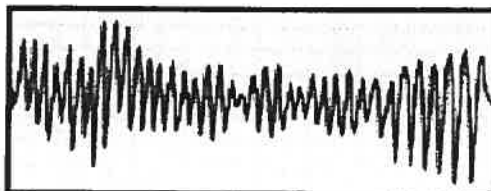


Figure 8: Exemple d'enregistrement de torsades de pointes
Source: ³⁸

1.3.2 Caractérisation électrophysiologique des torsades de pointes

Depuis ce temps, de nombreux cas de torsades de pointes ont été répertoriés et cette arythmie est maintenant bien caractérisée.³² Il s'agit d'une tachycardie ventriculaire polymorphique associée à une prolongation de l'intervalle QTc. Le rythme ventriculaire des torsades de pointes se situe habituellement entre 200 et 250 battements par minute mais peut varier entre 150 et 300.² Le terme polymorphique réfère aux complexes QRS de formes changeantes et révèle un circuit électrique variable. L'initiation des torsades de pointes est distinctive. En effet, dans la majorité des cas, le début de l'arythmie est précédé d'une séquence d'intervalles RR court-long-court.³⁹ Les torsades de pointes peuvent entraîner des palpitations, l'évanouissement et même la mort.² En effet, cette tachycardie qui se termine généralement par elle-même peut, dans certains cas, dégénérer en fibrillation ventriculaire et être fatale. Dans les cas d'arythmies non-soutenues, la durée est très variable. Une étude approfondie de 80 cas de torsades de pointes non-soutenues a montré que les durées variaient de 3 à 117 battements avec une moyenne de 15 ± 9 battements.³²

1.3.3 Mécanismes cellulaires responsables des torsades de pointes

Les données recueillies jusqu'à ce jour indiquent que les torsades de pointes seraient initiées par des dépolarisations précoces (EAD). Un des arguments favorables à cette hypothèse est que les conditions expérimentales qui promouvoient les EAD (bradycardie, hypokaliémie, administration d'inhibiteurs de canaux K^+) sont celles qui favorisent les torsades de pointes en clinique.⁴⁰ De plus, celles qui empêchent la formation de EAD préviennent des activités électriques ectopiques qui auraient pu déclencher des torsades de pointes.⁴¹ Les EAD se produiraient préférentiellement dans deux types de cellules, les fibres de Purkinje et les cellules M du mid-myocarde.⁴² Le mécanisme cellulaire des EAD a été investigué et il semble que le courant Ca^{2+} de type L (I_{Ca-L}) soit le candidat responsable de ces dépolarisations précoces. Tout d'abord, les EAD se produisent à des voltages qui correspondent à la fenêtre d'activité de ces canaux. Dans les diverses conditions favorisant une prolongation de la repolarisation, la cellule passe plus de temps aux voltages dépolarisés du plateau, ce qui permet aux canaux Ca^{2+} de sortir de leur inactivation et de se réactiver, causant ainsi une dépolarisation.⁴³ Une autre preuve de l'implication des I_{Ca-L} et des EAD dans l'induction de la tachycardie ventriculaire vient de l'observation que l'amiodarone, un puissant anti-arythmique de classe III mais ayant aussi des propriétés de la classe I (inhibiteurs des canaux Na^+) et IV (inhibiteurs des canaux Ca^{2+}) induit peu de torsades de pointes malgré sa capacité de prolonger le QTc et de ralentir le rythme cardiaque (www.torsades.org).

Une fois initiée, les torsades seraient maintenues par des circuits électriques de réentrée, favorisés par une dispersion des durées des potentiels d'action du myocarde.⁴² Des études expérimentales attribuent justement la susceptibilité accrue de leur modèle de torsades de pointes à une augmentation de la dispersion temporelle (d'un battement à l'autre)⁴⁴ ou physique (d'une couche du myocarde à l'autre)⁴⁵ de la repolarisation.

1.3.4 Facteurs de risque

Les facteurs de risque des torsades de pointes ont un point en commun: leur association directe ou indirecte avec une prolongation marquée de l'intervalle QTc. En plus des deux types de LQTS traités précédemment, des facteurs tels la bradycardie, certains désordres métaboliques et le sexe féminin prédisposent aux torsades de pointes. Une liste complète des facteurs de risque est présentée dans le Tableau IV, p.37.

Facteurs de risque pour les torsades de pointes

LQTS congénital
 LQTS acquis
 Sexe féminin
 Bradycardie
 Hypokaliémie
 Hypomagnésie sévère
 Cardiomyopathie
 Polymorphismes dans les canaux ioniques

Tableau IV: Facteurs de risque pour les torsades de pointes
 Adapté de ^{14,42}

1.3.4.1 Le LQTS congénital et les situations à risque

Tel que mentionné antérieurement, les patients du LQTS sont sujets à développer des torsades de pointes. Fait notoire, ces arythmies surviennent dans des situations très précises telles l'exercice, les émotions, le repos et le sommeil.^{15,46} Ces conditions sont associées à la presque totalité des événements cardiaques et leur prédominance varie selon le type de LQTS. La Figure 9 (p.38) expose la fréquence de chacune des conditions prédisposant aux torsades de pointes pour les LQTS les plus courants, soit les LQTS1-3. Tel qu'illustré, une très forte proportion de patients LQTS1 développe des symptômes en périodes d'exercices. La natation est le sport le plus souvent associé à l'induction d'événements cardiaques et est fortement déconseillé chez ces patients. Les périodes d'émotions et de repos/sommeil sont les

conditions dans lesquelles se développent le plus fréquemment les symptômes des patients LQTS2 et 3, respectivement. Par contre, leur prédominance n'est pas aussi claire que celle de l'exercice pour le LQTS1. En ce qui a trait au type d'émotions suscitant l'apparition de manifestations cliniques, on retrouve la peur, la colère et les stimuli auditifs. Ce dernier facteur est tellement fréquent chez les patients du LQTS2 qu'il leur est recommandé de ne pas avoir de réveil-matin ni de téléphone dans leur chambre à coucher.

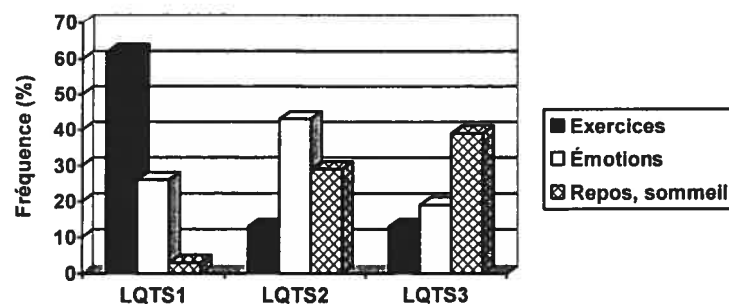


Figure 9: Fréquence des diverses situations dans lesquelles surviennent les symptômes cliniques des patients LQTS1-3
Adapté de ⁴⁶

1.3.4.1.1 Mécanismes pathologiques possiblement impliqués

La révélation de situations d'induction distinctes permet de spéculer sur les mécanismes impliqués dans le déclenchement des torsades de pointes associées aux divers types de LQTS. ⁴⁶ Par exemple, l'exercice est accompagné d'une augmentation progressive du rythme cardiaque et de la relâche de catécholamines, deux phénomènes qui affectent le courant $K^+ I_{Ks}$. D'une part, un rythme rapide favorise l'accumulation de ce courant à déactivation lente. D'autre part, une exposition aux catécholamines augmente la densité de ce courant. Ainsi, les deux conditions stimulent I_{Ks} et induisent un raccourcissement du potentiel d'action. Cette réponse constitue un mécanisme compensatoire antiarythmique. En ayant un courant I_{Ks} réduit ou absent, les patients du LQTS1 perdent cette protection et deviennent plus sensibles

aux situations impliquant une augmentation du rythme cardiaque et la relâche de catécholamines, tel que l'exercice.

À l'inverse, les patients LQTS2,3 possèdent un courant I_{Ks} fonctionnel et ont donc une capacité d'adaptation à une augmentation du rythme cardiaque, ce qui explique le faible nombre d'événements cardiaques survenant lors d'entraînements physiques. Par contre, cette protection est absente si les changements de rythme cardiaque se produisent de façon abrupte, comme dans les cas de stress émotionnels. Dans ces situations, le courant I_{Ks} n'a pas le temps de s'activer de façon optimale et l'augmentation du rythme cardiaque s'effectue donc sans adaptation de l'intervalle QT. Ceci résulte en un intervalle diastolique réduit qui favorise les circuits de réentrée.

La prédisposition à développer des arythmies durant une période de repos ou de sommeil est plus intrigante vu la quasi-absence de stimulation associée à ces conditions. Deux hypothèses sont toutefois proposées pour expliquer ce phénomène.⁴⁶ Tout d'abord, le rythme cardiaque lent d'un patient au sommeil ou au repos pourrait constituer un facteur de risque puisqu'il favorise l'apparition de EAD. Il faut aussi rappeler que ces personnes ont des intervalles QTc très longs au niveau basal et que la bradycardie physiologique associée aux périodes tranquilles pourrait exacerber leur phénotype. D'autre part, le sommeil est faussement perçu comme une période d'inactivité totale. En effet, alors que les muscles squelettiques sont au repos, l'activité neuronale est toujours en fonction. De plus, des actions dynamiques ont lieu. Par exemple, les transitions entre les diverses phases de sommeil sont accompagnées de changement au niveau du système sympathique. Les mécanismes précis de cette hypothèse restent toutefois à être explorés.

1.3.4.2 Genre féminin

Il est maintenant bien documenté que les femmes sont plus susceptibles de développer des torsades de pointes que les hommes. Notamment, l'étude de plus de 3000 dossiers de patients recevant du sotalol a révélé que le sexe féminin constituait un facteur de risque indépendant pour le développement de torsades de pointes. En

effet, les femmes avaient trois fois plus de risque de développer cette arythmie que les hommes.⁴⁷ Cette nette prévalence est aussi observée lorsque tous les médicaments cardiovasculaires sont considérés. Il a été rapporté que 70% des épisodes de torsades de pointes suivant une prise de médicaments cardiovasculaires sont survenus chez des femmes.⁴⁸ Cette même tendance prévaut dans le cas des médicaments non-cardiovasculaires. Par exemple, 15 des 16 patients traités avec l'hypolipédiant probucol qui ont développé des torsades de pointes étaient de sexe féminin.⁴⁹ Le même scénario se reproduit au niveau du LQTS2 où les femmes sont aussi plus sujettes aux événements cardiaques que les hommes.⁵⁰

Une explication fort plausible de la prédisposition des femmes à développer des torsades de pointes est le fait que leur intervalle QTc basal soit plus long que celui des hommes. Cette différence de 10 à 20 ms selon les études a été notée pour la première fois par Bazett,⁹ en 1920, et a été confirmée par la suite par plusieurs chercheurs.^{51,52} Les mécanismes responsables de la différence entre hommes et femmes dans la durée de l'intervalle QTc sont peu connus et sont le sujet de la présente thèse.

1.4 Influence de l'âge et du sexe sur l'intervalle QTc

La différence homme/femme au niveau de l'intervalle QTc n'est ni présente à la naissance,⁵³ ni durant l'enfance.⁵² Elle se manifeste plutôt à l'adolescence, lorsque l'intervalle QTc des garçons raccourcit alors que celui des filles demeure allongé.⁵⁰⁻⁵² Chez les patients souffrant du LQTS, la durée de l'intervalle QTc régresse après l'âge de 15 ans chez les hommes seulement.^{50,51,54} Le Tableau V (p.41) présente les cas de deux patients masculins dont les intervalles QTc ont grandement diminué pendant la période de l'adolescence. Ces cas spectaculaires combinés au phénomène observé dans la population générale suggèrent fortement que des changements au niveau de la repolarisation se produisent durant la période de l'adolescence des garçons.

	intervalle QTc (sec)	
	pré-adolescence	post-adolescence
Patient 1	0.62	0.49
Patient 2	0.6	0.45

Tableau V: Évolution de la durée de l'intervalle QTc chez deux patients du LQTS
Source: Adapté de ⁵⁴

1.5 Influence du rythme cardiaque sur l'intervalle QTc

Puisque le QTc est corrigé pour le rythme cardiaque, une différence dans ce paramètre pourrait se répercuter sur l'intervalle QTc. En fait, dans l'étude de Rautaharju et coll. citée précédemment,⁵² les valeurs de QT absolues ne différaient pas entre les sexes. La différence provenait plutôt du rythme cardiaque plus lent chez les hommes après leur puberté. À l'inverse, les deux autres études ont démontré qu'une baisse du rythme cardiaque survenait autant chez les hommes que chez les femmes après la puberté et n'induisait donc pas la différence entre les sexes au niveau de l'intervalle QTc. Ce résultat a été observé chez les patients atteints du LQTS ainsi que dans la population générale.^{50,51} En bref, toutes les études s'entendent pour dire que l'intervalle QTc des femmes est plus long que celui des hommes alors que certaines études seulement rapportent aussi une différence au niveau de l'intervalle QT non corrigé. Un groupe de chercheurs a contourné l'influence de la correction de l'intervalle QT en stratifiant selon les rythmes cardiaques. Ainsi, ils ont comparé la repolarisation d'hommes et de femmes ayant des rythmes cardiaques similaires. Pour tous les rythmes étudiés, 60±1, 70±1 et 80±1 bpm, l'intervalle QT des femmes était plus long que celui des hommes.⁸ Ainsi, le rythme cardiaque ne peut à lui seul expliquer les différences entre les sexes au niveau de l'intervalle QTc.

Des chercheurs ont aussi étudié l'effet du changement de rythme cardiaque sur le QT mais cette fois, sur une période de 24 heures.⁵⁵ Ils ont comparé la relation entre les valeurs de QT absolues et l'intervalle RR d'hommes et de femmes en santé. À l'aide d'une analyse de régression linéaire, ils ont montré que la relation entre ces deux paramètres, définie par la pente, était plus abrupte chez les sujets féminins.

Autrement dit, la durée de l'intervalle QT des femmes variait de façon plus prononcée que celle des hommes suite à un changement de rythme cardiaque. Par exemple, face à des rythmes plus lents, l'intervalle QT de la femme prolongeait plus que celui des hommes. Il est intéressant de noter que la bradycardie est un facteur de risque qui pourrait donc être plus important chez la femme. Les mécanismes responsables de cette différence restent à être élucidés.

1.6 Influence des hormones sexuelles sur l'intervalle QTc

Puisque l'intervalle QTc raccourcit chez les garçons à l'adolescence, une période marquée par une augmentation des concentrations d'hormones sexuelles, les androgènes pourraient être impliqués dans ce phénomène. Les résultats d'une étude récente supportent cette hypothèse. Il a été observé que l'intervalle QT d'hommes ayant subi une castration allonge alors que celui des femmes exposées à un niveau d'androgène élevé raccourcit.⁵⁶ Le même groupe a aussi montré qu'une administration de testostérone chez les hommes castrés diminuait la durée de leur intervalle QT. De plus, il a été rapporté que des athlètes prenant de fortes doses de stéroïdes anabolisants avaient des intervalles QT plus courts.⁵⁷ Ces études suggèrent que les hormones sexuelles mâles modulent la repolarisation ventriculaire. Les CHAPITRE 3 et CHAPITRE 4 traitent de l'importance de ces hormones dans les différences mâle/femelle observées dans la repolarisation cardiaque de la souris.

1.7 Modèles animaux utilisés pour étudier les différences mâle/femelle

1.7.1 Introduction

Idéalement, les hypothèses visant à comprendre des phénomènes physiologiques et pathologiques humains devraient être testées chez l'humain. Malheureusement, ceci s'avère impossible dans bien des cas. Par exemple, dans le domaine de l'électrophysiologie cardiaque, les courants électriques de cellules isolées sont étudiés. Or, l'accès à des cœurs humains sains est rare et du point de vue

technique, l'isolation de myocytes humains est extrêmement difficile. De plus, les facteurs confondants tels la prise de médicaments, l'âge et les antécédents de maladie sont nombreux et impossible à contrôler. Pour ces raisons, la plupart des études fondamentales utilisent des animaux de laboratoire. Le choix du modèle repose sur plusieurs critères. Tout d'abord, le potentiel expérimental de l'animal choisi (ex. approche transgénique possible) et des aspects pratiques tels le coût, l'accessibilité et l'hébergement doivent être considérés. De plus, dans le cas d'études visant à comprendre la physiologie humaine, il est important que le modèle choisi ressemble à l'humain du point de vue du système biologique étudié. Ainsi, cette section décrit d'abord les propriétés de l'humain quant à sa repolarisation cardiaque et à son profil sexuel avant de le comparer à divers modèles animaux utilisés pour étudier la régulation hormonale au niveau de la repolarisation cardiaque. Pour faciliter la comparaison, les informations concernant les niveaux d'hormones sexuelles et certains paramètres de la reproduction sont présentées sous forme de tableaux.

1.7.2 Définitions

1.7.2.1 Reproduction et sexualité

Voici les définitions de quelques termes qui seront utilisés dans les sections suivantes. Les **cycles menstruel et œstral** sont les deux types de cycles retrouvés chez les mammifères. La femme et plusieurs autres primates femelles ont un cycle menstruel alors que les autres mammifères ont un cycle œstral. Dans chacun des deux cycles, l'ovulation survient lorsque l'endomètre s'est épaissi et vascularisé. Par contre, en absence de grossesse, l'endomètre est expulsé du corps dans le cycle menstruel alors qu'il est réabsorbé par l'utérus dans le cycle œstral. De plus, le cycle œstral est plus modulable que le cycle menstruel. Il peut être par exemple modifié par un changement de saison ou de climat. Finalement, les femmes peuvent être réceptives à l'activité sexuelle tout au long de leur cycle alors que la plupart des autres femelles ne le sont qu'à l'ovulation. Cette période d'activité sexuelle est appelée œstrus ou rut.⁵⁸

Le cycle œstral peut être divisé en quatre phases : pro-œstrus, œstrus, post-œstrus et anœstrus. La phase **pro-œstrus** est caractérisée par la maturation folliculaire, un processus qui se continue dans la phase **œstrus** où survient l'ovulation. La phase **post-œstrus** correspond à la formation et à la maturation du corps jaune. Finalement, l'**anœstrus** est la période de repos sexuel correspondant à la lutéolyse.⁵⁹ Les hormones sexuelles féminines fluctuent pendant ces quatre phases. Les niveaux d'œstrogènes et de progestérone maximaux sont observés pendant le pro-œstrus et le post-œstrus, respectivement. Les niveaux minimaux de ces mêmes hormones surviennent durant l'anœstrus. Le cycle peut être **poly-œstrien** ou **mono-œstrien** si la femelle non-fécondée a des cycles récurrents ou non pendant la saison sexuelle.⁵⁹

1.7.2.2 Repolarisation cardiaque

Tel que mentionné précédemment, la repolarisation cardiaque est un processus qui implique les courants K^+ . Voici les divers **courants / canaux K^+** ventriculaires retrouvés chez les humains et les adultes de diverses espèces animales:

Courant K ⁺	Sous-unités α possibles (gène)	Sous-unités β possibles
I _{to}	Kv1.4 (<i>KCNA4</i>)	Kv β 1, Kv β 3
	Kv4.2 et/ou Kv4.3 (<i>KCND2</i> , <i>KCND3</i>)	KChIP2, miRP1, KChAP, DPPX, Kv β 1, Kv β 3
I _{Kur}	Kv1.5 (<i>KCNA5</i>)	Kv β 2, Kv β 3
I _{ss}	Kv1.2 (<i>KCNA2</i>)	
	Kv2.1 (<i>KCNB2</i>)	KChAP
I _{Kr}	ERG (<i>KNCH2</i>)	miRP1
I _{Ks}	KvLQT1 (<i>KCNQ1</i>)	minK
I _{K1}	Kir2.1 (<i>KCNJ2</i>)	

Tableau VI: Correspondance entre les courants et canaux K⁺ présents dans le cœur des mammifères

Source:^{1,60-64}

1.7.3 Comparaison entre l'humain et divers modèles animaux

1.7.3.1 L'humain

Électrophysiologie cardiaque. Les courants K⁺ (canaux K⁺) retrouvés dans le ventricule d'humain sont I_{to} (Kv4.3), I_{Kr} (HERG), I_{Ks} (KvLQT1, minK) et I_{K1} (Kir2.1).^{1,65-69} Le rythme cardiaque est d'environ 76 battements par minute.¹¹

Profil sexuel. Les premiers signes de puberté chez la fille et le garçon sont la première menstruation, qui se manifeste vers 11-13 ans, et la première éjaculation de spermatozoïdes viables, qui survient vers 13-14 ans.⁵⁸ Chez le garçon, la production d'androgènes débute un peu avant cette première manifestation, soit vers l'âge de 10 ans, atteint un maximum vers 20 ans et décline par la suite, sans jamais retourner à des niveaux nuls.⁷⁰ Les deux principaux types d'androgènes présents chez l'homme sont la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). La femme a un cycle menstruel moyen de 28 jours au cours duquel les niveaux d'hormones sexuelles fluctuent (œstrogènes : 20-350 pg/ml, progestérone : 1-20 ng/ml).⁷¹ Les hommes et les femmes

possèdent des récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes au niveau de leurs ventricules.^{72,73}

1.7.3.2 Le chien

Électrophysiologie cardiaque. Les courants (canaux) K^+ présents dans le ventricule de chien sont : I_{to} (Kv4.3), I_{Kr} (ERG), I_{Ks} (KvLQT1, minK) et I_{K1} (Kir2.1).^{1,65,68,74-76} Leur rythme cardiaque moyen est de 87 battements par minute.⁷⁷

Profil sexuel. La chienne a un cycle mono-œstrien. Elle n'a que deux périodes de rut par année, une au printemps et une à l'automne.⁷⁸ La durée de son cycle sexuel est de six mois et comprend une période d'anœstrus de trois à quatre mois. Cette caractéristique est particulière à la chienne puisque tous les autres mammifères femelles, incluant la femme, ont une période anœstrus beaucoup plus courte. La présence de récepteurs aux hormones sexuelles dans le cœur de chien reste à être démontrée.

Autre caractéristique. Le chien est l'espèce animale domestique où l'on retrouve la plus grande variété de races, et en conséquence, la plus grande variété de propriétés physiques (ex. taille). Ceci peut générer une grande variabilité inter-animale tant au niveau de l'électrophysiologie cardiaque que du système reproducteur (ex. maturité sexuelle : voir Tableau IX, p.50) et entraver la détection de différences mâle/femelle.

1.7.3.3 Le lapin

Électrophysiologie cardiaque. Les courants (canaux) K^+ fonctionnels que l'on retrouve dans les myocytes ventriculaires du lapin adulte sont I_{to} (Kv1.4), I_{Kr} (ERG), et I_{K1} (Kir2.1).^{1,68,79,80} De ces trois courants K^+ , seulement I_{Kr} et I_{K1} ont la même base moléculaire que celle retrouvée chez l'humain. En effet, le courant I_{to} du lapin est associé au gène Kv1.4 alors que celui de l'humain est associé au gène Kv4.3. Par ailleurs, le fait que le lapin n'ait pas de courant I_{Ks} fonctionnel constitue une limitation puisqu'il empêche l'étude de l'interrelation entre I_{Kr} et I_{Ks} , qui peut être

aussi importante que la densité des courants elle-même. En effet, ces deux courants aux propriétés distinctes jouent des rôles complémentaires au niveau du potentiel d'action. Le rythme cardiaque du lapin est d'environ 190 battements par minute.⁸¹

Profil sexuel. Contrairement aux femmes et à la plupart des autres mammifères, les lapines n'ont pas d'ovulation spontanée. Leur ovulation, appelée ovulation induite, est plutôt provoquée par le coït.^{78,82} Bien que les ovulations spontanée et induite requièrent l'hormone lutéinisante (LH) pour la rupture du follicule, le mécanisme d'action diffère. En effet, dans le premier type d'ovulation, la relâche de LH est cyclique et est contrôlée par les œstrogènes alors que dans le deuxième type, elle est dépendante du coït. La lapine n'a donc pas de cycle œstral traditionnel et ses niveaux d'œstrogènes sont toujours très bas.⁸³ De plus, puisque les femelles utilisées en laboratoire sont séparées physiquement des mâles, la sécrétion de LH, l'ovulation et la production de corps jaune ne sont jamais induites. Puisque le corps jaune est la principale source de progestérone chez les femelles non-fécondées, les niveaux de cette hormone sont aussi très faibles chez les lapines (voir Tableau VII, p.49). La présence de récepteurs aux hormones sexuelles dans le cœur de lapin reste à être démontrée.

1.7.3.4 Le cobaye

Électrophysiologie cardiaque. Les cobayes adultes possèdent les courants (canaux) K^+ suivants dans leurs ventricules : I_{Kr} (ERG), I_{Ks} (KvLQT1/minK) et I_{K1} (Kir2.1).^{1,68,84-86} Ainsi, ils possèdent tous les courants K^+ retrouvés chez l'humain, à l'exception de I_{to} . Leur rythme cardiaque moyen est de 240-250 battements par minute.⁸⁷

Profil sexuel. La maturité sexuelle des femelles cobayes est plus hâtive que celle des mâles. Les femelles peuvent atteindre leur maturité sexuelle dès la cinquième semaine de vie alors que les mâles ne produiront du sperme fertile qu'à neuf semaines. Les femelles ont un cycle œstral moyen de 16 jours de type poly-œstrien.⁸² Les cobayes possèdent des récepteurs aux hormones sexuelles au niveau ventriculaire (données du laboratoire non publiées).

1.7.3.5 Le rat

Électrophysiologie cardiaque. Les courants (canaux) K^+ présents dans le ventricule de rat sont : I_{to} (Kv4.2/Kv4.3), I_{ss} (Kv1.2) et I_{K1} (Kir2.1).^{1,65,68,80,88-90} Leur rythme cardiaque moyen est de 380 battements par minute.⁹¹

Profil sexuel. Les femelles ont un cycle œstral moyen de 4-5 jours de type poly-œstrien.^{71,82} Les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes sont présents dans les ventricules de rat.⁹²

1.7.3.6 La souris

Électrophysiologie cardiaque. Les souris adultes possèdent les courants (canaux) K^+ ventriculaires suivants : I_{to} (Kv4.2/Kv4.3), I_{Kur} (Kv1.5), I_{ss} (Kv2.1) et I_{K1} (Kir2.1).⁹³⁻¹⁰⁰ Leur rythme cardiaque varie de 500 à 700 battements par minute.¹²

Profil sexuel. Les femelles ont un cycle œstral moyen de 4-5 jours de type poly-œstrien.⁸² Les souris possèdent des récepteurs aux androgènes, aux œstrogènes et à la progestérone au niveau ventriculaire.¹⁰¹

Autre caractéristique. L'accès aux souris transgéniques représente un outil des plus intéressants afin d'étudier la régulation hormonale du cœur. En effet, il existe plusieurs types de souris transgéniques dont les récepteurs aux hormones sexuelles ou les niveaux d'hormones sexuelles ont été altérés.^{102,103} Par exemple, la disponibilité de souris déficientes en certains récepteurs aux hormones sexuelles permet d'investiguer spécifiquement le rôle de ces récepteurs au niveau du cœur.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ De plus, la présence du courant I_{Kur} représente un autre atout de la souris puisqu'il s'agit d'un courant majeur des oreillettes humaines.¹⁰⁷

	17 β -œstradiol (pg/ml)	Progestérone (ng/ml)
Femme ⁷¹	20-350	1-20
Chienne ⁵⁹	20-70	1-20
Lapine	~10 pg/ml ⁸³	0.3±0.1 ⁵⁹
Cobaye ⁵⁹	30-70	1-10
Rat ¹⁰⁸	17-88	9-40
Souris CD-1	112±34*	2-40 ¹⁰⁸

Tableau VII: Niveaux de 17 β -œstradiol et de progestérone détectés pendant le cycle sexuel des femelles et des femelles adultes de différentes espèces animales

*Données du laboratoire

	Testostérone (ng/ml)	DHT (pg/ml)
Homme ⁷¹	3-11	300-1000
Chiens ¹⁰⁹	2	
Lapin ^{59,110}	5-6	839+/-173
Cobaye ⁵⁹	3-6	
Rat ¹⁰⁸	2-4	74-190
Souris CD-1 ¹¹¹	3-7	700-1200

Tableau VIII: Niveaux de testostérone et de DHT détectés chez les hommes et chez les mâles adultes de différentes espèces animales

	Femelles	Mâles
Humain ⁵⁸	11-13 ans	13-14 ans
Gros Chien ¹¹²	6-12 mois	6-12 mois
Petit Chien ¹¹²	4-7 mois	4-7 mois
Lapin*	5-6 mois	5-6 mois
Cobaye*	5-6 sem.	8-10 sem.
Rat*	8-10 sem.	10-12 sem.
Souris*	8-10 sem.	10-12 sem.

Tableau IX: Âge de la maturité sexuelle selon le sexe et les espèces
*Données provenant du site web de Charles River

	Pro-œstrus	Œstrus	Post-œstrus	Anœstrus
Femme ¹¹³	11-21 jours (folliculaire)	≈12-24 h (ovulatoire)	14 ± 2 jours (lutéale)	
Chienne ⁵⁹	4-15 jours	4-9 jours	2 mois	3-4 mois
Cobaye ⁵⁹	1.5 jour	12 h	6 jours	8 jours
Rate ⁵⁹	1 jour	12-34 h	12 h	2 jours
Souris ⁵⁹	1 jour	12 h	1 jour	2.5 jours

Tableau X: Durée des différentes phases du cycle sexuel chez les femmes et chez les femelles adultes de différentes espèces animales

1.7.4 Recommandations

Quel est donc le meilleur modèle expérimental pour l'étude des différences mâle/femelle dans la repolarisation cardiaque? En théorie, le chien s'avère être un modèle de choix grâce à ses grandes similitudes avec l'humain au plan électrophysiologique. En pratique, par contre, la difficulté d'accès à une population de chien uniforme en terme de race et d'âge le rend moins attrayant. De plus, la très longue période anœstrus de la chienne (3-4 mois) peut retarder grandement l'exécution de l'étude. Puisque aucun autre modèle ne possède tous les courants K^+ présents chez l'humain, l'approche complémentaire est possiblement la seule avenue permettant de s'y rapprocher.

En excluant le chien, le cobaye est le modèle partageant le plus de courants K^+ avec l'humain (I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1}). L'élément manquant, le courant I_{to} , est présent chez le lapin, le rat et la souris alors que sa base moléculaire (Kv4.3) n'est présente que chez le rat et la souris. Ceci affaiblit la candidature du lapin, d'autant plus que les femelles de cette espèce ont des niveaux d'œstrogènes et de progestérone très faibles. Si l'on compare maintenant les petits rongeurs, l'accès à des souris transgéniques rend ce modèle supérieur au rat compte tenu de toutes les nouvelles possibilités d'études offertes par cette technologie. Ainsi, l'étude combinée du cobaye et de la souris représente une approche adéquate et réaliste pour l'étude des différences liées au sexe dans la repolarisation ventriculaire.

1.7.5 Modèle couramment utilisé

Jusqu'à maintenant, le modèle le plus utilisé dans le domaine de la régulation hormonale est le lapin, ce qui va à l'encontre des recommandations présentées ci-haut. Le choix de cette espèce est justifié uniquement par une durée de potentiel d'action similaire à l'humain. Selon moi, les nombreux inconvénients du lapin présentés précédemment surplombent cet avantage. Par ailleurs, le chien et le cobaye ont aussi des durées de potentiel d'action similaires à l'humain.

1.7.6 Choix de notre laboratoire

En plus des caractéristiques mentionnées ci-haut, l'accès aux souris transgéniques déficientes en récepteurs aux œstrogènes (souris ERKO) et à l'hormone folliculostimulante (FSH; FORKO) a motivé le choix de la souris comme modèle animal pour étudier les mécanismes de base des différences mâle/femelle. Nous avons ensuite complété ces études en utilisant le cobaye, qui possède les courants K^+ I_{Kr} et I_{Ks} présents chez l'humain mais absents chez la souris adulte.

1.8 Différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque - études expérimentales

Bien que l'importance des phénomènes cardiaques impliquant des différences mâle/femelle soit reconnue, quelques études seulement se sont penchées sur ce sujet. Liu et coll.¹¹⁴ ont rapporté qu'à des intervalles de stimulation longs seulement, les intervalles QTc des lapins mâles étaient plus courts que ceux des femelles. Ils ont aussi observé une légère différence dans la densité des courants I_{Kr} et I_{K1} , qui étaient tous deux plus faibles chez les femelles. La différence dans le courant I_{Kr} n'était apparente qu'à partir de +30 mV, où la contribution physiologique de ce courant est incertaine. Le courant I_{to} était similaire entre les deux groupes.

Dans une autre série d'expériences, ce groupe a montré que malgré des prolongations similaires induites par l'agent pharmacologique 4-aminopyridine (4-AP), les lapins femelles développaient plus souvent des torsades de pointes.¹¹⁵ Ils n'ont toutefois pas fourni d'explications permettant d'éclaircir cette observation. Plus récemment, Pham et coll.¹¹⁶ ont démontré que les durées de potentiel d'action mesurées à 30% de la repolarisation (APD_{30}) des muscles papillaires de lapins femelles étaient plus longues que celles des mâles. Par contre, les valeurs d' APD_{90} étaient similaires entre les deux groupes. Ils ont aussi montré que l'inhibiteur de I_{Kr} , le dofétilide, induisait une plus grande prolongation du potentiel d'action chez les femelles que chez les mâles. Malheureusement, ils n'ont pas étudié le rôle des courants K^+ dans ce phénomène. En utilisant le rat comme modèle, Leblanc et coll.¹¹⁷

n'ont observé aucune différence entre les sexes au niveau des potentiels d'action et des courants I_{to} , I_{ss} , I_{K1} et I_{Ca-L} .

Ces études fournissent des informations intéressantes mais disparates. En effet, certaines d'entre elles étudient les courants, d'autres les potentiels d'action ou les intervalles QT. Aucune d'entre elles ne fournit une description complète du phénomène étudié. Afin de comprendre les mécanismes impliqués, il est important de faire le lien entre les canaux, les courants, les potentiels d'action et les intervalles QT au sein d'une même étude.

Notre laboratoire a été le premier à se pencher sur l'étude des différences reliées au sexe chez la souris et ce, à tous les niveaux de la repolarisation ventriculaire. Peu avant mon arrivée à la maîtrise, l'étude effectuée par Trépanier-Boulay et coll. a révélé l'existence de différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque chez la souris.¹¹⁸ Comme chez les humains, le sexe féminin était associé à une repolarisation prolongée. En effet, les potentiels d'action ventriculaires étaient significativement plus longs chez les femelles que chez les mâles (Figure 10, p.54). Ce retard était dû à une densité plus faible du courant K^+ I_{Kur} dans les ventricules de souris femelles (Figure 11, p.54). Tous les autres courants étudiés, I_{Na} , I_{Ca-L} , I_{to} , I_{ss} , I_{K1} , étaient similaires entre les deux sexes. Des études de biologie moléculaire ont ensuite montré que la diminution du courant I_{Kur} résultait d'une baisse de l'expression de son canal associé, Kv1.5. En effet, le signal du canal Kv1.5 était moins abondant dans les ventricules de femelles et ce, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm.

En dévoilant et en caractérisant une différence mâle/femelle dans la repolarisation cardiaque de la souris, cette étude constituait une première dans l'étude des différences électrophysiologiques reliées au sexe.

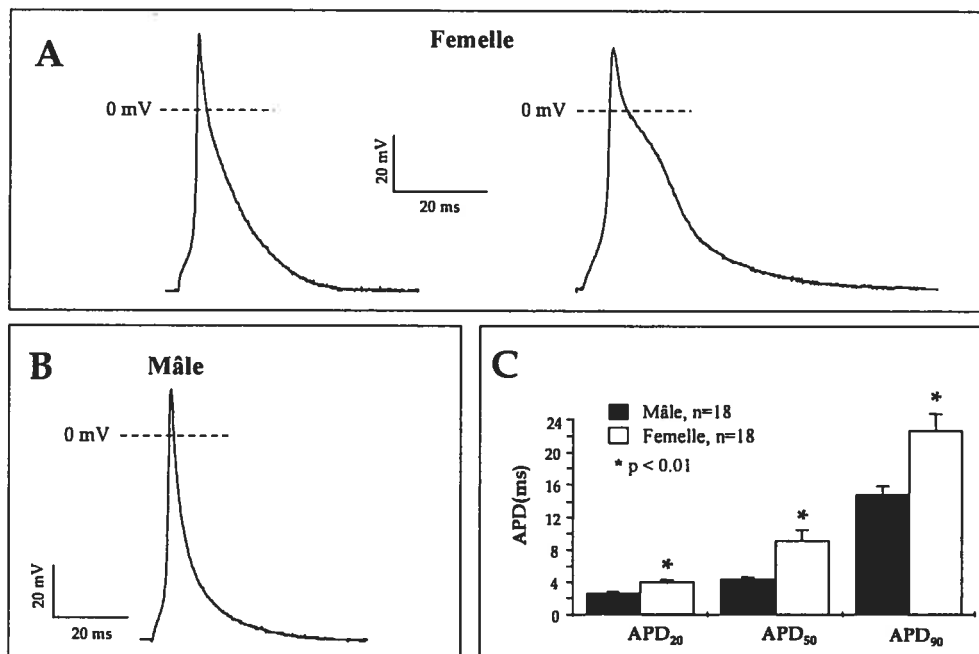


Figure 10: Potentiels d'action de myocytes ventriculaires isolés de souris mâles et femelles

Exemples de potentiels d'action provenant de deux différentes femelles (A) et d'un mâle (B). C. Histogramme présentant les valeurs moyennes des durées de potentiels d'action mesurées à 20%, 50%, et 90% de repolarisation chez les mâles et les femelles.¹¹⁸

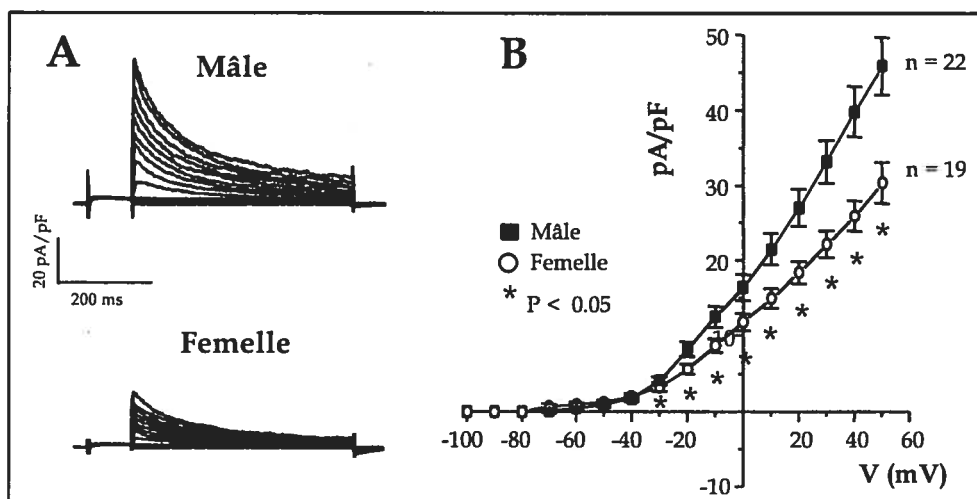


Figure 11: Courant K^+ I_{Kur} de myocytes ventriculaires de souris mâles et femelles A. Enregistrements typiques du courant I_{Kur} dans les deux groupes. B. Relation courant-voltage de I_{Kur} des myocytes mâles (■) et femelles (○).¹¹⁸

1.9 Régulation hormonale des canaux Kv

Des données expérimentales suggèrent que le contrôle hormonal des canaux K^+ puisse s'effectuer par la régulation de leur transcription.¹¹⁸⁻¹²⁰ Ce fait n'est pas si surprenant tenant compte des points suivants :

1. Le principal mode d'action des hormones sexuelles est la régulation de la transcription suite à une liaison à leurs récepteurs;¹²¹
2. Des récepteurs aux androgènes, aux œstrogènes et à la progestérone fonctionnels sont retrouvés dans des tissus qui expriment les canaux K^+ (utérus, cœur).^{73,92,101,122,123}

Le mode d'action classique des hormones sexuelles peut se résumer ainsi : l'hormone pénètre la membrane cellulaire par diffusion et se lie à son récepteur, le complexe migre alors vers le noyau où il agit comme facteur de transcription positif ou négatif.¹²¹ Un des mécanismes du ciblage des gènes par le complexe hormone-récepteur est la reconnaissance d'une séquence de nucléotides précise, l'élément de réponse. Le récepteur aux androgènes reconnaît la séquence : 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' alors que le récepteur aux œstrogènes se lie à cette autre séquence : 5'-AGGTCAAnnnTCACT-3'.¹²¹

L'étude des niveaux d'ARNm constitue une façon de vérifier l'impact des hormones sur la transcription. Il faut toutefois garder en tête qu'une perturbation des niveaux d'ARNm peut aussi être due à une dégradation ou stabilisation de l'ARNm, phénomènes totalement indépendants de la transcription. Toutefois, en tenant compte du mode d'action génomique des hormones sexuelles, il est légitime d'assumer un lien entre les niveaux d'ARNm et la transcription. Une des premières études à avoir démontré un lien entre l'expression des canaux Kv et les hormones sexuelles a été effectuée sur le muscle utérin. Song et coll. ont tout d'abord observé que les niveaux d'ARNm des canaux Kv4.3 étaient grandement réduits pendant la grossesse,¹²⁴ un phénomène associé à une augmentation significative des hormones sexuelles féminines. Cette diminution d'ARNm était accompagnée d'une densité protéique plus faible du canal et d'un courant I_{to} réduit. Ce groupe a ensuite montré que le phénotype

pouvait être reproduit chez des rates ovariectomisées (OVX) subissant un traitement aux œstrogènes mimant les niveaux atteints durant la grossesse. Ces résultats suggèrent fortement que les œstrogènes étaient impliquées dans les changements transcriptionnels observés chez la rate enceinte. Les hormones peuvent donc influencer la transcription des canaux Kv et moduler à la baisse ou à la hausse les courants K^+ résultants.

1.10 Effet des hormones sexuelles mâles sur la repolarisation

À ce jour, très peu d'études expérimentales visant à comprendre les effets des androgènes sur la repolarisation cardiaque ont été réalisées. De celles-ci, aucune n'a utilisé la souris comme modèle animal. En fait, la majorité des études a été effectuée chez le lapin. Deux de ces études ont testé l'effet de la DHT sur la repolarisation ventriculaire. Dans les deux cas, des lapins femelles OVX ont été traités à la DHT durant 20 jours. Hara et coll. ont observé une diminution de la durée du potentiel d'action chez les lapins OVX traitées à la DHT.¹²⁵ Ces données supportent l'hypothèse que les androgènes favorisent une repolarisation rapide. Les courants K^+ n'ayant pas été étudiés, on ne sait si l'augmentation de ceux-ci était responsable du raccourcissement de la repolarisation. Le second groupe a observé que les niveaux d'ARNm du canal Kv1.5 et de minK étaient diminués suite au traitement à la DHT. Ils ont aussi observé que les lapins OVX recevant de la DHT avaient une repolarisation plus lente que les OVX non traités.¹¹⁹ Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Hara et coll. et sont difficiles à interpréter. En effet, les courants associés aux deux canaux affectés, I_{Kur} (Kv1.5) et I_{Ks} (minK), ont des rôles très limités chez le lapin et ne peuvent donc pas expliquer la prolongation de l'intervalle QT. Un troisième groupe a étudié l'effet d'une déficience en androgènes chez le lapin et n'a détecté aucun changement dans la durée des potentiels d'actions.¹¹⁶ Vu les discordances des quelques études portant sur l'effet des hormones sexuelles mâles au niveau de la repolarisation ventriculaire, d'autres études sur ce sujet sont clairement justifiées.

1.11 Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse

Trois grandes conclusions pouvant être tirées de l'étude de Trépanier-Boulay et coll.¹¹⁸ ont guidé l'élaboration des travaux présentés dans cette thèse.

- La souris, comme l'humain, présente une différence mâle/femelle dans la repolarisation cardiaque, ce qui renforce la validité de ce modèle pour l'étude des différences électrophysiologiques liées au sexe;
- Un courant K^+ , et non Na^+ ou Ca^{2+} , est responsable de cette différence;
- Une régulation de la transcription du canal K^+ est impliquée dans la densité plus faible du courant.

Par ailleurs, les observations suivantes nous ont permis de préciser nos objectifs.

- Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que les androgènes affectent la repolarisation,^{50-52,56,57}
- Des études expérimentales ont montré que les hormones sexuelles régulent l'expression des canaux K_v ;^{119,124}
- La souris et le cobaye possèdent des courants K^+ cardiaques complémentaires qui réunis, englobent ceux de l'humain;
- Le profil sexuel de ces espèces est similaire à celui de l'humain.

Ainsi, les objectifs de cette thèse de doctorat furent de :

- Vérifier l'implication des androgènes dans la différence mâle/femelle observée dans la repolarisation cardiaque de la souris;
- Étudier les différences reliées au sexe dans l'électrophysiologie cardiaque du cobaye en portant une attention particulière aux courants I_{Kr} et I_{Ks} .

CHAPITRE 2 Méthode pour séparer les courants K^+ fonctionnels dans le cœur de souris

Les potentiels d'action très brefs des souris sont adaptés à leur rythme cardiaque rapide. Il n'est donc pas surprenant de retrouver chez cette espèce une densité élevée de courant K^+ , responsable de la repolarisation du potentiel d'action. Le courant K^+ global de la souris comprend quatre courants distincts dont trois sortants (I_{to} , I_{Kur} et I_{ss}) et un entrant (I_{K1}). Il est relativement facile de distinguer ces deux classes mais la tâche se complexifie lorsqu'il s'agit de séparer les courants sortants. Le défi provient du fait que ces courants s'activent tous à des voltages similaires et que certains d'entre eux ont des cinétiques semblables.

Avant la publication de notre étude, les choix suivants s'offraient pour l'étude des courants de repolarisation chez la souris :

1. Étude du courant K^+ sortant total;
2. Analyse par lissage de la phase d'inactivation du courant K^+ sortant total;
3. Utilisation d'inhibiteurs de canaux K^+ .

Ces trois types d'analyse comportent des limitations importantes. Tout d'abord, l'analyse du courant sortant total est incomplète. En effet, les courants responsables d'une baisse ou d'une hausse du courant total ne seront jamais identifiés par cette méthode. De plus, elle limite la détection d'un remodelage cellulaire au cours duquel un courant serait diminué alors qu'un autre serait augmenté. L'analyse de la densité des courants par le lissage de courbe repose sur l'observation que les trois courants sortants ont des vitesses d'inactivation différentes. Bien qu'il soit vrai que la phase d'inactivation est modulée par l'inactivation distincte des trois courants sortants, elle est aussi dépendante de la qualité de l'enregistrement. En effet, la compensation électronique effectuée pendant l'enregistrement de courants électriques affecte directement ce paramètre. Si la compensation n'est pas optimale, dû à un expérimentateur peu aguerri ou à des conditions d'enregistrement changeantes, la phase d'inactivation en sera affectée ainsi que les résultats du lissage. De plus, ce type

d'analyse ne permet pas l'étude du recouvrement de l'inactivation et de l'inactivation à l'équilibre, des paramètres ayant de grandes implications physiologiques. Cette limitation majeure est aussi partagée par la troisième technique. De plus, il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques pour tous les courants. Par exemple, l'agent utilisé pour inhiber I_{ss} , le tétraéthylamonium, affecte aussi I_{Kur} et I_{K1} .¹⁰⁰

En rendant possible la séparation des trois courants sortants, notre technique procure les avantages suivants :

1. Une analyse individuelle des densités, des phases d'activation et d'inactivation des trois courants sortants;
2. La possibilité d'étudier le recouvrement de l'inactivation et l'inactivation à l'équilibre;
3. La visualisation des divers courants au cours même d'une expérience.

L'article suivant présente et valide notre technique de séparation des courants K^+ chez la souris. De plus, il décrit les propriétés et les rôles fonctionnels de chacun des courants sortants.

Journal of Physiology 559.3 (2004) 777-798

FUNCTIONAL PROPERTIES OF K⁺ CURRENTS IN ADULT MOUSE VENTRICULAR MYOCYTES

Judith Brouillette,^{1,2*} Robert B. Clark,^{3*} Wayne R. Giles^{3,4} and Céline Fiset^{1,2†}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute

² Faculty of Pharmacy, University of Montreal
Montréal, Québec, Canada


³ Departments of Physiology and Biophysics
University of Calgary, Faculty of Medicine
Calgary, Alberta, Canada, T2N 4N1

⁴ Department of Bioengineering, University of California
San Diego, California, 92093-0412

*These two authors contributed equally to this study

Running title: Action Potential Repolarization in Murine Cardiac Myocytes

Keywords: electrophysiology, heart, K⁺ currents
Cell physiology

†Corresponding author: Céline Fiset, PhD
Research Center, Montreal Heart Institute
5000 Bélanger Est, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8
phone : (514) 376-3330 (3025)
fax : (514) 376-1355


SUMMARY

Although the K^+ currents expressed in ventricles in hearts of adult mice have been studied extensively, detailed information concerning their relative sizes and biophysical properties in ventricle and atrium is lacking. Here we describe and validate pharmacological and biophysical methods that can be used to isolate the three main time- and voltage-dependent outward K^+ currents which modulate action potential repolarization. A Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current, I_{to} , can be separated from total outward current using an “inactivating prepulse”. The rapidly activating, slowly inactivating delayed rectifier K^+ current, I_{Kur} , can be isolated using sub-millimolar concentrations of 4-aminopyridine (4-AP). The remaining K^+ current, I_{ss} , can be obtained by combining these two procedures: (i) inactivating I_{to} and (ii) eliminating I_{Kur} by application of low concentration of 4-AP. I_{ss} activates relatively slowly and shows very little inactivation, even during depolarizations lasting several seconds. Our findings also show that the rate of reactivation of I_{to} is more than 20-fold faster than that of I_{Kur} . These results demonstrate that the outward K^+ currents in mouse ventricles can be separated based on their distinct time- and voltage-dependence, and different sensitivities to 4-AP. Data obtained at both 22°C and 32°C demonstrate that although the duration of the inactivating prepulse has to be adapted for the recording temperature, this approach for separation of K^+ current components is also valid at more physiological temperatures. To demonstrate that these methods also allow separation of these K^+ currents in other cell types, we have applied this same approach to myocytes from mouse atria. Molecular approaches have been used to compare the expression levels of different K^+ channels in mouse atrium and ventricle. These findings provide new insights into the functional roles of I_{Kur} , I_{to} , and I_{ss} during action potential repolarization.

INTRODUCTION

The extensive efforts to develop transgenic mouse models of cardiovascular diseases have resulted in strong interest in defining the functional properties and molecular basis of the K^+ currents in mouse heart. Accordingly, a number of detailed studies focussing on K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes have appeared (Benndorf *et al.*, 1987; Wang & Duff, 1997; Barry *et al.*, 1998; Babij *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; London *et al.*, 1998a; London *et al.*, 1998b; Guo *et al.*, 1999; Wickenden *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999a; Xu *et al.*, 1999b; DuBell *et al.*, 2000; Jeron *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; London *et al.*, 2001; Zaritsky *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003; Brunet *et al.*, 2004; Bondarenko *et al.*, 2004). In combination, these results provide a reasonably consistent and quite detailed account of the number and type of time- and voltage-dependent K^+ currents expressed in adult mouse ventricle. Although a number of different strategies have been developed for separating the total K^+ current into individual K^+ conductance components, none of these approaches are optimal for discerning the functional roles of these K^+ conductances. The separation of the outward K^+ currents in mouse ventricle is particularly challenging because a number of distinct, relatively large K^+ currents activate in a similar voltage range and with comparable kinetics. To fully understand action potential repolarization, more detailed knowledge of the biophysical properties of each of these K^+ currents is needed. In addition, understanding the functional role(s) of the different repolarizing K^+ currents expressed in adult mouse ventricular myocytes will provide essential insights into murine models of repolarization abnormalities.

The main goals of the present study were: (1) to develop an experimental approach that allows direct determination of the amplitude and kinetics of each individual K^+ current, and yields these findings during an experimental protocol, as opposed to requiring extensive off-line analyses, (2) to provide a comprehensive description of the densities and the biophysical and pharmacological properties of the K^+ currents of adult mouse right ventricle, and (3) to use this information to determine the role of each K^+ current in modulating the repolarization phase of the

action potential. In addition, we have applied these methods to adult mouse atrial myocytes. The resulting data allow a detailed comparison of the current density of the different K^+ currents which are expressed in these two heart chambers. These include: i) a Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current (I_{to}), ii) an ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}), and iii) a slowly activating and noninactivating (steady-state) outward K^+ current (I_{ss}). To relate our data to previously published molecular characterizations of K^+ channel subunits in adult mouse atria and ventricles, we have supplemented electrophysiological findings with molecular data which compare the expression levels of several K^+ channel α -subunits in the atria and ventricles of the adult mouse heart.

METHODS

Isolation of Myocytes

The enzymatic dispersion technique used to isolate single ventricular myocytes from adult male Swiss-Webster or CD-1 mice (2-3 months of age) has been described in detail previously (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001; Brouillette *et al.*, 2003). Briefly, in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines, animals were heparinized, anaesthetized by inhalation of isoflurane and then killed by cervical dislocation. The hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused through the aorta using a modified Langendorff apparatus. The following solutions were applied: (i) HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 0.33 Na₂HPO₄; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH) for 5 min; (ii) Tyrode solution without added Ca²⁺ (“Ca²⁺-free”) for 10 min; (iii) Ca²⁺-free Tyrode solution containing 73.7 U ml⁻¹ collagenase type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA); 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA); 20 mM taurine and 30 μM CaCl₂ for 20 min; and (iv) a “KB” solution (Isenberg & Klockner, 1982) containing (in mM): 100 K-glutamate; 10 K-aspartate; 25 KCl; 10 KH₂PO₄; 2 MgSO₄; 20 taurine; 5 creatine base; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA; 20 glucose (pH adjusted to 7.2 with KOH) for the final 5 min. During the entire perfusion procedure the solutions were maintained at 37 ± 1°C and were constantly gassed with 100% O₂. The heart was removed from the perfusion system at the end of the perfusion sequence, and the right ventricular free wall was cut into small pieces in the KB solution. The pieces were triturated gently until they were dissociated into rod-shaped single myocytes. Isolated myocytes were stored in KB solution at 4°C until use. For atrial myocytes, the methods were similar except the digestion period (iii) was 25 min. The atrial myocytes were obtained from both left and right atria.

Electrophysiological recording procedures and data analysis. An aliquot of solution containing individual myocytes was placed in a recording chamber (volume ~ 200 μl) mounted on the stage of an inverted microscope. After allowing 5-10 min for the myocytes to settle to the bottom of the chamber, they were continuously

superfused with HEPES-buffered Tyrode solution containing (mM): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, and 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH). 4-Aminopyridine (4-AP) was added to the Tyrode solution at the concentrations indicated. Experiments were carried out at room temperature (20-22 °C), or 32 ± 1 °C, as indicated. Superfusion solutions were constantly equilibrated with 100% O₂. In this study, K⁺ currents were recorded in absence of L-type Ca²⁺ channels blockers, e.g., inorganic ions such as Cd²⁺, Mn²⁺ or Co²⁺. This allows recordings of K⁺ currents and action potentials from the same myocyte and avoided the known effects of these compounds on the voltage-dependence and kinetics of I_{to} (Agus *et al.*, 1991). Furthermore, Ca²⁺ currents were small under the recording conditions used here (i.e., 1 mM external Ca²⁺, room temperature), and hence the outward currents were not significantly distorted by the presence of underlying inward Ca²⁺ currents. To rule out the possibility that the K⁺ currents records were significantly distorted by Ca²⁺ currents, we measured K⁺ currents in the absence or presence of 100 μM cadmium chloride in the same ventricular cell. These experiments were carried out at both 22°C and 32°C. At each of these temperatures, the current-voltage relations of K⁺ currents recorded with and without cadmium were not significantly different, although the membrane potential dependence of I_{to} was shifted to more depolarized membrane potentials (data not shown).

Whole-cell voltage and current recordings were made using a patch-clamp amplifier (AXOPATCH 200B, Axon Instruments, Foster City, USA). Pipettes were made from borosilicate glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL., USA), and had resistances in the range 1.5-4 MΩ when filled with the following solution (mM): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 EGTA or BAPTA, 4 K₂ATP and 10 HEPES (with EGTA, pCa ~ 8.2; with BAPTA, pCa ~ 7.5) (pH adjusted to 7.2 with KOH). Pipette series resistance in the whole-cell mode was in the range of 4-8 MΩ; series resistance (R_s) compensation was applied to reduce R_s by 80-90%. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1 kHz with a 4-pole Bessel analog filter, digitized at 4 kHz and stored in a microcomputer using PCLAMP 8.0 software (Axon Instruments).

Voltage-clamp protocols and data analysis. Current magnitudes were normalized to cell capacitance. Capacitive currents elicited by a 10 mV depolarizing step from a holding potential of -80 mV were filtered at 10 kHz and digitized at 25 kHz. Cell capacitance was determined from the integral of these current transients. The mean capacitance of a sample of adult mouse right ventricular cells was 84.2 ± 5.6 pF (n= 24). The mean resting membrane potential of right ventricular myocytes was -73.7 ± 0.8 mV (n=42).

Recorded membrane potentials were corrected by -10 mV to compensate for the patch pipette-bath liquid junction potential. The voltage dependence of steady-state inactivation was obtained using a two-step protocol consisting of an “inactivating prepulse” to selected potentials (between -110 and -20 mV), followed by a fixed “test” pulse to +30 mV. The duration of the inactivating and test pulses depended on which current component was being measured; details are given in Results. The test current amplitude at each prepulse potential was normalized to the maximal amplitude of this current (I/I_{\max}), and plotted as a function of the inactivating prepulse potential. Data were fit to a Boltzmann equation: $I/I_{\max} = 1/[1 + \exp((V_m - V_{1/2})/S_{1/2})]$, where $V_{1/2}$ represents the membrane potential (V_m) at which 50% of the channels are inactivated and $S_{1/2}$ is the mid-point slope factor. Recovery from inactivation was studied using a two-step protocol in which an inactivating step to +30 mV was followed by an identical test step, delivered at a series of time intervals between the inactivating and test steps. The ratio of the current amplitude elicited by the second (test) to the first (inactivating) pulse (P_2/P_1) was plotted as a function of the interpulse interval yielding the time course of recovery from inactivation. Exponential functions were fitted to these data as described below.

Current sizes were measured relative to the zero current level, except where noted. Plotting of membrane voltage and current records, and curve fitting of Boltzmann equation and exponential functions were done using SIGMAPLOT (Jandel Scientific Software, CA), Origin (OriginLab, MA) and Clampfit (Axon Instruments, CA).

Ribonuclease Protection Assay. A RNase protection assay was used to compare the mRNA levels for Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and Kv4.3 K⁺ channel α -subunits in ventricular and atrial tissues obtained from adult male mice. The preparation of the RNA and the RNase protection assay were performed as previously described (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001). For ventricular RNA, only the lower (apical) 3/4 of the ventricles was used to ensure that no atrial or aortic tissue was present. For atrial RNA, only left and right atrial appendages were used. Areas around the major vessels were removed to avoid inclusion of vascular tissue and/or parasympathetic cardiac ganglia. The wet weights were about 100 mg for ventricular tissue, and 5 mg for atria tissue. Each atrial sample used for RNA extraction was pooled from dissections of four or five animals. Transcription was carried out using the MAXIscript In Vitro transcription kit (Ambion; Austin, TX). The RNase protection assays were performed using the RPA III[®] Kit (Ambion). The total RNA samples and the probes were hybridized at 48°C overnight. Mouse β -actin was included in all reactions as an internal control. The mRNA transcript levels were quantified on a Bio-Rad[®] PhosphorImager.

Statistical analysis. Averaged values are shown as Mean \pm S.E.M., and n refers to the number of different cells. Parameters obtained from curve fitting are shown as the value \pm S.E.M. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were determined with a two-tailed, paired or unpaired Student's *t* test, or an analysis of variance, when appropriate.

RESULTS

Separation of the three outward K^+ currents in mouse ventricle: I_{to} , I_{Kur} , I_{ss}

The complex and multiphasic decay of outward currents in adult mouse ventricular myocytes reflects the differential inactivation of the K^+ currents which are expressed in this tissue (Xu *et al.*, 1999b). It is known that the inactivation of each of these K^+ currents exhibits distinct time- and voltage- dependence. Advantage can be taken of the presence of “fast” and “slow” phases of inactivation of these currents in specifying voltage clamp “inactivating” protocols to emphasize or isolate the different K^+ conductances. In our study, based in part on previous results, which demonstrated that the inactivation phase of K^+ currents in mouse ventricle is multi-exponential, a voltage protocol was designed to selectively inactivate one component without significantly affecting the others. Figure 1A shows the effect of increasing the duration of an “inactivating prepulse” on the most rapidly decaying component of outward current when recording at room temperature. Note that the peak outward current decreased significantly as the prepulse duration was increased from 10 ms to about 50 ms, and that it decreased further, but by a proportionally smaller amount, as the prepulse duration was further increased up to 300 ms (see below). Figure 1B shows that the “fast” and “slow” phases of inactivation of the outward current produced by a strong depolarizing step (e.g., +30 mV) can be separated using a voltage-clamp protocol which includes a short prepulse which immediately precedes the main depolarizing step. In this experiment, a 500 ms depolarizing voltage-clamp step to +30 mV produced a rapidly activating current that decayed in distinct “fast” and “slow” phases. If a 100 ms “inactivating prepulse” to -40 mV preceded the +30 mV step, the initial “fast” phase of current decay (which corresponds to I_{to}) was abolished, but there was no significant effect on the magnitude or time-course of the “slow” phase of decay. This finding was confirmed on 6 different myocytes. This “voltage-sensitive” component of the current, determined by subtracting the current record obtained with the inactivating prepulse voltage-clamp protocol from the current record obtained without the prepulse, consisted of a very rapidly activating (<2 ms) outward current that inactivated almost completely within about 150-200 ms.

Such voltage-sensitive difference currents obtained with longer prepulse durations (> 100 ms) often had a second, considerably slower phase of current decay which had a much smaller amplitude than the rapid decay. The time-course of inactivation of the voltage-sensitive current was well fitted by a single exponential function; the time constant of inactivation (at a membrane potential of +30 mV) ranged from 20 to 35 ms in 12 different myocytes (28.0 ± 1.2 ms). This voltage-sensitive difference current corresponds to the Ca^{2+} -independent transient outward current, I_{to} . Figure 1C shows current recordings obtained with the protocol used in Figure 1A in the presence of 100 μM 4-AP. At this concentration, 4-AP blocks I_{Kur} without any significant effect on I_{to} (see below, Fig 2). The duration of the inactivating step (-40 mV) was increased in 10 ms increments from 0 to 60 ms, and then in 100 ms increments to 300 ms. Note the decrease in peak current with increasing prepulse duration. To analyze these data, the current activated following the longest prepulse was subtracted from each of the currents; the resulting "difference currents" were normalized with the one obtained without prepulse. This ratio was then plotted against the inactivating prepulse duration (Figure 1D). A single exponential function was fitted to the data and yielded a time constant of 19.0 ± 1.7 ms ($n=8$). This procedure illustrates that to ensure complete inactivation of I_{to} , the duration of the inactivating prepulse should correspond to approximately 5 times its inactivation time constant (in this case 100 ms prepulse duration). The next step was to verify that the selected prepulse duration did not alter I_{Kur} (see Figure 2).

Low concentration of 4-aminopyridine was used to block a rapidly activating, slowly inactivating outward K^+ current (I_{Kur}). The current remaining after inactivation of I_{to} is denoted I_{Kslow} and is composed of I_{Kur} (or the 4-AP-sensitive component) and I_{ss} (or the 4-AP-resistant component). Our previous work (Fiset *et al.*, 1997a; Trépanier-Boulay *et al.*, 2001; Brouillette *et al.*, 2003) demonstrated that adult mouse ventricular myocytes express a K^+ current that can be blocked by low concentrations (10-200 μM) of 4-AP, results which have been confirmed by others (Zhou *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999b; DuBell *et al.*, 2000; London *et al.*, 2001). Figure 2A shows the effect of 100 μM 4-AP on membrane current produced by a 500 ms

voltage-clamp step, in this case to +10 mV. The main effect of 4-AP was to abolish the large, slowly inactivating phase of the current (corresponding to I_{Kur}). In the presence of 4-AP, the outward current waveform consisted of a transient current that rapidly decayed to a constant level by the end of the 500 ms voltage-clamp step. Figure 2A also compares the effect of an inactivating prepulse on the membrane currents before and after the addition of 4-AP. As shown in Figure 1, in the absence of 4-AP the prepulse abolished the rapidly inactivating component of the current (I_{to}). The prepulse had a very similar effect in the presence of 4-AP: the initial transient current component (I_{to}) was abolished by the prepulse, leaving a current that slowly activated to a constant magnitude during the duration of the voltage-clamp step (I_{ss} ; see below). The magnitude and time-course of the 4-AP-sensitive current was obtained by subtracting current records after application of 4-AP from those obtained in the absence of 4-AP. Since two different voltage-clamp protocols were used (i.e., a depolarizing step with or without the inactivating prepulse), the 4-AP-sensitive current (or I_{Kur}) could be obtained by subtracting two different pairs of current records. Figure 2A shows that the 4-AP-sensitive currents obtained by subtracting pairs of currents (i.e., before and after 4-AP), obtained either with or without the inactivating prepulse, were virtually identical in magnitude and time-course, demonstrating that the inactivating prepulse had no significant effect on the 4-AP-sensitive current. Very similar results were obtained when these subtraction experiments were repeated on 6 different cells. This is shown in Figure 2C. The 4-AP-sensitive current activated rapidly, but inactivated much more slowly than I_{to} . By the end of the 500 ms voltage-clamp steps to +10 mV, this current had inactivated to about 30% of its peak. Complete inactivation of the 4-AP-sensitive current required voltage-clamp steps of at least 2 sec duration (cf. Figure 3). Figure 2A shows that the rapidly activating, slowly inactivating outward K^+ current (I_{Kur}) can be isolated (identified) using a low concentration of 4-AP and that this current is not affected by the prepulse used to inactivate I_{to} . Additional experiments using a different depolarizing voltage (+30 mV instead of +10 mV) showed that the subtraction procedure yielded similar results (e.g., Figure 12).

To evaluate the selectivity of this pharmacological manoeuvre additional experiments were done to evaluate whether the concentration of 4-AP used to block I_{Kur} altered I_{to} . Figure 2B shows that I_{to} obtained by subtracting the pairs of currents (with and without the prepulse) in control conditions was very similar to I_{to} obtained by subtracting the pairs of currents in the presence of 4-AP. Similar results were obtained in 6 different cells (see Figure 2C). Comparable results were also obtained for test pulses of +30 mV (data not shown). These data are consistent with the relatively low sensitivity of I_{to} in mammalian myocytes to 4-AP; the 50% blocking concentration of 4-AP is in the range 1-5 mM (Josephson *et al.*, 1984; Wettwer *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1995; Fiset *et al.*, 1997b), hence 100 μ M 4-AP would be expected to have little effect on the amplitude of I_{to} .

The third component of outward K^+ current in adult mouse ventricle is a slowly activating, 4-AP-resistant current (I_{ss}). The “4-AP-resistant” outward current that remained in the presence of 100 μ M 4-AP (Figure 2) resembled a relatively slowly activating, non-inactivating delayed rectifier. However, block of K^+ channels by 4-AP can exhibit complex time and voltage-dependence (Campbell *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 1996). It was therefore very important to establish whether the residual 4-AP-resistant current was a component distinct from I_{to} and I_{Kur} , or whether it resulted from incomplete block by 4-AP of I_{Kur} . Figure 3 shows data from an experiment that was designed to distinguish between these possibilities. In this experiment, a depolarizing voltage-clamp step that was of sufficient duration (in this case, 5 sec) to completely inactivate I_{Kur} was applied to a ventricular myocyte. This long depolarizing step was followed by a second, shorter (750 ms) depolarizing step. A brief (100 ms) “gap”, at -40 mV, was interposed between the two depolarizing steps. Note that in control conditions the current produced by the second depolarizing step activated slowly, and maintained a constant amplitude throughout the 750 ms step. The same voltage-clamp protocol was repeated after application of 100 μ M of 4-AP. As shown in Figure 2, the slowly inactivating component of current elicited by the first depolarizing step was abolished by 4-AP; however, the slowly activating current produced by the second depolarizing step was identical to that recorded under

control conditions. Subtraction of the current records before and after application of 4-AP showed that the 4-AP-sensitive current (i.e., I_{Kur}), which was activated by the first step was completely inactivated by the end of the 5 sec step. Subtraction of the currents also showed that there was no net difference current during the second step; this finding indicates that the current activated in the absence of I_{Kur} was very similar whether I_{Kur} was removed by either inactivation, or by block by 4-AP. These data confirm that the 4-AP-resistant current is a K^+ current which is distinctly different from either I_{to} or I_{Kur} , and that its slow activation kinetics are not an artefact due to complex channel blocking actions of 4-AP. These results also demonstrate that the concentration of 4-AP used to block I_{Kur} did not affect the non-inactivating current since the amplitude of the currents elicited by the second pulse in absence or presence of 4-AP were identical. This 4-AP-resistant delayed rectifier showed little inactivation, even during long depolarizations (Figure 3), accordingly, it is denoted as the “steady-state” current, or “ I_{ss} ”.

Separation of the outward K^+ current at 32°C

Figures 1-3 describe the strategy used to separate the outward K^+ currents which are expressed in adult mouse ventricular myocytes when recording at room temperature. To determine whether this method is also valid when data are obtained at more physiological temperatures, we repeated the experiments presented in Figure 1C at 32°C. Our results demonstrate that although the protocol has to be adapted, the same strategy can be applied at more physiological temperatures. At 32°C, a 100 ms prepulse completely inactivated I_{to} but also inactivated a fraction of I_{Kur} due to its faster kinetics at more physiological temperatures (data not shown). Accordingly, the duration of the inactivating prepulse had to be reduced. To establish the appropriate parameters for the separation protocol to be used at 32°C, we applied the same strategy that we used at room temperature (see Figures 1-2). Figure 4 presents data obtained at 32°C with the protocol outlined in Figure 1 in the presence of 100 μ M 4-AP. The duration of the inactivating prepulse varied from 5 ms to 50 ms. At 32°C, the peak current was decreased following a much shorter prepulse than at room temperature because the time constant of inactivation of I_{to} (calculated from the plot of the ratio of the “difference currents” (P_n/P_0) vs. the prepulse duration) was

significantly faster at 32°C; the time constant of I_{to} inactivation was 10.1 ± 0.7 ms at 32°C, and at 22°C it was 19.0 ± 1.7 ms. These data were obtained from seven different cells and are presented in Figure 4B. Based on these results, the duration of the inactivating prepulse at 32°C was set to 50 ms. We repeated the experiments presented in Figure 2 at 32°C and confirmed that a 50 ms prepulse has no detectable effect on I_{Kur} and also showed that the effect of 100 μ M 4-AP on I_{to} at 32°C was minimal (Figure 4C). This pattern of results was confirmed in each of the six different myocytes studied.

Contribution of current components to I-V relationship and ventricular action potential. The data shown in Figures 1 to 4 and results from other laboratories (Heath *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999b; DuBell *et al.*, 2000; Knollmann *et al.*, 2000; Nerbonne, 2000; Brunet *et al.*, 2004) make it clear that outward K^+ currents in adult mouse right ventricular myocytes consist of at least three distinct components. Each has different kinetics of activation and inactivation, a distinct voltage range for inactivation, and sensitivity to block by 4-AP. To gain information concerning the functional significance of these currents, it is necessary to determine their relative magnitudes, and hence their contributions to the peak I-V relationship. Figure 5A illustrates an example of the three K^+ current components activated in a ventricular myocyte by a voltage-clamp step to +30 mV and recorded at room temperature.

The components of K^+ currents were isolated using the voltage-clamp and pharmacological protocols outlined in Figures 1 and 2. Figure 5B shows an example of the three outward K^+ currents activated at 32°C by a +30 mV step. As expected, the kinetics of activation and inactivation of each current component were faster and the amplitude was larger at 32°C than at room temperature. Note however, that at both 22°C and 32°C, I_{to} and I_{Kur} were the two largest components. This pattern of responses was observed in the majority (> 95%) of the right ventricular myocytes studied. The mean peak current densities (at +30 mV) of each of the three components recorded at 22°C and 32°C are shown in Figure 5C. The current densities of I_{Kur} and I_{to} were not significantly different from each other, while I_{ss} was

significantly smaller than either I_{Kur} or I_{to} ($p < 0.05$) at both temperatures. The activation threshold for I_{Kur} and I_{to} was about -40 mV; I_{ss} was first detectable at about -30 mV. All three current components exhibited outward rectification over the potential range of -40 mV to $+50$ mV.

A visual inspection of the recording presented in the lower panel of Figure 5A shows that the activation rate differed significantly among these three K^+ currents. We measured the rate of activation by fitting the activation phase of each type of K^+ current with a single exponential function. Figure 6 presents the activation time constants for the three K^+ currents. These parameters were obtained at two different membrane potentials ($+10$ and $+30$ mV) at room temperature. At both membrane potentials, both I_{to} and I_{Kur} had fast activation rates while I_{ss} activated much more slowly. For example, at $+10$ mV, the activation rate of I_{ss} was 30 times and 11 times slower than that of I_{to} and I_{Kur} , respectively. All three K^+ currents displayed a faster activation at $+30$ mV compared to $+10$ mV, but this difference was more pronounced for I_{ss} .

Mouse ventricular myocytes have action potentials that are very brief compared with most other mammalian cardiac action potentials (Fiset *et al.*, 1997a; Barry *et al.*, 1998; London *et al.*, 1998b; London *et al.*, 2001; Trépanier-Boulay *et al.*, 2001; Knollmann *et al.*, 2001; Danik *et al.*, 2002; Brouillette *et al.*, 2003; Brunet *et al.*, 2004). We previously reported that action potentials in isolated adult mouse ventricular cells (4 Hz, room temperature) had 50% and 90% durations, which averaged 6.0 and 20.7 ms (Fiset *et al.*, 1997a), respectively, and that action potential duration (APD) was significantly prolonged by concentrations of 4-AP that selectively blocked I_{Kur} (Fiset *et al.*, 1997a; Trépanier-Boulay *et al.*, 2001). Figure 7A and C shows an example of the effect of blocking I_{Kur} on the action potential waveform, and on the K^+ currents activated at membrane potentials near the peak of the action potential, recorded from the same ventricular myocytes at room temperature. In control conditions, the peak of the action potential was about $+40$ mV, and complete repolarization occurred within about 25 ms. In the presence of 100 μ M of 4-AP, neither the resting membrane potential nor the peak overshoot of the

action potential were changed, but the time-course of repolarization was prolonged dramatically. For the example shown in Figure 7A, the 90% repolarization time increased from 13.7 ms to 49.5 ms. The maximum rate of repolarization of the action potential (Figure 7B), which occurred less than 1 ms after the peak, was reduced from -48.6 V/s to -23.1 V/s by 100 μ M 4-AP. In seven myocytes, the maximum rate of repolarization was reduced from -39.0 ± 2.5 V/s to -17.3 ± 2.3 V/s after application of 100 μ M 4-AP ($p < 0.001$; paired t-test). In addition, the membrane potential at which the maximum rate of repolarization occurred was more depolarized after application of 4-AP than it was in control conditions. For the example shown in Figure 7A, the maximum rate-of-repolarization occurred at +17.2 mV in control conditions, and +27.2 mV after 4-AP; for the same seven myocytes, maximum rate-of-repolarization occurred at $+13.9 \pm 3.8$ mV before, and $+23.7 \pm 3$ mV after application of 4-AP, respectively ($p < 0.01$; paired t-test). Figure 7C shows the net membrane currents produced by a voltage-clamp step from the resting membrane potential to the peak of the action potential. In control conditions, the peak outward current was 14.5 nA at this membrane potential (+40 mV); the peak current was reduced to 7.1 nA after blocking I_{Kur} with 100 μ M 4-AP. This large reduction in the magnitude of outward current contributed significantly to the more than two-fold increase in action potential duration measured at 90% of repolarization. The experiment illustrated in Figure 7A was repeated with a different myocyte at 32°C. For the example presented in Figure 7D, the 90% repolarization time increased from 20.3 ms to 49.4 ms in the presence of 100 μ M 4-AP. Figure 7E shows mean action potential duration measured at 20, 50 and 90% of repolarization recorded at 22°C and 32°C in the absence or in the presence of 100 μ M 4-AP. Under control conditions (without 4-AP) APD_{20} and APD_{50} were significantly shorter at 32°C than at room temperature, while APD_{90} was not significantly different at both temperatures. The block of I_{Kur} by 100 μ M 4-AP produced a comparable prolongation of the APD at 22°C and 32°C suggesting that the contribution of this current to the action potential waveform was similar at both temperatures.

Inactivation/reactivation of I_{to} in adult mouse ventricular myocytes. Figure 8 shows the membrane potential dependence of “steady-state” inactivation for I_{to} , obtained with a two-pulse protocol at 22°C (see Methods). The 100 ms-inactivating prepulse varied from -110 to -20 mV in 10 mV increments. The currents recorded with inactivating prepulses of -30 mV or -20 mV were not identical to that recorded with the -40 mV prepulse. There was an additional reduction of peak current at these voltages, compared with the -40 mV prepulse (see Figure 8A). We attempted to determine whether this loss of current corresponded to inactivation of I_{to} and/or I_{Kur} , by applying the same steady-state inactivation protocol in presence of 100 μ M 4-AP (Figure 8B), a concentration of 4-AP that does not block I_{to} (cf. Fig. 2). Our rationale was that if the reduction of current at positive prepulse corresponded to inactivation of I_{to} , we would observe a difference between the test pulse currents obtained with the -20, -30 and -40 mV inactivating prepulses. This was not the case; in presence of 4-AP, the test pulse currents obtained with prepulses at -20 mV, -30 mV and -40 mV superimposed (Figure 8B) and did not show any inactivating component. This finding ensures that in this voltage range, the prepulse can completely inactivate I_{to} . These results also confirm that the choice of -40 mV as the prepulse voltage used to separate I_{to} and I_{Kur} is optimal. Indeed, choosing a more positive prepulse voltage (-30 mV) would inactivate a small portion of I_{Kur} , while choosing a more negative voltage (-50 mV) would not fully inactivate I_{to} .

Figure 8C presents mean data for steady-state inactivation of I_{to} under control conditions and in presence of 100 μ M 4-AP. The amplitude of I_{to} for each prepulse potential was determined by subtracting each test pulse current from that obtained with the 100 ms prepulse at -40 mV (data presented in insets on Fig. 8A and B). The normalized current data were fitted to a Boltzmann function (see Methods), yielding a half-inactivation potential of -55.8 ± 1.3 mV, and a mid-point slope factor of 6.6 ± 0.5 mV for I_{to} under control conditions, and -53.5 ± 1.9 mV and 5.5 ± 0.5 mV in the presence of 4-AP. Neither the respective half-inactivation potentials nor the mid-point slope factors were significant different. In addition, Figure 8C shows that inactivation of I_{to} is almost completely removed at the normal resting membrane potential of

mouse ventricular cells, suggesting that this current plays an important functional role.

When the membrane potential dependence of steady-state inactivation of I_{to} was studied at 32°C very similar parameters were obtained (Figure 9). At 32°C, the amplitude of I_{to} corresponding to each prepulse potential was determined by subtracting the test pulse current from that obtained with a 50 ms prepulse at -40 mV (see Fig. 4 for justification of the prepulse duration and data presented in insets on Fig. 9A and B). This protocol also yielded important information about the choice of the inactivating prepulse (50 ms at -40 mV) used to eliminate I_{to} at 32°C. Similar to the pattern of results obtained at room temperature, Figure 9A shows that there was a progressive reduction of peak current when the inactivating voltage steps were varied from -40 mV to -20 mV. This reduction in current magnitude appeared to be associated with a decrease in the slow phase of inactivation of the current. We verified whether this reduction of current was due to reduction of I_{to} , I_{Kur} or both currents by repeating this protocol in the same myocyte in the presence of 100 μ M 4-AP (i.e. in the absence of I_{Kur}). Figure 9B shows that the reduction of current observed in Figure 9A was due to partial inactivation of I_{Kur} since the currents recorded following the -20, -30 and -40 mV inactivating pulses are superimposed in presence of 4-AP. These results confirmed that at 32°C, a 50 ms inactivating prepulse at -40 mV was sufficient to completely inactivate I_{to} , with minimal effect on I_{Kur} . These findings were confirmed on each of the six different cells studied.

Figure 9C presents mean data for steady-state inactivation of I_{to} under control conditions and in presence of 100 μ M 4-AP. The normalized current data were fitted to a Boltzmann function (see Methods), yielding a half-inactivation potential of -52.0 ± 0.7 mV, and a mid-point slope factor of 5.5 ± 0.6 mV for I_{to} under control conditions, and -51.4 ± 0.9 mV and 5.0 ± 0.5 mV in the presence of 4-AP. Neither the respective half-inactivation potentials nor the mid-point slope factors were significant different. Similar to what observed at 22°C, inactivation of I_{to} is almost completely removed at the normal resting membrane potential of mouse ventricular cells (Figure 9C).

Data describing the kinetics of reactivation or recovery of I_{to} from inactivation are summarized in Figure 10. The time-course of recovery was measured using a two-pulse voltage-clamp protocol (see Methods). An example of a family of currents that illustrates the time course of recovery at -80 mV is shown in Figure 10A. The membrane potential between the two pulses was changed to measure the time-course of recovery at three different membrane potentials in the diastolic range. I_{to} amplitude was measured as the difference between peak current and current 150 ms after the peak, which corresponds to approximately 5 times its macroscopic inactivation time constant at +30 mV, 22°C (28.0 ± 1.2 ms, $n=12$). The data of Figure 10B, summarized from seven different myocytes, shows the time-course of recovery at -60, -70 and -80 mV. Recovery was more rapid at more hyperpolarized potentials, and at -80 mV, near the normal resting membrane potential, recovery was complete in less than 200 ms. The mean data for each membrane potential were determined to approximate to single exponential functions (Figure 10B), with time constants of 34.6 ms at -80 mV, 55.0 ms at -70 mV, and 117.8 ms at -60 mV. These recovery experiments were repeated at 32°C. I_{to} amplitude was measured as the difference between peak outward current and current 50 ms after the peak, which corresponds to approximately 5 times its macroscopic inactivation time constant at +30 mV, 32°C (9.9 ± 0.6 ms, $n=10$). As expected, recovery from inactivation was faster at more physiological temperatures (at -80 mV, $\tau = 18.0 \pm 5.7$ ms, $n=6$).

Inactivation/reactivation of I_{Kur} in adult mouse ventricular myocytes. The voltage-dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} was measured with a two-pulse protocol similar to that used for I_{to} (Figure 8), except that the pulse durations were considerably longer because of the very much slower inactivation kinetics of I_{Kur} . Figure 11A shows an example of the membrane potential dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} measured with a two-pulse protocol. Note that the preconditioning pulse of 5 sec in duration (i.e. 50 times longer than the duration of the I_{to} inactivating prepulse) ensured that I_{Kur} was completely inactivated (cf., Figure 3). A 100 ms pulse to -40 mV was interposed between the inactivating and test pulses; this removed I_{to} from the test pulse current. Inactivating pulse potentials for the data shown in Figure 11A ranged from -80 mV to -20 mV. Figure 11B

summarizes normalized data from seven different myocytes. The Boltzmann function fitted to the data yielded a half-inactivation potential of -44.7 ± 1.7 mV, and a mid-point slope factor of 6.0 ± 0.6 mV. Steady-state inactivation was also studied at 32°C. The protocol included a 50 ms prepulse to -40 mV, as opposed to the 100 ms prepulse used at room temperature (see Figure 4 for justification of the prepulse duration). At 32°C, the Boltzmann function fitted to the data yielded a half-inactivation potential of -48.3 ± 1.3 mV and mid-point slope factor of 5.8 ± 0.5 mV, $n=12$.

Figure 11C describes the time course of recovery from inactivation of I_{Kur} at room temperature. The paired-pulse protocol used to measure the time-course of recovery was similar to that applied in I_{to} experiments, except that the inactivating pulse was 3-fold longer and both pulses were preceded by the I_{to} inactivating prepulse (100 ms, -40 mV). The current records shown in Figure 11C demonstrate that I_{Kur} recovered from inactivation much more slowly than I_{to} . Recovery was measured at membrane potentials of -60 , -70 and -80 mV, and data pooled from seven different myocytes are plotted in Figure 11D. As for I_{to} , recovery of I_{Kur} from inactivation was more rapid for more hyperpolarized potentials, but the time constants for recovery of I_{Kur} were more than 20-fold greater than the corresponding time constants for recovery of I_{to} . When these experiments were repeated at 32°C, the reactivation time of I_{Kur} was found to be much faster than at room temperature (at -80 mV, $\tau = 441 \pm 45$ ms, $n=13$). For these recovery experiments carried out at 32°C, the -40 mV prepulse duration was reduced to 50 ms.

Comparison of K^+ currents between adult mouse ventricular and atrial myocytes. To demonstrate that these voltage-clamp protocols, which we developed for studying K^+ current in mouse ventricle can also be used to separate time- and voltage-dependent K^+ currents in other cell types, we applied the same voltage-clamp protocols to adult mouse atrial myocytes. The data presented in Figure 12 compare the K^+ currents in adult mouse right ventricular and atrial myocytes recorded at room temperature. These findings show that the atrial K^+ currents consist of very similar components as those in adult mouse ventricular myocytes. The upper panel illustrates

total K^+ current elicited by 500 ms voltage clamp step to +30 mV, from a holding potential of -80 mV. As noted, in atrial cells, this depolarizing voltage step elicited outward current(s) with similar time- and voltage-dependence to those observed in ventricular myocytes. However, current density in atrial cells was 2- to 3-fold smaller. The current traces in the middle and lower panels of this figure compare K^+ currents recorded in presence of the inactivating prepulse without (middle) or with 4-AP (lower). In summary, in atrial myocytes, a transient K^+ current (I_{to}) is inactivated by the prepulse, and low concentrations of 4-AP completely blocks a slowly inactivating current (I_{Kur}). A 4-AP-resistant component of outward K^+ current that does not display inactivation (I_{ss}) is also observed (Lomax *et al.*, 2003). Figure 12C compares current densities (at +30 mV) for the three outward K^+ currents expressed in adult mouse right ventricular and atrial myocytes. These plots show that in atrial myocytes the current densities of I_{to} and I_{Kur} are significantly smaller than in adult mouse ventricle. Compared to the large I_{Kur} in ventricular myocytes (34.2 ± 3.5 pA/pF), I_{Kur} in adult atrial cells was small (7.3 ± 0.9 pA/pF). Also, the density of I_{to} measured at +30 mV was much larger in the ventricle compared to the atrium (34.5 ± 2.6 and 12.8 ± 2.9 pA/pF, respectively). Finally, we found that the electrophysiological features as well as the current density of I_{ss} were very similar between mouse ventricle and atrium (I_{ss} at +30 mV, 15.6 ± 1.6 and 12.6 ± 1.6 pA/pF, respectively).

Comparison of expression of K^+ channel isoforms in adult mouse ventricle and atrium. RNase protection assays were used to compare the RNA levels of Kv1.5 (encoding I_{Kur}), Kv2.1 (underlying I_{ss}), Kv4.2 and Kv4.3 (responsible for I_{to}) in adult mouse ventricular and atrial tissue. Figure 13A consists of an autoradiogram showing the relative levels of Kv1.5 transcript in adult mouse ventricle and atrium. This K^+ channel α subunit is expressed in both tissues; however, Kv1.5 is expressed at a much higher level in ventricle than in atrium. Quantification of mRNA levels (see Methods) showed that Kv1.5 transcripts were more than 3-fold more abundant in ventricle than in atrium. Kv2.1, Kv4.2 and Kv4.3 transcripts were also detected in both atrium and

ventricle (Figure 13B and C). Kv2.1 and Kv4.3 were detected at similar levels in both tissues, while the expression of Kv4.2 was higher in the ventricle.

DISCUSSION

Summary of findings. Our results demonstrate the utility of a biophysical and pharmacological approach for separating the three main time- and voltage-dependent components of the K^+ current which are expressed in cardiac myocytes isolated from the heart of adult mice. This approach provides an accurate description of densities and kinetic properties of these K^+ conductances during the time-course of an experiment. In addition, information regarding their functional significance in action potential repolarization is made available during each experiment. In agreement with previous analyses (Fiset *et al.*, 1997a; Trépanier-Boulay *et al.*, 2001; Brouillette *et al.*, 2003), our results show that the time- and voltage-dependent K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes can be separated using protocols that take advantage of their distinct kinetics and dependence on membrane potential, as well as differential sensitivity to the K^+ channel blocker, 4-AP. In the present study data were obtained at both 22°C and 32°C. As expected from classical findings and theory, our results confirm that this approach for separation of these components of K^+ current is as effective at “physiological” temperatures as it is at room temperature, although the duration of the inactivating prepulse has to be adapted to the altered current kinetics measured at 32°C.

I_{Kur} is a rapidly activating but slowly inactivating outward current, which apart from its very much slower rates of inactivation, is clearly different from I_{to} by its much higher sensitivity to 4-AP. The IC_{50} of 4-AP for I_{to} is 10-fold higher than that of I_{Kur} (Wettwer *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1995; Fiset *et al.*, 1997a). As a consequence, by applying an inactivating prepulse and by using a low concentration of 4-AP, we have been able to separate I_{Kur} and I_{to} . A third component of outward K^+ current is much more slowly activating, and shows virtually no inactivation, even for depolarizations lasting several seconds. This component, I_{ss} , can be distinguished from I_{Kur} on the basis of its sensitivity to 4-AP; I_{ss} is not affected by concentrations of 4-AP that completely block I_{Kur} (Zhou *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999b). Our data show that this K^+ current is distinctly different from either I_{to} or I_{Kur} , and provide evidence

that its slow activation kinetics are not an artefact due to complex channel blocking actions of 4-AP.

Previous work has provided strong evidence for general pattern of K^+ current expression which we have determined in adult mouse ventricle e.g. (Xu *et al.*, 1999b; Nerbonne, 2000). The majority of these studies have made use of knockout or dominant negative strategies to eliminate targeted K^+ channel α -subunits. The resulting changes in action potential waveform have been convincingly related to the documented alterations in K^+ currents using off-line biophysical analysis based on curve fits of mathematical expression consisting of sums of exponential functions to the experimental data. Our approach differs fundamentally and, as illustrated, can be used to advantage during an experiment, without concerns about cellular/tissue adaptations to the genetic manipulation. Our data (Figs 5, 6, 7) in conjunction with previously published findings provide important insights into the functional roles of I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} .

Recent papers from our group illustrate how the experimental approach described here can also be used to separate the K^+ currents which are expressed in adult mouse atrium (Lomax *et al.*, 2003) and in adult mouse ventricular endocardial myocytes (Kuo *et al.*, 2001) where $I_{to,s}$ (Kv1.4) (Guo *et al.*, 1999) is present.

Action Potential Repolarization

With this experimental design and our approach for data analysis, it is possible to determine the relative magnitudes of the three outward components, and hence to deduce their relative contributions to the peak I-V relationship and action potential repolarization. As mentioned, in right ventricular myocytes, the peak current densities of I_{Kur} and I_{to} were not significantly different, while I_{ss} was significantly smaller than either I_{Kur} or I_{to} (Fig 5). Our findings and the clear differences in activation and inactivation rates amongst these three K^+ currents reveal their roles in repolarization of the action potential. The large magnitude and rapid activation kinetics of both I_{to} and I_{Kur} result in these currents making a major contribution to early repolarization of action potential. In contrast, the activation of I_{ss} is more than 10-fold slower than either I_{to} or I_{Kur} at a membrane potential of +10 mV. Consequently, this K^+ current

would be expected to make a smaller contribution to the total peak outward current. In keeping with this, Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 1998) reported that high concentrations of tetraethylammonium (TEA; which block I_{ss}) produced only a slight inhibition of the outward current in mouse ventricular myocytes. In their study, the amplitude of the TEA-sensitive current was $< 10\%$ of total outward current. In addition, inhibition of this current by TEA did not significantly alter action potential duration, suggesting that the TEA-sensitive current does not play a major role in determining the action potential waveform. This finding is consistent with another study of Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 2003) which showed only a small effect of 5 mM TEA on the APD of mouse ventricle. However, DuBell *et al.* (DuBell *et al.*, 2000) have reported that 20 mM TEA produced a marked prolongation of APD. In the present study, we have examined the possibility that this discrepancy in the contribution of a TEA-sensitive component to the action potential may be related to the difference in recording temperatures between the study of DuBell *et al.* (32°C) and those of the other groups which were carried out at room temperature. To do so, we evaluated the contribution of the TEA-sensitive current on the action potential duration at room temperature and at 32°C . We observed that 20 mM TEA produces a similar prolongation of APD_{90} at 22°C and 32°C ($26 \pm 9\%$ and $39 \pm 4\%$, respectively, $n=3$, $P=0.2$). However, based on these data and the known non-linear relationship between K^{+} current magnitude and rate of repolarization of the action potential, it is not possible to define the contribution of I_{ss} to the APD. In fact, our TEA experiments showed that in addition to block of most I_{ss} , 20 mM TEA also inhibited a small portion of both I_{Kur} and the inwardly-rectifying background K^{+} current, I_{K1} .

As shown in Figure 5, I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} inactivate at very different rates; I_{Kur} inactivated 10-to-20-fold more slowly than I_{to} , while I_{ss} inactivates very little even during depolarization of 5 sec duration. In addition and more importantly for physiological responses, the time-course of reactivation of I_{to} was much faster than that of I_{Kur} at diastolic membrane potentials. Note that the time constants for recovery from inactivation of I_{Kur} were more than 20-fold greater than the corresponding time constants for I_{to} at membrane potentials in the normal diastolic range. These findings have important implications for the relative role of these K^{+} currents at (i) the very

high heart rate of the mouse and (ii) when heart rate is changed in response to physiological or imposed stimuli.

Comparisons of the expression of different K⁺ currents/channels in adult mouse ventricle and atrium. Electrophysiological data obtained with the approach described here show that all the major K⁺ currents expressed in adult mouse ventricular myocytes are also expressed in adult mouse atrial myocytes (Lomax *et al.*, 2003). In keeping with this, our studies of the levels of expression showed that all the K⁺ channel isoforms examined (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and Kv4.3) are present in both mouse ventricular and atrial tissues. The largest difference in K⁺ channel expression between atrium and ventricle was for Kv1.5 transcript: it was more than 3-fold more abundant in ventricle than in atrium. These expression data are consistent with the electrophysiological results obtained in both ventricle and atrium. In adult mouse heart, I_{Kur} shows significant chamber-specific expression. Although this current is relatively small in mouse atrial myocytes, it is a large and hence important repolarizing current in ventricle. All electrophysiological properties of I_{to} were very similar between atrium and ventricle; however the density of this current was much larger in the ventricle compared to the atrium (Figure 12) (Lomax *et al.*, 2003). The mRNA experiments showed that Kv4.2 and Kv4.3 were both expressed at significant levels in mouse atrium and ventricle. Kv4.2 was expressed at about 80% higher levels in ventricle compared with atrium, while Kv4.3 was expressed at approximately equal levels in both tissues. These findings suggest that the chamber-specific difference in the expression of I_{to} may be related to Kv4.2 expression. The density of I_{ss} as well as the Kv2.1 mRNA expression were similar between atrium and ventricle.

Contribution of K⁺ channel β -subunits. Voltage-gated K⁺ channels are protein complexes composed of four integral membrane α subunits and up to four cytoplasmic β subunits (England *et al.*, 1995a; Bekeler-Arcuri *et al.*, 1996). β -subunit association can contribute to the diversity of K⁺ currents in mammalian myocardium (England *et al.*, 1995b). β -subunits associate with the channel-forming α -subunits of K⁺ channels, influencing both the kinetics of these channels and their targeting/insertion into the

plasmalemma (Li *et al.*, 1992; Rettig *et al.*, 1994; Majumder *et al.*, 1995; England *et al.*, 1995a; England *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1996; Uebele *et al.*, 1996; Uebele *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1996). These distinct forms of regulatory interactions among the principal and β subunits of the voltage-gated K^+ channels serve to increase greatly the flexibility of their regulation and may play a critical role in defining the physiological properties of excitable cells (Isom *et al.*, 1994). Detailed examination of the functional role(s) of the β -subunits was not addressed in the present study, since we recognized that each subunit requires a complete electrophysiological / biophysical study. We note, however, that the approach for rapid, semi-quantitative determination of the K^+ current size and time-course made possible by methods developed and validated in this study will be essential for meaningful assessment of modulation of mouse heart repolarization by β -subunits, experimental pharmacological agents, autonomic transmitters or co-transmitters.

In summary, our action potential recordings, in combination with voltage-clamp data, strongly suggest that in ventricular myocytes, early repolarization is brought about by activation of both I_{to} and I_{Kur} . In the final phase of repolarization, I_{Kur} , I_{K1} and possibly I_{ss} contribute to outward current (Figs 5, 6, 7). These results, in combination with the recovery or reactivation data (Figs 10, 11) and steady-state inactivation curves (Figs 8, 11), provide significant new insights into several important aspect of the electrophysiology of the mouse heart.

REFERENCES

Agus ZS, Dukes ID & Morad M (1991). Divalent cations modulate the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* **261**, C310-C318.

Babij P, Askew R, Nieuwenhuijsen B, Su CM, Bridal TR, Jow B, Argentieri TM, Kulik J, DeGennaro LJ, Spinelli W & Colatsky TJ (1998). Inhibition of cardiac delayed rectifier K⁺ current by overexpression of the Long-QT syndrome HERG G628S mutation in transgenic mice. *Circ Res* **83**, 668-678.

Barry DM, Xu H, Schuessler RB & Nerbonne JM (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α -subunit. *Circ Res* **83**, 560-567.

Bekeler-Arcuri X, Matos MF, Manganas L, Strassle BW, Monaghan MM, Rhodes KJ & Trimmer JS (1996). Generation and characterization of subtype-specific monoclonal antibodies to K⁺ channel α - and β -subunit polypeptides. *Neuropharmacology* **35**, 851-865.

Benndorf K, Markwardt F & Nilius B (1987). Two types of transient outward currents in cardiac ventricular cells of mice. *Pflug Arch* **409**, 641-643.

Bondarenko VE, Szigeti GP, Bett GC, Kim S-J & Rasmusson RL (2004). A Computer Model of the Action Potential of Mouse Ventricular Myocytes. *Am J Physiol* **287** H1387-H1403.

Brouillette J, Trepanier-Boulay V & Fiset C (2003). Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol (London)* **546**, 403-413.

Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA & Nerbonne JM (2004). Heterogeneous Expression of Repolarizing, Voltage-gated K^+ in Adult Mouse Ventricles. *J Physiol (Lond)* **559**, 103-120.

Campbell DL, Rasmusson RL, Comer MB & Strauss HC (1995). The cardiac calcium-independent transient outward potassium current: kinetics, molecular properties, and role in ventricular repolarization. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, eds. Zipes DP & Jalife J, pp. 83-96. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.

Danik S, Cabo C, Chiello C, Kang S, Wit AL & Coromilas J (2002). Correlation of repolarization of ventricular monophasic action potential with ECG in the murine heart. *Am J Physiol* **283**, H372-H381.

DuBell WH, Lederer WJ & Rogers TB (2000). K^+ currents responsible for repolarization in mouse ventricle and their modulation by FK-506 and rapamycin. *Am J Physiol* **278**, H886-H897.

England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB & Tamkun MM (1995b). A novel K^+ channel β subunit (hKv β 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* **270**, 28531-28534.

England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB & Tamkun MM (1995a). Characterization of a voltage-gated K^+ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 6309-6313.

Fink M, Duprat F, Lesage F, Heurteaux C, Romey G, Barhanin J & Lazdunski M (1996). A new K^+ channel β subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem* **271**, 26341-26348.

Fiset C, Clark RB, Larsen TS & Giles WR (1997a). A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond)* **504**, 557-563.

Fiset C, Clark RB, Shimoni Y & Giles WR (1997b). *Shal*-type channels contribute to the Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current in rat ventricle. *J Physiol (Lond)* **500.1**, 51-64.

Guo W, Li H, London B & Nerbonne JM (2000). Functional consequences of elimination of $I_{to,f}$ and $I_{to,s}$. Early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking $Kv1.4$ and expressing a dominant-negative $Kv4 \alpha$ subunit. *Circ Res* **87**, 73-79.

Guo W, Xu H, London B & Nerbonne JM (1999). Molecular basis of transient outward K^+ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* **521**, 587-599.

Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C, Federoff HJ & Kass RS (1998). Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. *J Physiol (Lond)* **512**, 779-791.

Isenberg G & Klockner U (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflug Arch* **395**, 6-18.

Isom LL, De Jongh KS & Catterall WA (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* **12**, 1183-1194.

Jeron A, Mitchell GF, Zhou J, Murata M, London B, Buckett P, Wiviott SD & Koren G (2000). Inducible polymorphic ventricular tachyarrhythmias in a transgenic mouse model with a long QT phenotype. *Am J Physiol* **278**, H1891-H1898.

Josephson IR, Sanchez-Chapula J & Brown AM (1984). Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* **54**, 157-162.

Knollmann BC, Katchman AN & Franz MR (2001). Monophasic Action Potential Recordings from Intact Mouse Heart: Validation, Regional Heterogeneity, and Relation to Refractoriness. *J Cardiovasc Electrophysiol* **12**, 1286-1294.

Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BEC, Weissman NJ, Jones LR & Morad M (2000). Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol (Lond)* **525**, 483-498.

Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJC, Lin JLC, Hoshijima M, Nguyen-Tran VTB, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross Jr, Giles WR & Chien KR (2001). A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107**, 801-813.

Li M, Jan YN & Jan LY (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**, 1225-1230.

Lomax AE, Kondo CS & Giles WR (2003). Comparison of time- and voltage-dependent K^+ currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* **285**, H1837-H1848.

London B, Jeron A, Zhou J, Buckett P, Han X, Mitchell GF & Koren G (1998b). Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N-terminus

and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 2926-2931.

London B, Wang DW, Hill JA & Bennett PB (1998a). The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene *Kv1.4*. *J Physiol* **509**, 171-182.

London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ, Logothetis DA, Nerbonne JM & Hill JA (2001). Targeted replacement of *Kv1.5* in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* **88**, 940-946.

Majumder K, De BM, Wang Z & Wible BA (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Letters* **361**, 13-16.

Nerbonne JM (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol (Lond)* **525**, 285-298.

Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO & Pongs O (1994). Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **26**, 289-294.

Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE & Trimmer JS (1996). β -subunits promote K^+ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* **16**, 843-852.

Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A & Fiset C (2001). Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* **89**, 437-444.

Tseng GN, Jiang M & Yao JA (1996). Reverse use dependence of Kv4.2 blockade by 4-aminopyridine. *J Pharmacol Exp Ther* **279**, 865-876.

Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM & Snyders DJ (1996). Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *J Biol Chem* **271**, 2406-2412.

Uebele VN, England SK, Gallagher DJ, Snyders DJ, Bennett PB & Tamkun MM (1998). Distinct domains of the voltage-gated K⁺ channel Kv beta 1.3 beta-subunit affect voltage-dependent gating. *Am J Physiol* **274**, C1485-C1495.

Wang L & Duff HJ (1997). Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circ Res* **81**, 120-127.

Wettwer E, Amos GJ, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JC & Ravens U (1993). Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **27**, 1662-1669.

Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI & Backx PH (1999). Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K⁺ channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* **85**, 1067-1076.

Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W & Nerbonne JM (1999a). Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 α subunit. *Circ Res* **85**, 623-633.

Xu H, Guo W & Nerbonne JM (1999b). Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* **113**, 661-677.

Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL & Schwarz TL (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol (Lond)* **533**, 697-710.

Zhou J, Jeron A, London B, Han X & Koren G (1998). Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* **83**, 806-814.

Zhou J, Kodirov S, Murata M, Buckett PD, Nerbonne JM & Koren G (2003). Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, $I_{K,slow2}$, in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice. *Am J Physiol* **284**, H491-H500.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by operating and personnel grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec, the Fonds de Recherche en Santé du Québec and the Foundation of the Montreal Heart Institute. J.B. has a CIHR Studentship Award. W.G. was supported by a Research Chair from the Heart and Stroke Foundation of Alberta and the Northwest Territories. The authors wish to thank V. Trépanier-Boulay, M-A. Lupien, M. Marmabassi, K. Janzen and R. Winkfein for technical assistance.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1. Isolation of rapidly inactivating component of K^+ current, I_{to} .

A. Effect of an “inactivating prepulse” on outward K^+ current of a voltage-clamped adult mouse ventricular myocyte.

Upper records. The voltage-clamp protocol is shown at upper right: the duration of the inactivating prepulse (-40 mV) was varied between 0 and 300 ms (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 ms). Each prepulse was followed by a 500 ms step to +30 mV. Note the rapid decrease in the peak current which exhibits a fast phase of decay with progressively increasing prepulse durations.

Lower records. Same current records as above, on expanded time scale. Numbers next to selected current records indicate duration of prepulse. Note that fast phase of current decay was abolished by prepulses longer than about 60 ms; increasing prepulse duration further resulted in very little additional reduction in peak current.

B: “Fast” and “slow” phases of decaying of outward K^+ current can be separated using inactivating prepulse voltage-clamp protocol.

Upper records. Membrane current produced by 500 ms voltage-clamp step to +30 mV, from H.P. -80 mV.

Middle records. The same voltage clamp step as above was repeated, but in this case it was preceded by a 100 ms “inactivating” prepulse to -40 mV. Note that the initial rapid phase of current decay was abolished.

Lower records. Difference current obtained by subtracting record with the inactivating prepulse voltage-clamp protocol from that without the prepulse.

C. Time course of inactivation of I_{to} , for prepulse of -40 mV at room temperature.

The voltage protocol illustrated in A was repeated in the presence of 100 μ M of 4-aminopyridine (4-AP).

D. Plot of the ratio of the “difference current” at prepulse duration $t=n$ (P_n) and $t=0$ (P_0 , P_n/P_0) against prepulse duration. Data points denote mean \pm SEM. Smooth curve is the best-fit single exponential function. Note that the data presented in Figures 1-3 were obtained at room temperature.

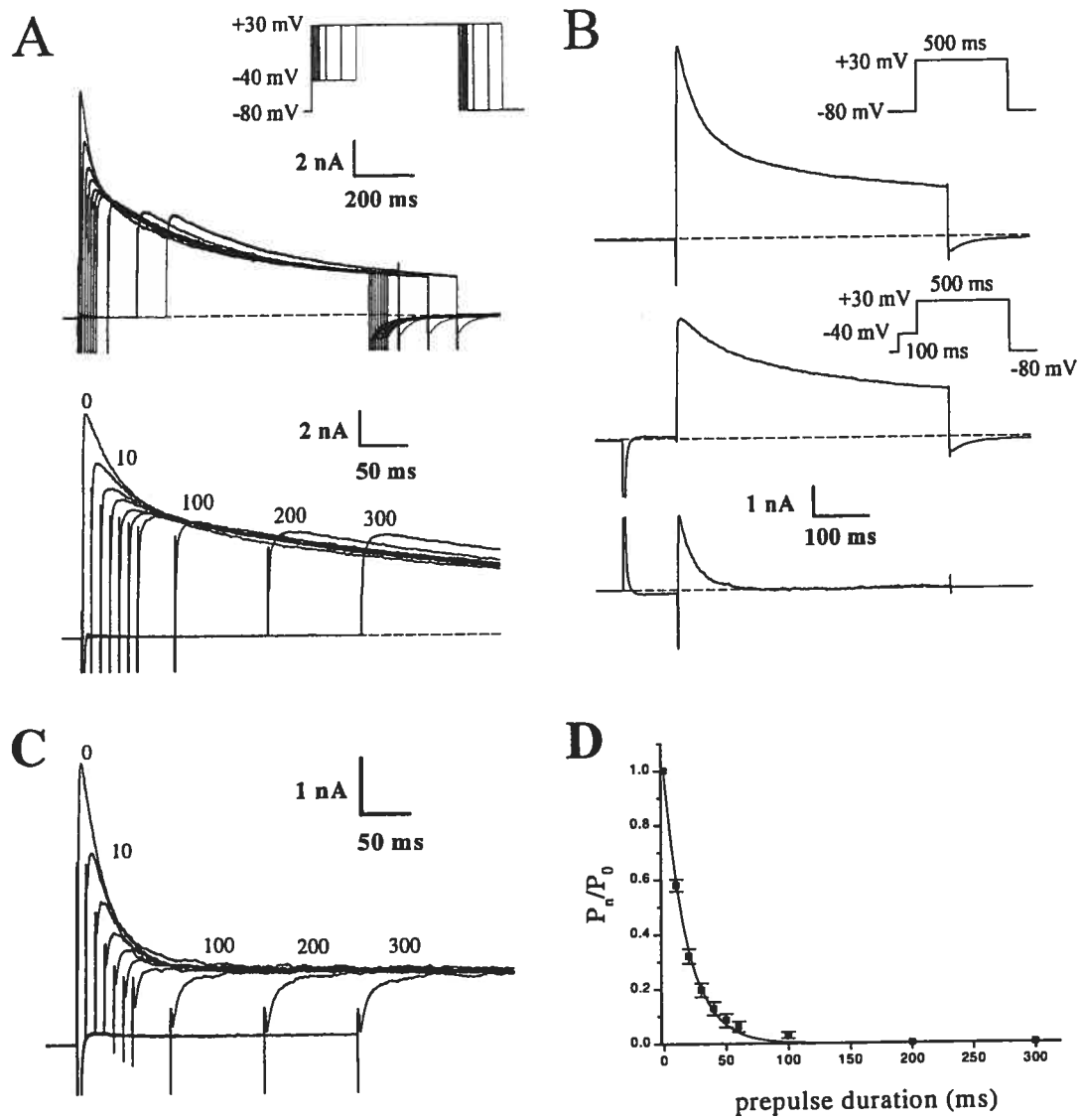


Fig.1

Figure 2. Low concentration of 4-aminopyridine (4-AP) selectively blocks the rapidly activating, slowly inactivating outward current, I_{Kur} .

Left column in A: Superimposed pairs of current records, before (“control”) and after application of 100 μ M 4-AP (“+4-AP”). The upper pair of currents was produced by a 500 ms step to +10 mV (H.P.: -80 mV). The lower pair of records was produced by an identical step which was preceded by an inactivating prepulse (100 ms, -40 mV).

Right column in A: 4-AP-sensitive “difference” currents, obtained by subtraction (control - 4-AP), for each pair of records at left. Note that the difference current was the same whether or not the depolarizing step was preceded by the inactivating prepulse.

Left column in B: The current records in A were rearranged, so that both control records are superimposed, and both “+4-AP” records are superimposed.

Right column in B: Potential-sensitive “difference” currents, obtained by subtraction of currents obtained with and without the inactivating prepulse. Note that the difference current, I_{to} , was very similar in the presence and in the absence of 4-AP.

C. Bars graph comparing I_{Kur} and I_{to} amplitude recorded at +10 mV with and without prepulse or 4-AP, respectively (n=6). I_{Kur} and I_{to} recorded in absence of prepulse or 4-AP were set to 100%. Comparable results were also obtained for test pulses of +30 mV (data not shown).

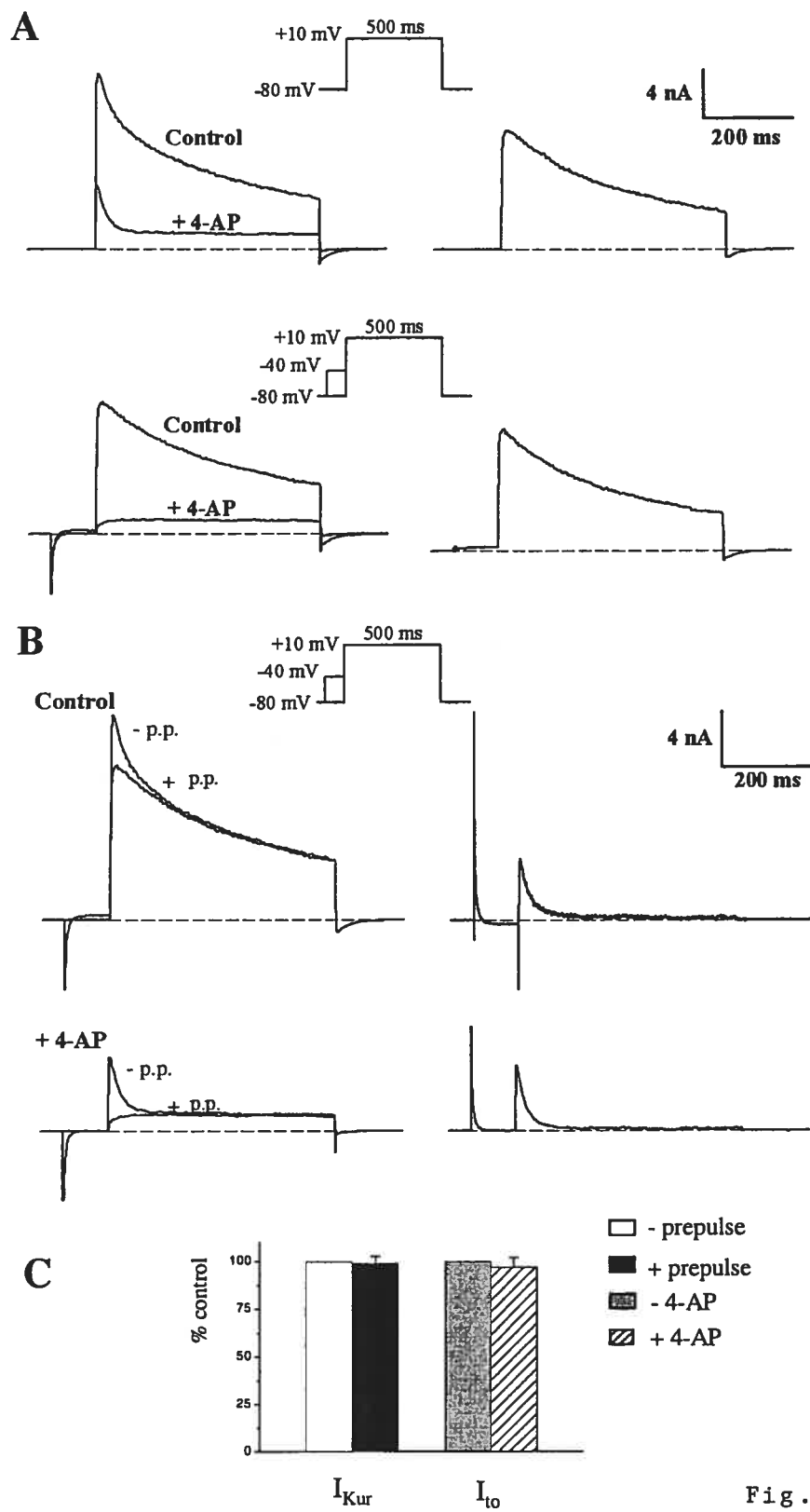


Fig. 2

Figure 3. Inactivation of I_{Kur} reveals a third component of outward current, I_{ss} .

Left column: Membrane currents produced by a double-pulse voltage-clamp protocol (inset), consisting of a 5 sec, +30 mV step, and a 0.75 sec, +10 mV step. The depolarizing steps were separated by a 100 ms “gap” at -40 mV. The “difference” current (I_{Kur}) was obtained by subtracting the “control” current, and the current after application of 100 μ M 4-AP (“+4-AP”). Note that I_{Kur} was completely inactivated by the end of the 5 sec step. The time and current calibrations are identical for all three current traces.

Right column: The membrane currents produced by the step to +10 mV are shown on expanded time and current scales (see vertical arrows at left). The dashed lines indicate zero current. This current was slowly activating, and was showed no significant inactivation during the 0.75 sec step. Note that the currents are identical in the presence and absence of 100 μ M 4-AP.

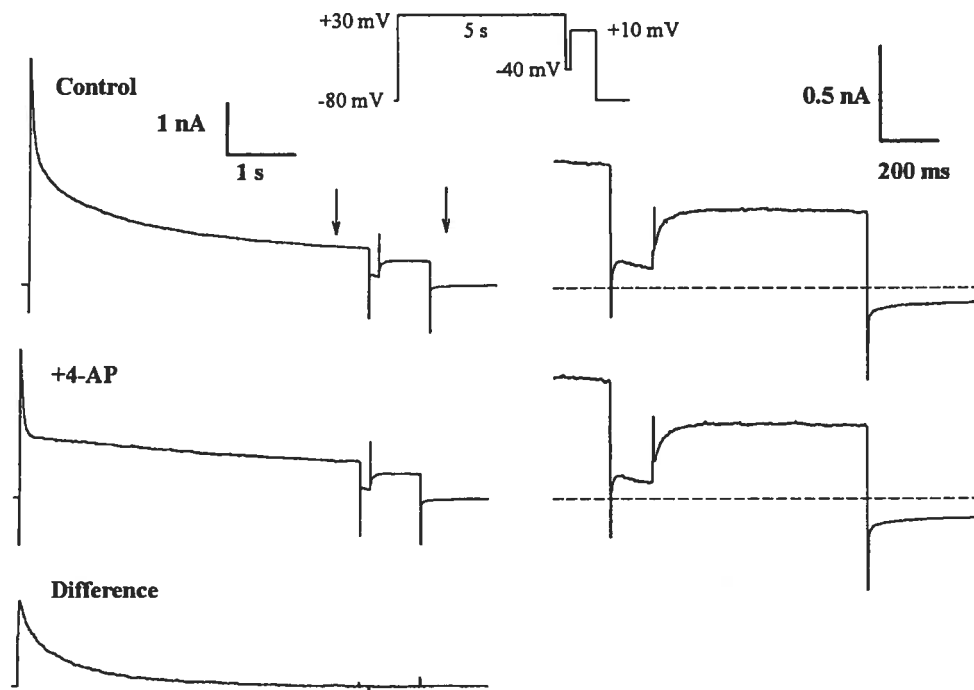


Fig. 3

Figure 4. Time course of inactivation of I_{to} , for prepulse of -40 mV at 32°C.

A. Current traces obtained with a 500 ms step to +30 mV preceded by a -40 mV inactivating prepulse of various duration (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ms) are shown. Currents were recorded in presence of 100 μ M 4-AP. **B.** Plot of the ratio of the “difference currents” against prepulse duration. The current following the 50 ms prepulse was subtracted from each current to obtain a “difference current” (P_n) at every prepulse duration. These difference currents were then normalized to the difference current obtained without prepulse (P_0 , P_n/P_0). Smooth curve is the best-fit single exponential function. **C.** Bars graph comparing I_{Kur} and I_{to} amplitude recorded at +10 mV with and without prepulse or 4-AP, respectively ($n=5$, differences not significant). I_{Kur} and I_{to} recorded in absence of prepulse or 4-AP were set to 100%. Comparable results were also obtained for test pulses of +30 mV (data not shown).

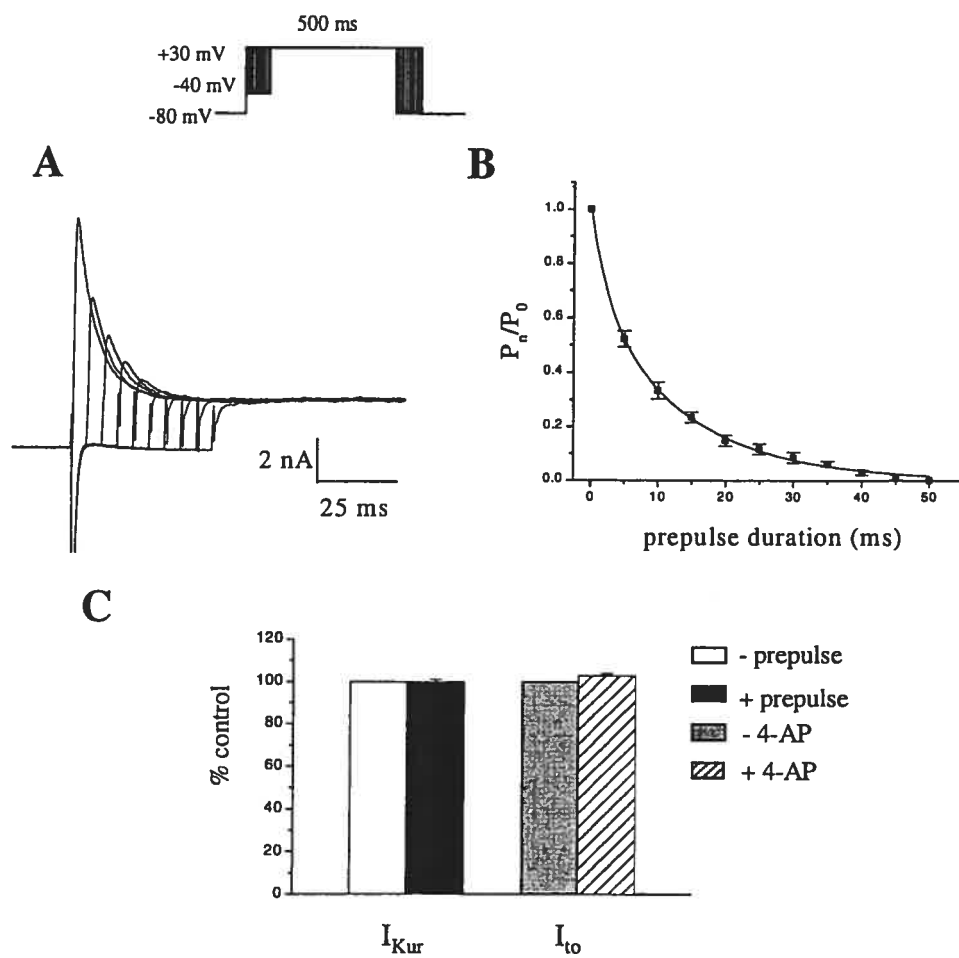


Fig. 4

Figure 5. Comparison of magnitude and kinetics of I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} in adult mouse ventricular myocytes recorded at 22°C and 32°C.

Upper records in A: Superimposed potential-sensitive (I_{to}), 4-AP-sensitive (I_{Kur}) and 4-AP-insensitive (I_{ss}) current components, separated using 100 μ M 4-AP and inactivating prepulse voltage-clamp protocols, as described in Figures 1 and 2. The voltage-clamp step was +30 mV, for 3 sec (upper right). Note the very large difference in rate of inactivation of these three currents.

Lower records in A: The same set of records is shown on a much faster time scale. Note that I_{to} and I_{Kur} activate very quickly compared with I_{ss} .

B. Repetition of the protocol shown in A with the exception that the currents were recorded at 32°C. Note the expanded time scale.

C. Bar graph represents mean (\pm SEM) peak current density of each of the three components of outward K^+ current recorded at 22°C or 32°C, measured at a test potential of +30 mV from a H.P. of -80 mV. The data obtained at 22°C and 32°C were averaged from 12 and 10 different ventricular myocytes, respectively. * $p < 0.05$

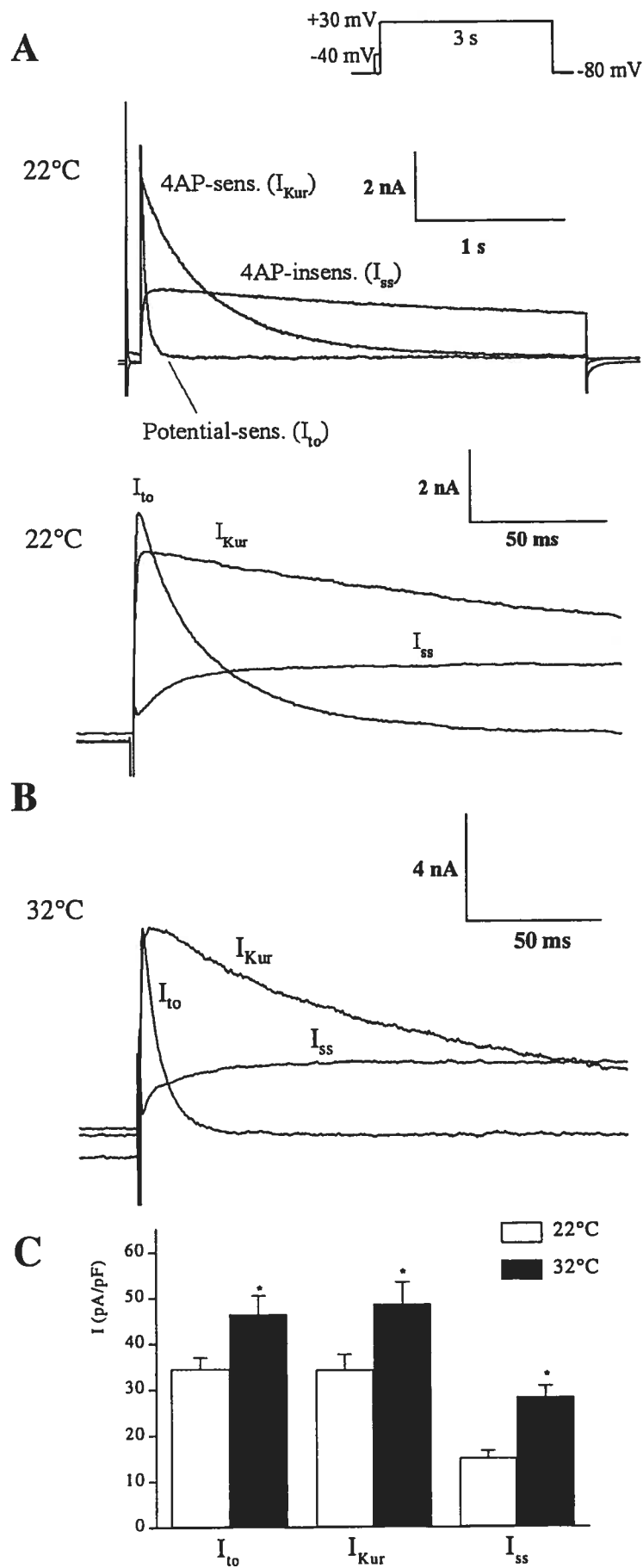


Fig. 5

Figure 6. Comparison of activation kinetics of I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} in adult mouse ventricular myocytes at room temperature (22°C).

Bar graph showing mean (\pm SEM) activation time constants for I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} recorded at two different voltages, +10 and +30 mV, from 12 ventricular myocytes at room temperature. Each current exhibited distinct activation kinetics.

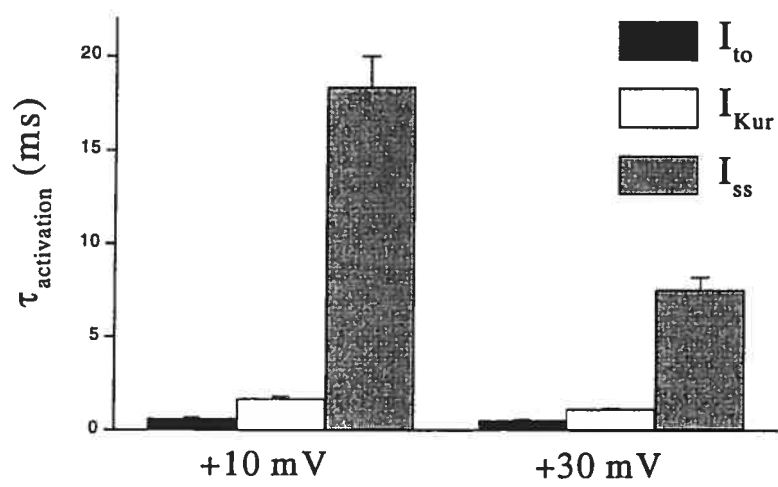


Fig. 6

Figure 7. Role of I_{Kur} in repolarization of adult mouse ventricular action potential.

A. Comparison of action potentials recorded at room temperature before (“control”) and after application of 100 μ M of 4-AP (“+4-AP”) in the same myocyte. Stimulation frequency was 1 Hz. Voltage-clamp step to +40 mV is also shown. Dashed line indicates zero membrane potential. **B.** First derivative (dV/dt) of action potentials before and after 100 μ M AP. **C.** Membrane currents produced by a depolarizing step to +40 mV from a H.P. of -80 mV in same myocyte, before and after application of 100 μ M of 4-AP. I_{Kur} (“4-AP-sensitive” current) was obtained by subtraction. The voltage-clamp step (and hence the current) was aligned to coincide with the end of the waveform stimulus current. Dashed line indicates zero current. **D.** Comparison of action potentials recorded at 32°C before (“control”) and after application of 100 μ M 4-AP (“+4-AP”) in the same myocyte. Stimulation frequency was 1 Hz. **E.** Bar graph showing mean (\pm SEM) durations of action potentials recorded without and with 4-AP at 22°C (open and black bars, $n=10$ for both groups) and at 32°C (grey and hatched bars, $n=9$ and 5, respectively). * $p<0.05$ vs. 22°C without 4-AP group.

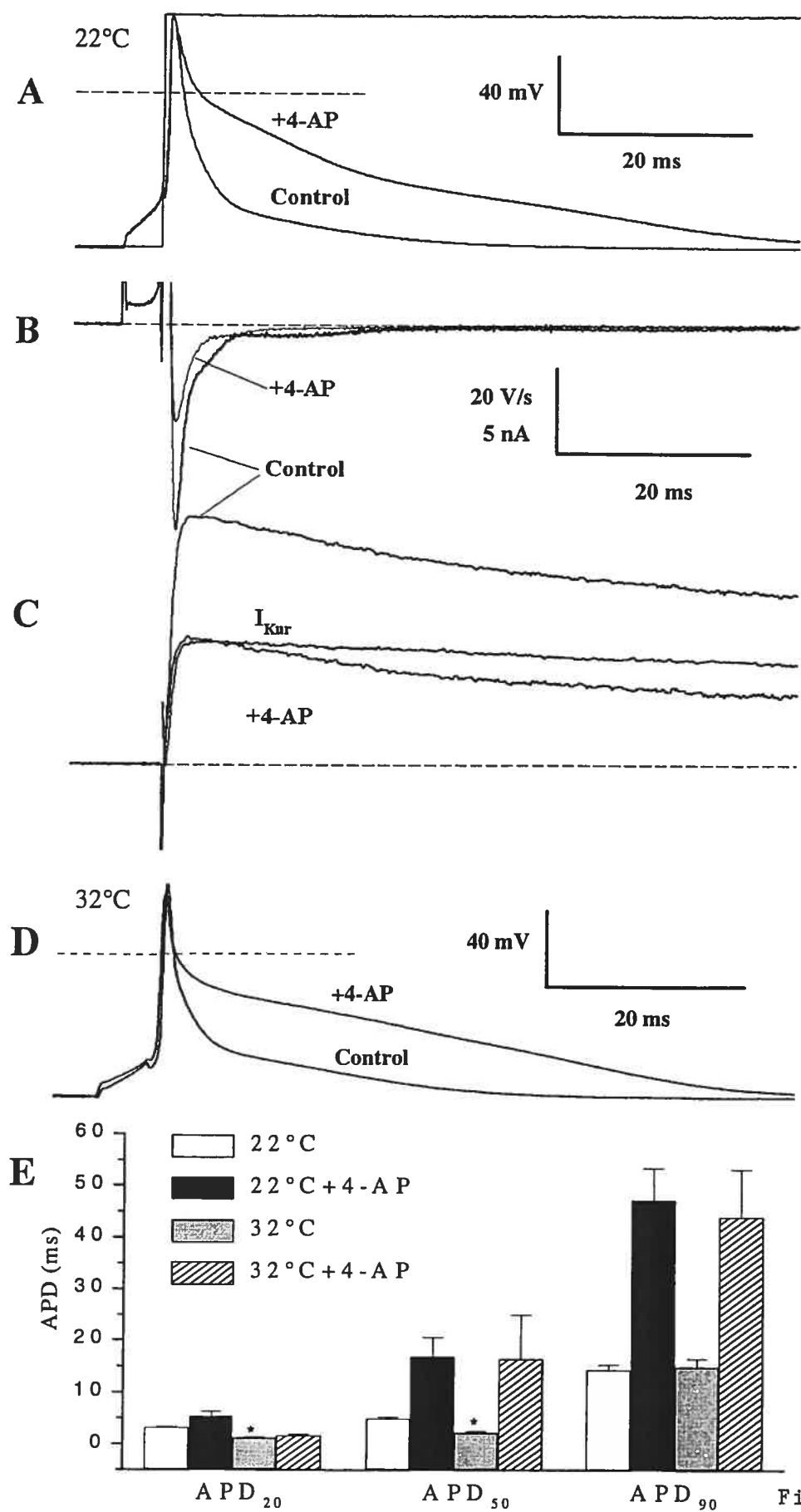


Fig. 7

Figure 8. Voltage-dependence of steady-state inactivation of I_{to} at room temperature (22°C).

A. Example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. The 100 ms inactivating prepulse potential was varied from -110 to -20 mV; the test pulse potential was +30 mV (protocol shown at top). Numbers next to current records indicate corresponding potential of inactivating pulse. *Inset in A* shows *difference currents: subtraction of the test pulse current following each prepulse from that obtained with the -40 mV prepulse.

B. Example of currents produced by the protocol used in A after superfusion of the same cell with 100 μ M of 4-AP which eliminated I_{Kur} without affecting I_{to} . *Inset in B* shows *difference currents: subtraction of the test pulse current following each prepulse with that obtained with the -40 mV prepulse.

C. Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} under control conditions (\bullet) and in presence of 4-AP (\circ). The amplitude of I_{to} for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current with that obtained with the -40 mV prepulse. The I_{to} test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential. Data points are mean \pm S.E.M (control, n=6; +4-AP, n=4). The smooth curves are the best-fit Boltzmann function (see Methods).

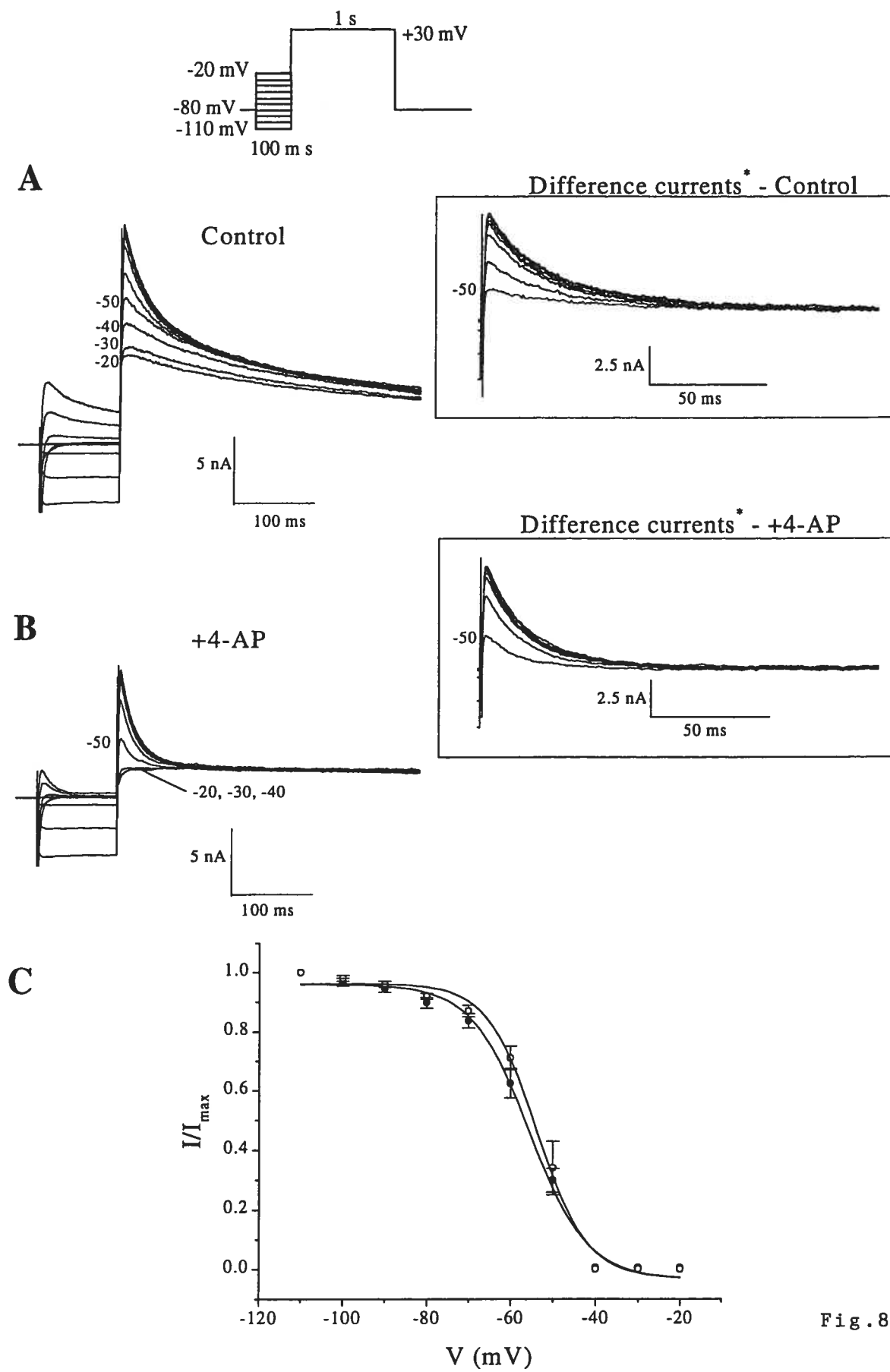


Fig. 8

Figure 9. Voltage-dependence of steady-state inactivation of I_{to} at 32°C.

A. Example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. A 50 ms inactivating prepulse potential was varied from -110 to -20 mV; the test pulse potential was +30 mV (protocol shown at top). Numbers next to current records indicate corresponding potential of inactivating pulse. *Inset in A* shows *difference currents: subtraction of the test pulse current following each prepulse from that obtained with the -40 mV prepulse.

B. Example of currents produced by the protocol used in A after superfusion of the same cell with 100 μ M of 4-AP which eliminated I_{Kur} without affecting I_{to} . *Inset in B* shows *difference currents: subtraction of the test pulse current following each prepulse from that obtained with the -40 mV prepulse.

C. Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} under control conditions (\bullet) and in presence of 4-AP (\circ). The amplitude of I_{to} for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current from that obtained with the -40 mV prepulse. The I_{to} test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential. Data points are mean \pm S.E.M (control, n=6; +4-AP, n=6). The smooth curves are the best-fit Boltzmann function (see Methods).

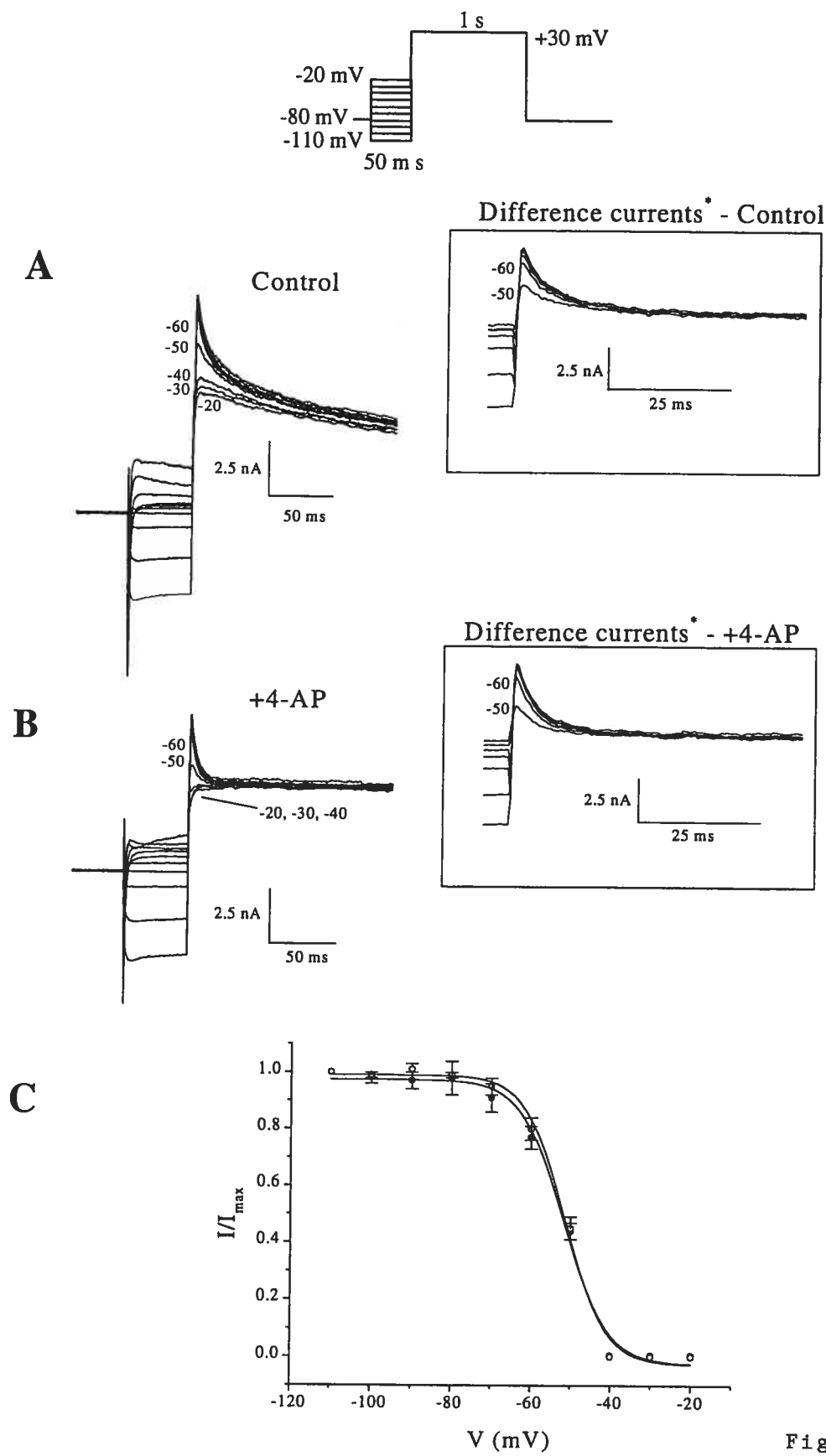


Fig. 9

Figure 10. Time-course of recovery of I_{to} from inactivation at room temperature (22°C).

A. Example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time-course of recovery of I_{to} from inactivation. A 500 ms inactivating pulse (+30 mV) was followed at intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400, and 600 ms by an identical test pulse; numbers next to selected records indicate interpulse interval (ms).

B. Membrane potential dependence of recovery from inactivation of I_{to} . Data (mean \pm S.E.M.) were pooled from 7 different cells. P_2/P_1 is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes. I_{to} amplitude was measured as the difference between peak outward current and current 150 ms after the peak. Recovery was measured at interpulse potentials of -60 mV (\square), -70 mV (\blacksquare) and -80 mV (\circ). The smooth lines are best-fit single exponential functions with time constants of 35 ± 2 ms for -80 mV, 55 ± 3 ms for -70 mV and 118 ± 9 ms for -60 mV.

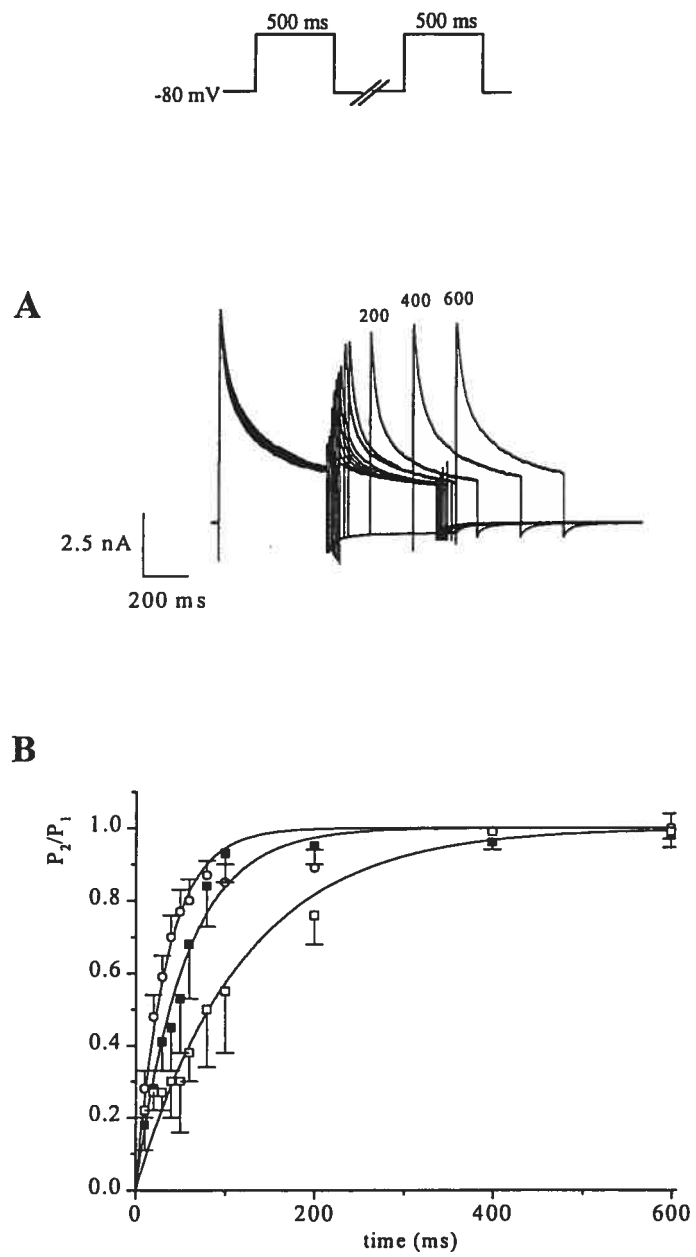


Fig. 10

Figure 11. Inactivation of I_{Kur} at room temperature (22°C)

A and B. Membrane potential dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . **A.** Example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. Inactivating pulse (5 sec duration) was varied from -110 to -20 mV; the test pulse potential was +30 mV. Numbers next to current records indicate membrane potential for the corresponding inactivating pulse. Traces obtained with inactivation pulse ranging from -80 mV to -20 mV are shown. **B.** Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . The I_{Kur} test pulse amplitude was normalized to the test amplitude for the most negative prepulse potential. I_{Kur} was obtained by subtraction of the current at the end of the test pulse from the peak test pulse current. Data were pooled from 7 different myocytes. Data points are mean \pm S.E.M. The smooth curve is the best-fit Boltzmann function (see Methods).

C and D. Time-course of recovery of I_{Kur} from inactivation. **C.** Example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time-course of recovery from inactivation of I_{Kur} . A 1.5 sec inactivating pulse was followed at intervals between 50 ms and 3 sec by a 500 ms test pulse. Both inactivating and test pulses were preceded by a brief (100 ms at -40 mV) pulses to inactivate I_{to} . The holding and interpulse potentials were -80 mV. Numbers next to selected records indicate interpulse interval, in seconds. **D.** Membrane potential dependence of recovery from inactivation of I_{Kur} . Data (mean \pm S.E.M.) were pooled from 7 different cells. P_2/P_1 is the ratio of test pulse current/inactivating pulse current amplitudes. I_{Kur} amplitude was measured by the difference between peak inactivating or test pulse current and the current at the end of the inactivating pulse. Recovery was measured at interpulse potentials of -60 mV (\square), -70 mV (\blacksquare) and -80 mV (\circ). The smooth lines are best-fit single exponential functions with time constants of 0.74 ± 0.04 sec for -80 mV, 1.51 ± 0.06 sec for -70 mV and 2.74 ± 0.13 sec for -60 mV.

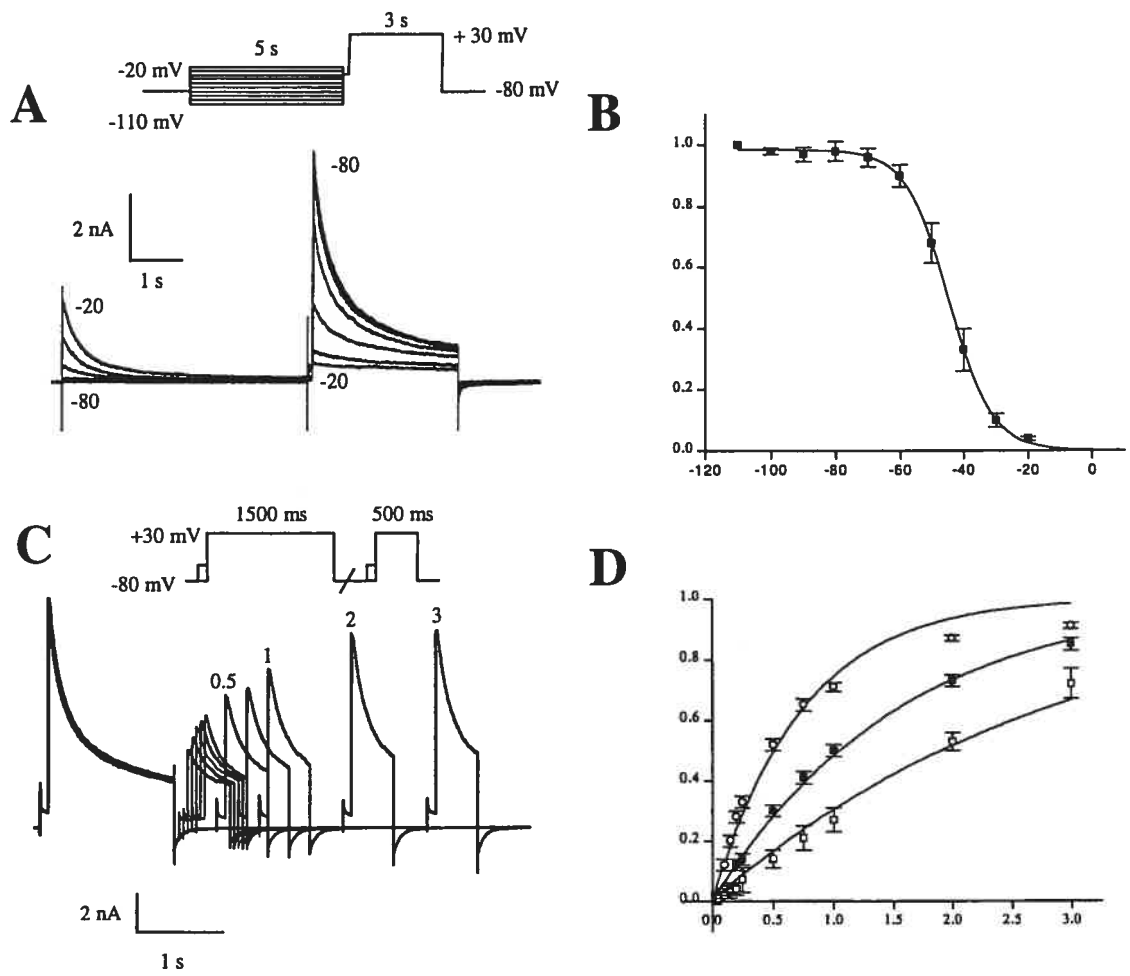


Fig. 11

Figure 12. Comparison of the K^+ currents in adult mouse ventricular (A) and atrial (B) myocytes at room temperature.

Upper records: Current traces produced by 500 ms steps to +30 mV (H.P.: -80 mV).

Middle records. Current traces produced by a 500 ms step to +30 mV preceded by an inactivating prepulse (100 ms, -40 mV). The potential-sensitive “difference” currents,

(I_{to}) obtained by digital subtraction of currents recorded with and without inactivating prepulse, are shown in inset. *Lower records.* Current records obtained in the presence

of both the inactivating prepulse and 4-AP. The 4-AP-sensitive “difference” currents, obtained by digital subtraction, are shown in inset. C. Bar graph comparing the

current density of I_{to} , I_{Kur} and I_{ss} in adult mouse ventricular and atrial myocytes. The test potential was +30 mV from an H.P. of -80 mV. Data (mean \pm SEM) was averaged from 12 different ventricular and 15 atrial myocytes.

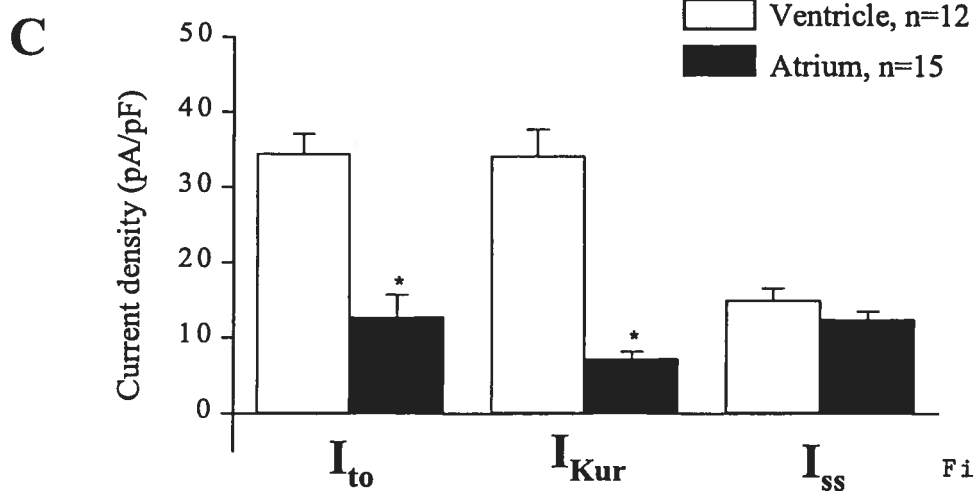
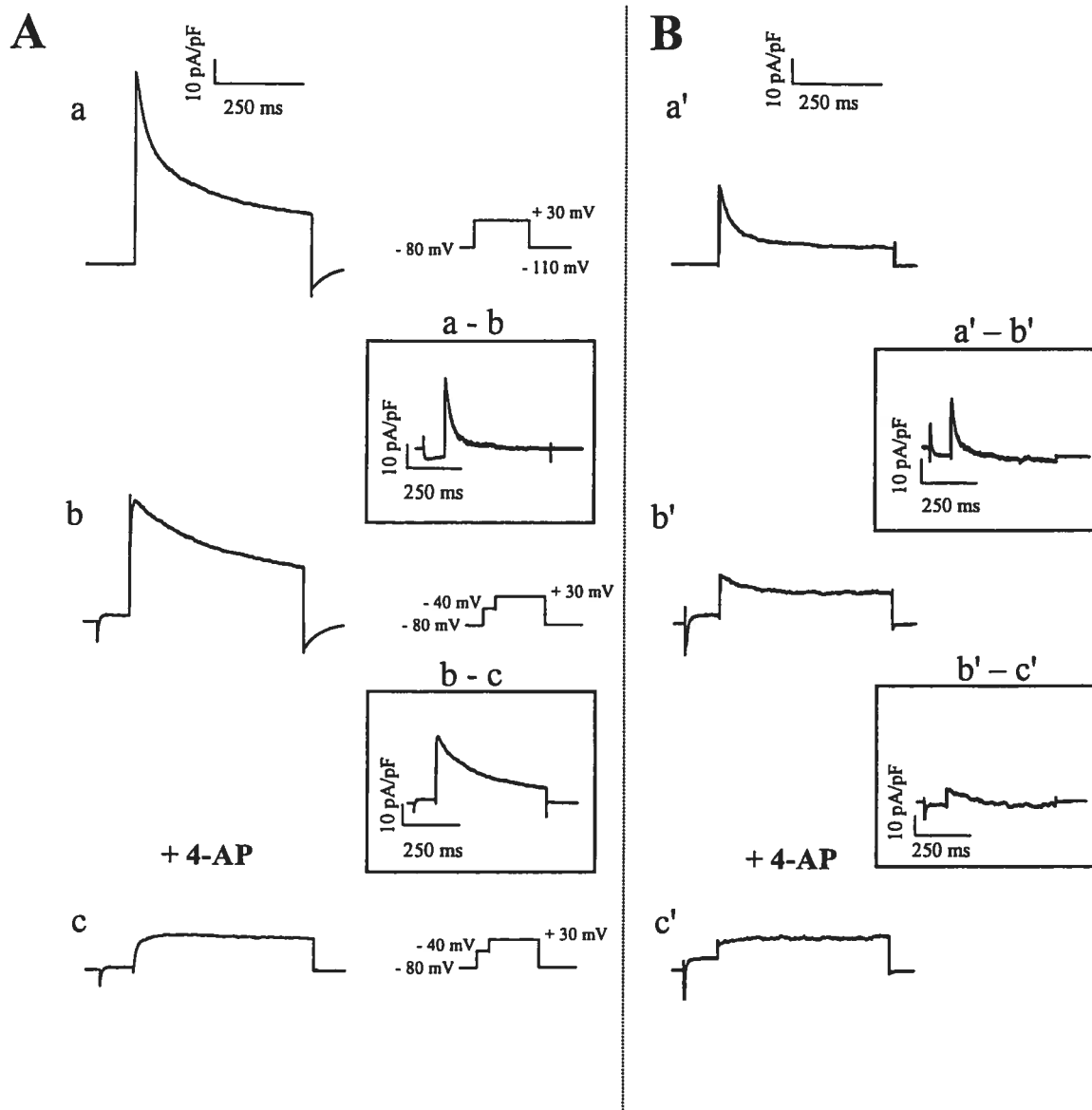


Fig. 12

Figure 13. Comparison of K⁺ channel mRNA expression between adult mouse ventricle and atrium.

RNase protection assays depicting K⁺ channel expression to compare adult mouse atrium and ventricle. Panels show autoradiographs of polyacrylamide gels. Radioactively-labelled antisense riboprobes specific for mouse K⁺ channel isoforms were hybridized with total RNA (2.5 μg) from atrium or ventricle and digested with RNaseA/T1. Reaction mixtures were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography. See Methods section for details. **A.** Comparison of Kvl.5 RNA expression in atrium and ventricle. Lane P shows undigested riboprobes for Kvl.5 and for β-actin (which was used as the internal control). Lane C is yeast RNA, which is the negative control. Post-digest (protected fragments) for Kvl.5 and β-actin were run simultaneously in three lanes each for atrial and ventricular RNA samples. Note that the β-actin signal was very similar in all six lanes. **B.** Comparison of Kv4.2 and Kv4.3 RNA expression levels in atrium and ventricle. **C.** Comparison of Kv2.1 RNA expression levels in atrium and ventricle.

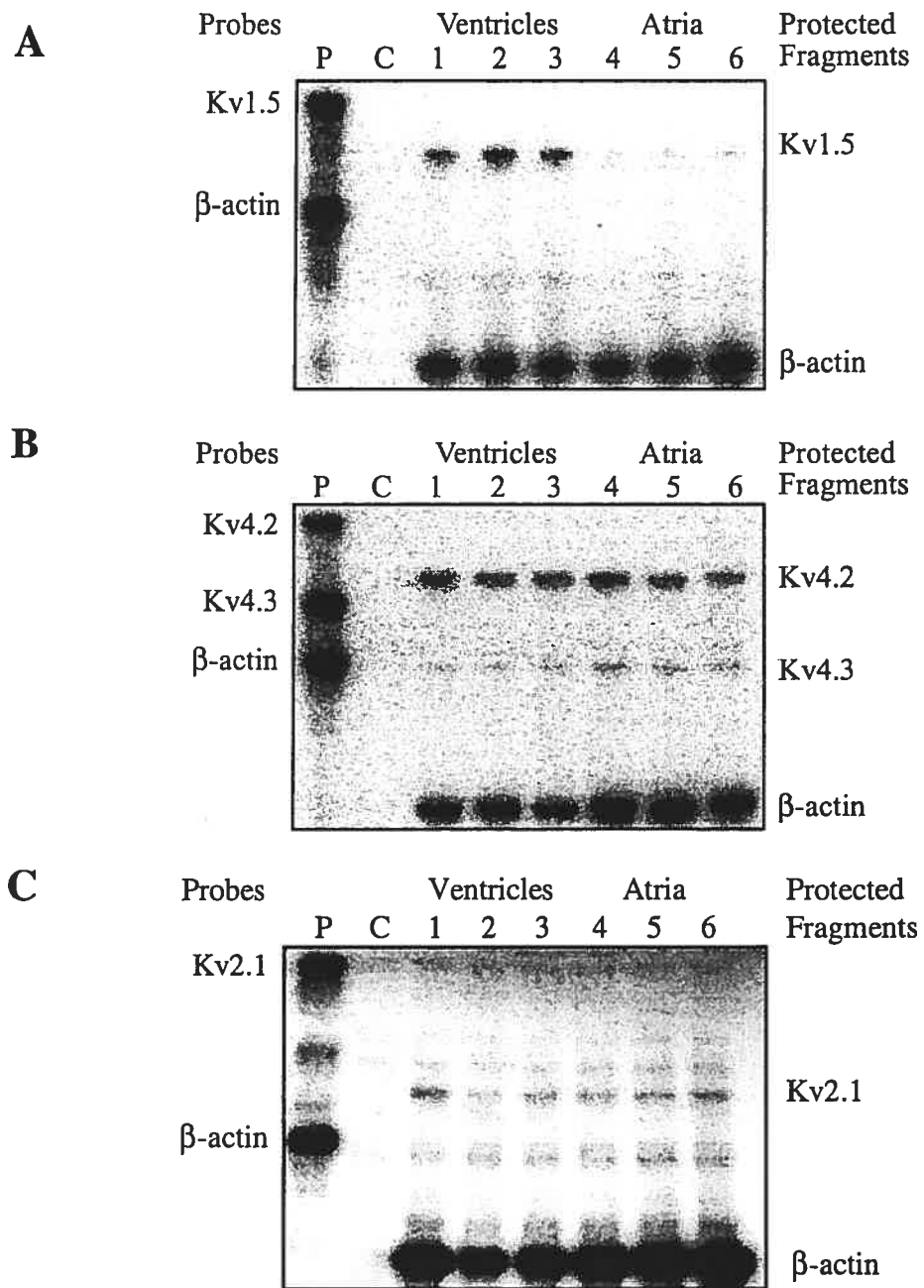


Fig. 13

CHAPITRE 3 Effet de la castration sur la repolarisation cardiaque de la souris

Tel que mentionné dans l'introduction, les résultats de plusieurs études suggèrent que les androgènes régulent la repolarisation et qu'ils pourraient être impliqués dans la différence reliée au sexe dans la repolarisation cardiaque.^{50-52,54,56,57,119,125} Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié les conséquences d'une déficience en androgènes. L'article suivant traite de l'effet de la castration sur la repolarisation cardiaque de souris.

Journal of Physiology 546.2 (2003) 403-413

EFFECT OF ANDROGEN DEFICIENCY ON MOUSE VENTRICULAR REPOLARIZATION

Judith Brouillette, B.Sc.,^{1,2} Véronique Trépanier-Boulay, M.Sc.^{1,2} and Céline Fiset,
Ph.D.^{1,2}

¹Research Center, Montreal Heart Institute

²Faculty of Pharmacy, University of Montreal
Montréal, Québec, Canada

Running Title: Effect of castration on cardiac repolarization

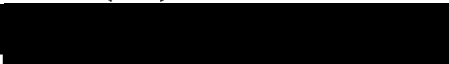
Corresponding author: Dr. Céline Fiset

Research Center, Montreal Heart Institute

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

Phone : (514) 376-3330 (ext. 3025)

FAX : (514) 376-1355



SUMMARY

We previously demonstrated that female mouse ventricles have longer action potential durations (APD) than males. This delayed repolarization results from a lower current density of the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and a lower expression level of its underlying K^+ channel (Kv1.5). To evaluate whether this sex difference could be attributable to the action of male sex hormones, we studied the effect of androgen deficiency on ventricular repolarization. We compared cardiac electrophysiological properties in castrated (orchiectomized: ORC) and control (CTL) male mice. QTc intervals as well as APD measured at 20%, 50%, and 90% of repolarization were all significantly longer in ORC than in CTL. The current density of I_{Kur} was significantly lower in ORC than in CTL (at +50 mV, ORC: 29 ± 4 pA pF⁻¹, n=25; CTL: 48 ± 5 pA pF⁻¹, n=17; p=0.006). In contrast, all the other K^+ currents present in mouse ventricular myocytes were comparable between ORC and CTL. Moreover, results of Western Blot analysis showed a lower expression level of Kv1.5 protein in ORC but no difference between the two groups for the other K^+ channels studied. This study demonstrates that androgen deficiency leads to a reduction in the density of I_{Kur} and Kv1.5 in mouse ventricle, and consequently, to prolongation of APD and QTc interval. In conclusion, these findings strongly suggest that male sex hormones contribute to the sex difference that we previously reported in cardiac repolarization in adult mouse heart.

Key Words: K^+ currents; Heart; Hormones.

INTRODUCTION

Recently, we have shown that there is sex difference in ventricular repolarization in mouse heart (Trépanier-Boulay *et al.* 2001). We demonstrated that repolarization was longer in females than in their male counterparts. Indeed, action potential durations (APD) were significantly longer in myocytes isolated from female ventricle. We then showed that this prolonged repolarization was due to the lower expression of a major repolarizing K^+ current, the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}), and of its underlying K^+ channel (Kv1.5) in females. In the present study, we investigated one possible mechanism underlying this sex difference.

It is now well recognized that cardiac repolarization is different between men and women (Bazett, 1920; Rautaharju *et al.* 1992; Lehmann *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997). As in mice, women have prolonged ventricular repolarization, reflected by longer rate corrected QT interval (QTc), when compared with men (Rautaharju *et al.* 1992; Lehmann *et al.* 1997; Locati *et al.* 1998; Bidoggia *et al.* 2000). This sex difference is not observed at birth (Stramba-Badiale *et al.* 1995) nor during childhood where both girls and boys have long QTc intervals. It is at puberty that the difference appears when boys' QTc interval shortens (Rautaharju *et al.* 1992; Lehmann *et al.* 1997; Locati *et al.* 1998). Since at puberty, young men have an important increase in male sex hormones, androgens might be responsible for this QT shortening. Recently, (Bidoggia *et al.* 2000) observed that castrated men, which have low levels of androgens, had longer QT interval than intact men while virilized women, who have abnormally high level of male sex hormones, had shorter QT interval than control women. The same group also reported that testosterone shortened QT interval in castrated men. Moreover, it has been reported that athletes who take large doses of anabolic androgenic steroids have shorter QT intervals (Stolt *et al.* 1999). Altogether, these studies strongly suggest that androgens may affect repolarization.

Therefore, we carried out the present study to determine whether androgens are involved in the sex difference that we observed in repolarization in mouse heart. The findings presented here clearly show that androgen deficiency induced by castration leads to lengthening of ventricular repolarization in male mouse heart strongly suggesting a role for male sex hormones in the regulation of cardiac K^+ channels.

METHODS

Animals. All experiments were performed on 4 to 5 month old CD1 male mice weighing about 30 g. Castrated (orchiectomized: ORC) and control (CTL) male mice were obtained from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). Male mice were castrated at 37 days of age, i.e just before reaching sexual maturity. ORC mice were always compared with aged-matched CTL males. Sham-operated mice also obtained from Charles River were used for some experiments (see below).

Radioimmunoassay. 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) was measured by radioimmunoassay according to the manufacturer's instructions (Diagnostic Systems Laboratories Inc. Texas, USA).

Mouse ventricular myocytes. All experiments conformed with the Canadian Council Animal Care guidelines. Animals were heparinized (100 U, I.P.), anaesthetized by inhalation of isoflurane and then killed by cervical dislocation. Single epicardial myocytes were obtained from the right ventricle of CTL and ORC mice using a previously described cell isolation protocol (Trépanier-Boulay *et al.* 2001). Briefly, the hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused through the aorta on a modified Langendorff apparatus with the following solutions: (i) 5 minutes with HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 0.3 Na₂HPO₄; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH), (ii) 10 min with Tyrode solution without added Ca²⁺ ("Ca²⁺-free"), (iii) 20 min with Ca²⁺-free Tyrode solution containing 73.7 U ml⁻¹ collagenase type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA), 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA), 20 mM taurine and 30 μ M CaCl₂, and (iv) 5 min with a Kraft-Brühe (KB) solution (Isenberg & Klockner 1982) containing (in mM): 100 K-glutamate; 10 K-aspartate; 25 KCl; 10 KH₂PO₄; 2 MgSO₄; 20 taurine; 5 creatine base; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 20 glucose and 0.1% BSA (pH adjusted to 7.2 with KOH).

ECG recordings. Mice were anaesthetized with pentobarbital (65 mg Kg⁻¹, I.P.) (Nuyens *et al.* 2002). Platinum electrodes were placed s.c. and lead I surface ECG were acquired using the Biopac System MP100 at a rate of 2 kHz. Recordings were analyzed using AcqKnowledge 3.7 program (Biopac System Inc., Santa Barbara, CA, USA). Mice body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. The QT intervals were calculated manually, using a blind-trial procedure, from signal-averaged ECG recordings. The QTc interval was calculated using the formula reported by (Mitchell *et al.* 1998), $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$.

Electrophysiological recordings. The myocytes were superfused with HEPES-buffered Tyrode solution (see above section Mouse ventricular myocytes). Whole-cell voltage and current recordings were made with a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, USA). Pipettes were made from borosilicate glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL., USA), and had resistances in the range 1.5-4 MΩ when filled with the following solution (mM): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂ATP and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). Series resistance (Rs) was between 4 and 8 MΩ; and compensation was applied to reduce Rs by 80-90%. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1 kHz with a 4-pole Bessel analog filter, digitized at 4-10 kHz and stored in a microcomputer using pClamp 8.0 software (Axon Instruments). All experiments were carried out at room temperature (20-22 °C). K⁺ currents were recorded in absence of sodium or L-type Ca²⁺ channels blockers to allow recordings of K⁺ currents and action potentials from the same myocyte. Furthermore, under these recording conditions (e.g. room temperature), I_{Ca} is small. Also, the very fast activation and inactivation of the fast sodium current (which represents the largest part of the I_{Na}) (Ju *et al.* 1996; Nuyens *et al.* 2002) prevent interference with K⁺ currents.

K⁺ currents recordings. Current-voltage (I-V) relationship for the total K⁺ current (I_{peak}), for the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current (I_{to}), for I_{Kur} , for the steady-state outward K⁺ current (I_{ss}) and for the inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) were constructed from the current elicited by a 500 ms voltage-clamp step applied in 10 mV increment from -110 to +50 mV from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz. The method of separation of the K⁺ currents is described in the Results section.

Steady-state inactivation. The voltage dependence of steady-state inactivation for I_{Kur} was measured using a two-step voltage-clamp protocol consisting of a first 5 s inactivating pulse to selected potentials (between -110 and -20 mV), followed by a second (test) pulse of 2.5 s duration to +30 mV, at a repetition rate of 30 s. In addition, a 100 ms pulse at -40 mV was interposed between the inactivating and test pulses in order to inactivate I_{to} . I_{Kur} was obtained by subtraction of the peak test pulse current from the current at the end of the test pulse. The current amplitude of I_{Kur} at each first pulse potential was normalized to the maximal amplitude of this current (I/I_{max}), and plotted as a function of the inactivating pre-pulse potential. Data were fit to a Boltzmann equation: $I/I_{\text{max}} = 1/[1 + \exp((V_m - V_{1/2})/S_{1/2})]$, where $V_{1/2}$ represents the membrane potential (V_m) at which 50% of the channels are inactivated and $S_{1/2}$ is the mid-point slope factor.

Recovery from inactivation. To measure the time and voltage dependence of recovery from inactivation of I_{Kur} , a 1.5 s inactivating pulse was followed at intervals between 50 ms and 3 s by a 500 ms test pulse, at a rate of 0.1 Hz. Inactivating and test pulses were both preceded by a brief (100 ms at -40 mV) pulse to inactivate I_{to} . The holding and interpulse potentials were -80 mV. I_{Kur} amplitude was measured by the difference between peak outward current and the current 500 ms after the peak. The ratio of current amplitude elicited by the second (test) to the first (inactivating) pulse was plotted as a function of the interpulse interval.

Western blots. Proteins were prepared from mouse hearts (3 pooled ventricles) homogenized in TE buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitors (Leupeptin, Aprotinin, Benzamidine, PMSF and Na_3VO_4). The homogenate was centrifuged at 10 000 g. The supernatant was ultracentrifuged 3 times at 200 000 g for 20 min. The pellet was resuspended in TE buffer containing the protease inhibitors and 0.6 M KCl to dissolve contractile proteins. The pellet corresponds to the sarcolemmal-enriched proteins. The Western blot protocols used for analysis of K^+ channel protein expression have been reported previously (Trépanier-Boulay *et al.* 2001).

Confocal imaging. Immunofluorescence analysis and confocal microscopy were carried out on ventricular myocytes isolated from CTL and ORC mice using protocols described previously (Trépanier-Boulay *et al.* 2001).

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm S.E.M. Student's unpaired t-test was used to compare mean data. The results were considered statistically significant when P values were smaller than 0.05.

RESULTS

Hormone levels. Serum DHT levels were dramatically decreased in ORC compared with CTL male mice ([DHT], ORC: not detectable, n=5; CTL: 987 ± 246 pg ml⁻¹, n=4).

QT intervals. Figure 1A shows examples of lead I ECG recordings obtained in one CTL and one ORC mouse. A prolonged QT interval was observed in the ORC compared with the CTL mouse. As shown in figure 1B, QTc intervals were significantly prolonged in ORC compared with CTL male mice. To rule out the possibility that the prolonged cardiac repolarization observed in ORC mice was a direct or indirect consequence of the surgical operation, we recorded surface ECG in sham-operated male mice. As expected, QTc intervals were similar between sham-operated and CTL male mice (sham-operated: 60 ± 4 ms, n=4; CTL: 66 ± 3 ms, n=18; p=0.3).

Action potential durations. Action potentials were evoked using the whole-cell current-clamp protocol by injection of brief (2-5 ms) stimulus currents (0.4-0.7 nA) at rates of 1 and 4 Hz. Figure 2A shows representative action potentials recorded at 4 Hz in CTL and ORC ventricular myocytes. Figure 2B shows mean APDs measured at 20%, 50% and 90% of repolarization in CTL and ORC myocytes. As for the QTc intervals, the APD in ORC were significantly longer than those in CTL mice (APD₂₀, ORC: 5 ± 0.4 ms; CTL: 3 ± 0.3 ms; p=0.0004) (APD₅₀, ORC: 11 ± 1 ms; CTL: 5 ± 0.4 ms; p=0.0007) (APD₉₀, ORC: 33 ± 3 ms; CTL: 18 ± 2 ms; p=0.002) (n, ORC: 26; CTL:17). Action potentials recorded at 1 Hz were also significantly longer in the ORC group, and this difference was observed for all durations examined (data not shown).

K⁺ currents. Since K⁺ currents are major determinants of cardiac repolarization, we compared the K⁺ currents between CTL and ORC epicardial ventricular myocytes. These included: I_{Kur}, I_{to}, I_{ss} and I_{K1}. All currents were normalized to cell capacitance and expressed as densities (pA pF⁻¹). Cell capacitance of ventricular myocytes isolated from ORC and CTL mice were similar (ORC: 82 ± 4 pF, n=26; CTL: 84 ± 4 pF, n=24; p=0.8).

Inward rectifier K⁺ current: I_{K1}. We compared the current density of I_{K1} in myocytes obtained from CTL and ORC mice. I_{K1} was activated by voltage steps ranging from -110 mV to -40 mV from a holding potential of -80 mV. Figures 3 and 4 show that I_{K1} was similar in both groups. At -110 mV, the current density was -19 ± 2 pA pF⁻¹ in ORC (n=26) and -17 ± 2 pA pF⁻¹ in CTL (n=24) (p=0.2). We also compared the density of I_{K1} at -60 mV, where this current displays its maximum outward component, and there was no difference between ORC and CTL (1.4 ± 0.2 pA pF⁻¹ vs. 1.0 ± 0.2 pA pF⁻¹, p=0.07). In addition, the resting potential was not significantly different between the two groups (ORC: -74 ± 1 mV; CTL: -73 ± 2 mV, p=0.5).

Voltage-activated outward K⁺ currents. Variations in outward K⁺ currents density have dramatic effect on action potential duration (Fiset *et al.* 1997a). Thus, we examined whether a difference in outward K⁺ currents between CTL and ORC ventricular myocytes could account for the longer QT interval and APD observed in ORC mice. Figure 3A shows a family of K⁺ currents recorded from ventricular myocytes isolated from CTL and ORC mice. The total K⁺ current (I_{peak}) was activated by a series of test potentials varying from -110 mV to +50 mV in 10 mV increments from a holding potential of -80 mV. Figure 3B compares mean I-V relationships for I_{peak} in CTL and ORC mouse ventricular myocytes. For potentials positive to -40 mV,

the density of I_{peak} was significantly smaller in ORC cells. For instance, the mean current densities of the peak outward current measured at +50 mV were $78 \pm 6 \text{ pA pF}^{-1}$ ($n=26$) in ORC and $101 \pm 5 \text{ pA pF}^{-1}$ ($n=24$) in CTL ($p<0.01$). We then examined the contribution of individual outward K^+ currents. First, we eliminated the transient portion (or I_{to}) by applying an inactivating prepulse (100 ms, -40 mV) immediately before the main activation steps. The current remaining after inactivation of I_{to} is denoted I_{Kslow} and is composed of I_{Kur} (or the 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component) and I_{ss} (or the 4-AP-resistant component). Figure 3C shows superimposed current records that correspond to I_{Kslow} in CTL and ORC myocytes. Figure 3D shows the mean I-V plots for I_{Kslow} in CTL and ORC cells where it can be seen that the density of I_{Kslow} was significantly smaller in the ORC group for all potentials positive to -40 mV (at +50 mV, ORC: $46 \pm 5 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=26$; CTL: $66 \pm 4 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=24$; $p=0.004$). We then compared the density of I_{to} , which was obtained by subtracting the current traces measured with and without the inactivating prepulse (in other words, by subtracting I_{Kslow} from I_{peak}). Figure 4A shows examples of I_{to} recorded from CTL and ORC myocytes. As shown in Figure 4B, there was no difference in the density of I_{to} between ORC and CTL ventricular myocytes (at +50 mV, ORC: $40 \pm 4 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=26$; CTL: $41 \pm 2 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=24$; $p=0.9$). We took advantage of the difference in sensitivities of I_{Kur} and I_{ss} to the pharmacological agent 4-AP to determine whether smaller current density of I_{Kslow} was the result of smaller I_{Kur} and/or I_{ss} in ORC ventricular myocytes. Thus, we applied 200 μM 4-AP (which blocks I_{Kur}) (Fiset *et al.* 1997a; London *et al.* 2001; Trépanier-Boulay *et al.* 2001) in combination with the inactivating prepulse (which blocks I_{to}) and recorded the 4-AP resistant outward K^+ current, or I_{ss} (Figure 4C). It is important to note that 200 μM 4-AP was used to distinguish between I_{Kur} and I_{ss} rather than I_{Kur} and I_{to} . Effectively, as shown above, I_{to} was measured in total absence of 4-AP (see Figure 4A) and this current was always inactivated when 4-AP was used to separate I_{Kur} and I_{ss} . As we can see in Figure 4D which depicts the mean I-V relationships for I_{ss} , there was no difference between the density of I_{ss} recorded from ORC and CTL mice (at +50 mV, ORC: $18 \pm 1 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=25$; CTL: $20 \pm 1 \text{ pA pF}^{-1}$, $n=17$; $p=0.08$). We then compared the 4-AP sensitive current (or I_{Kur}) between CTL and ORC mice. Figure 5A shows

superimposed current traces of I_{Kur} in both groups. These records were obtained by subtracting the currents recorded before (Figure 3C) and after (Figure 4C) the addition of 4-AP. As illustrated in these recordings, I_{Kur} in mouse ventricular myocytes exhibited a much faster inactivation rate than that of human atrial myocytes (Wang *et al.* 1993; Nygren *et al.* 1998). The density of I_{Kur} was markedly smaller in the ORC group than in the CTL group. As shown by the I-V curves presented in Figure 5B, I_{Kur} was significantly smaller in the ORC mice over the entire activation range (at +50 mV, ORC: 29 ± 4 pA pF⁻¹, n=25; CTL: 48 ± 5 pA pF⁻¹, n=17; p=0.006).

These voltage-clamp experiments clearly show that the differences we observed in APD and QTc interval between intact and ORC male mice result from the lower current density of I_{Kur} in the ventricular myocytes isolated from ORC mice.

Voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . Figure 6A compares the voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} between the two groups. The voltage protocol is shown in inset. Figure 6B shows Boltzmann functions fitted to mean data recorded in CTL and ORC mice. The voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} was identical in ORC and CTL myocytes ($V_{1/2}$, ORC: -48 ± 2 mV; CTL: -48 ± 2 mV; p=0.8; slope factor, ORC: 7 ± 1 mV; CTL: 7 ± 1 mV; p=0.4; ORC: n=8; CTL: n=11).

Recovery from inactivation of I_{Kur} . Figure 6C shows the results of a voltage-clamp experiment comparing the rate of recovery from inactivation in CTL and ORC mice. As shown in Figure 6D, ORC and CTL myocytes recovered from inactivation in a similar fashion. The data were best fitted with a single exponential function and mean time constants were 382 ± 45 ms in ORC ($n=8$) and 298 ± 39 ms in CTL ($n=11$) mice ($p=0.2$). These results indicate that alterations in kinetics properties of I_{Kur} cannot explain the lower density of I_{Kur} in ORC mice.

Protein expression of K^+ channels in CTL and ORC mice. We then examined the expression levels of the following K^+ channel isoforms responsible for the currents described above: Kv1.5 (I_{Kur}) (London *et al.* 2001), Kv2.1 (I_{ss}) (Xu *et al.* 1999), Kv4.2 and Kv4.3 (I_{to}) (Dixon & McKinnon 1994; Dixon *et al.* 1996; Fiset *et al.* 1997b; Barry *et al.* 1998; Wickenden *et al.* 1999), and Kir2.1 (I_{K1}) (Kubo *et al.* 1993; Zaritsky *et al.* 2001). Consistent with the electrophysiological results, data presented in Figure 7A show that the expression level of Kv1.5 was clearly lower in ORC ventricles than in CTL ventricles. For all the other K^+ channels studied, the protein expression was similar between the two groups as were the current densities of I_{to} , I_{ss} , and I_{K1} of ORC and CTL mice. In addition, immunofluorescence and confocal microscopy studies showed a lower expression for Kv1.5 proteins in ORC myocytes (Figure 7B). This relative reduction of expression was specific for Kv1.5 as exemplified by the result obtained with Kir2.1 (coding for I_{K1}) that showed similar fluorescence intensity between the two groups (data not shown).

DISCUSSION

We have shown that chronic androgen deficiency alters mouse cardiac repolarization. Males that were subjected to castration exhibited longer QTc intervals and APDs than control mice. This delayed ventricular repolarization was associated with lower current density of I_{Kur} and lower expression of its corresponding K^+ channel, Kv1.5, despite normal voltage dependence and kinetic properties of this current in ORC mice. In contrast, all the other K^+ currents/channels were unchanged in ORC mice.

Initially, we examined cardiac repolarization 1-2 months after the castration (as opposed to 3-4 months). At this earlier stage, the current density of I_{Kur} was also lower in the ORC mice but the reduction did not reach the level of statistical significance (data not shown). As expected, this diminution did not impact on cardiac repolarization since APDs were not significantly different between CTL and ORC mice of 2-3 months of age. Mice less than one month old already have considerable amounts of circulating androgens (Overpeck *et al.* 1978). It is possible that waiting a period of 1-2 months after the castration is not enough to eliminate entirely the effect of endogenous androgens. In addition, it is also likely that long term androgen deficiency is necessary to affect organs, such as the heart, which are not the primary target of sex hormones (Roy *et al.* 1997).

The cardiac phenotype of 4- to 5- month old ORC mice resembles that of female mice (see (Trépanier-Boulay *et al.* 2001) and Table 1). Indeed, compared with males, both females and ORC mice display longer QTc interval on the ECG. This prolonged repolarization time is associated with a specific decrease in I_{Kur} density that can be explained by a lower expression of Kv1.5 but not by alterations in the voltage dependence and kinetics of the current. Results presented here strongly suggest that the sex differences observed in mouse cardiac repolarization might be due in part to the action of androgens. Most of the biological effects of sex steroid hormones are mediated through the association with the androgen receptor (Litwack & Schmidt 1997). The binding of androgen with its receptor results in the formation

of an active complex that binds DNA and promotes the transcription of specific genes, giving rise to higher levels of the gene product (Litwack & Schmidt 1997). Thus, it is possible that androgens would promote Kv1.5 expression and this would result in greater K^+ current density, shorter APD and QTc interval in intact males. Furthermore, consistent with a genomic effect of androgens on this cardiac K^+ channel, we have shown that androgen receptors are present in mouse heart (data not shown).

In addition to genomic effects on cardiac repolarization, testosterone can exert direct actions on K^+ channels. Indeed, several studies have shown that acute testosterone administration induced vascular relaxation by opening smooth muscle K^+ channels (Yue *et al.* 1995; Chou *et al.* 1996; Deenadayalu *et al.* 2001; Ding & Stallone 2001). While being interesting, this mechanism is probably not responsible for the difference we observed since superfusion of ventricular myocytes with DHT did not affect K^+ currents and APD (J. Brouillette & C. Fiset, unpublished observations). In addition, it has been reported that acute perfusion of testosterone did not affect ventricular APDs in guinea-pig (Jiang *et al.* 1992) nor QT interval in men (White *et al.* 1999). Also, as mentioned earlier, 1-2 months of androgen deficiency was insufficient to induce changes in cardiac repolarization. The fact that a longer period of time (3-4 months) was required to alter cardiac repolarization in mouse ventricle does not support a non-genomic action of androgens on K^+ currents.

Relation to previous studies. Other investigators have studied the effect of chronic DHT treatment on ventricular repolarization. One group observed a decrease in APD in both ovariectomized (OVX) (Hara *et al.* 1998) and intact female (Pham *et al.* 2002b) rabbits treated with DHT compared with untreated OVX or female rabbits, respectively. These data support the assumption that androgens shorten ventricular repolarization. However, they did not study K^+ currents to demonstrate if this faster repolarization resulted from an increase in K^+ currents. On the other hand, (Drici *et al.* 1996) examined K^+ channels and found that Kv1.5 and minK were downregulated after 20 day injections of DHT in OVX females. However the roles of the

corresponding K^+ currents (I_{Kur} and the slow component of the delayed rectifier, I_{Ks}) are probably small in the rabbit ventricle.

In contrast to the results presented here, (Pham *et al.* 2001) did not observe any difference in APD between castrated and intact male rabbits. There could be many reasons for this discrepancy. First, rabbits and mice share some but not all of their K^+ channels. As mentioned earlier, the physiological role for I_{Kur} , the K^+ current responsible for the longer APD observed in our study, is minor in rabbit and this could well explain the difference between the two studies. In addition, examination of the experimental design revealed major differences between the two studies. Their rabbits were castrated at an older age (50-60 days vs. 37 days in our study), implying that they were exposed for a longer period of time to androgens, and they were subjected to a shorter period of androgen deficiency (42-49 days vs. a minimum of 90 days in our study). All these factors could explain the absence of effect on cardiac repolarization in their study. In a recent study, the same group showed that Ca^{2+} currents were not affected by castration nor by DHT replacement in male rabbits (Pham *et al.* 2002a). That study suggests that modifications in Ca^{2+} currents between castrated and control males would not be responsible for the difference in cardiac repolarization that we report here. In keeping with this, we have previously reported that there is no sex difference in Ca^{2+} currents in mouse ventricles (Trépanier-Boulay *et al.* 2001), suggesting that sex steroid hormones do not alter Ca^{2+} currents.

Experimental data also suggest that androgens may have a protective role against the antiarrhythmic actions of some cardiotoxic drugs. (Shuba *et al.* 2001) reported that the effects of drugs that inhibit HERG (which codes for the rapid component of the delayed rectifier, I_{Kr}) current in *Xenopus* oocytes are prevented by pre-treatment with testosterone. Moreover, data suggesting a lesser degree of quinidine-induced QT prolongation in DHT vs. estradiol-pretreated ovariectomized rabbits have also been reported (Drici *et al.* 1996). Finally, a recent study reported that the APD prolongation induced by dofetilide was less important in female rabbits treated with DHT than in control females (Pham *et al.* 2002b).

The involvement of male sex hormones in the regulation of ventricular repolarization does not rule out a possible role for the female sex hormones in this phenomenon. In fact, 17β -estradiol has been shown to affect cardiac repolarization in several species including guinea pig (Nakajima *et al.* 1999; Tanabe *et al.* 1999) and rat (Berger *et al.* 1997). Undergoing studies in our laboratory are focussing on the role of female sex hormones in murine cardiac repolarization.

In conclusion, this work improves our understanding of the role of male sex hormones in the regulation of cardiac K^+ channels. The findings presented here strongly suggest that androgens could contribute to sex-based differences in cardiac repolarization. Finally, in addition to displaying sex differences in ventricular repolarization, mouse cardiac K^+ currents/channels can be modulated by variations in sex hormone levels, thus reinforcing the validity of mice as an animal model to study sex-related differences in cardiac electrophysiology.

REFERENCES

- Barry D M, Xu H, Schuessler R B & Nerbonne J M (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α -subunit. *Circ Res* **83**, 560-567.
- Bazett H (1920). An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* **7**, 353-370.
- Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I & Weis T M (1997). Effects of 17 β -estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naun Schmiede Arch Pharmacol* **356**, 788-796.
- Bidoggia H, Maciel J P, Capalozza N, Mosca S, Blaksley E J, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti M O & Quinteiro R (2000). Sex difference on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am heart J* **140**, 678-683.
- Chou T M, Sudhir K, Hutchison S J, Ko E, Amidon T M, Collins P & Chatterjee K (1996). Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* **94**, 2614-2619.
- Deenadayalu V P, White R E, Stallone J N, Gao X & Garcia A J (2001). Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol* **281**, H1720-H1727.
- Ding A & Stallone J N (2001). Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol* **91**, 2742-2750.
- Dixon J E & McKinnon D (1994). Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* **75**, 252-260.

Dixon J E, Shi W, Wang H S, McDonald C, Yu H, Wymore R S, Cohen I S & McKinnon D (1996). Role of the Kv4.3 potassium channel in ventricular muscle: a molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* **79**, 659-668.

Drici M D, Burklow T R, Haridasse V, Glazer R I & Woosley R L (1996). Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circ Res* **94**, 1471-1474.

Fiset C, Clark R B, Larsen T S & Giles W R (1997a). A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond)* **504**, 557-563.

Fiset C, Clark R B, Shimoni Y & Giles W R (1997b). *Shal*-type channels contribute to the Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current in rat ventricle. *J Physiol (Lond)* **500.1**, 51-64.

Hara M, Danilo P Jr & Rosen M R (1998). Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther* **285**, 1068-1072.

Isenberg G & Klockner U (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflug Arch* **395**, 6-18.

Jiang C, Sarrel P M, Poole-Wilson P A & Collins P (1992). Effect of 17β -oestradiol on contraction, Ca^{2+} current and intracellular free Ca^{2+} in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **263**, H271-H275

Ju Y K, Saint D A & Gage P W (1996). Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* **497**, 337-347.

Kubo Y, Baldwin T J, Jan Y N & Jan L Y (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.

Lehmann M H, Timothy K W, Frankovich D, Fromm B S, Keating M, Locati E H, Taggard R T, Towbin J A, Moss A J, Schwartz P J & Vincent M (1997). Age-sex

influence on the rate-corrected interval and the QT-heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* **29**, 93-99.

Litwack G & Schmidt T J (1997). Biochemistry of hormones II: Steroid hormone. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, ed. Devlin T M, pp. 893-918. New York: Wiley-Liss.

Locati E, Zareba W, Moss A J, Schwartz P J, Vincent M, Lehmann M H, Towbin J, Priori S G, Napolitano C, Robinson J L, Andrews M, Timothy K W & Hall W J (1998). Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital Long-QT syndrome. Findings from the international LQTS registry. *Circulation* **97**, 2237-2244.

London B, Guo W, Pan X, Lee J S, Shusterman V, Rocco C J, Logothetis D A, Nerbonne J M & Hill J A (2001). Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* **88**, 940-946.

Mitchell G F, Jeron A & Koren G (1998). Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* **274**, H747-H751.

Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y & Hazama H (1999). Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17β -estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **127**, 429-440.

Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compennolle V, Rudy Y, Smits J F, Flameng W, Clancy C E, Moons L, Vos M A, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E & Carmeliet P (2002). Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nature Med* **7**, 1021-1027.

Nygren A, Fiset C, Firek J W, Clark J W, Lindblad D S, Clark R B & Giles W R (1998). Mathematical model of an adult human atrial cell. The role of K^+ currents in repolarization. *Circ Res* **82**, 63-81.

Overpeck J G, Colson S H, Hohmann J R, Applestine M S & Reilly J F (1978). Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. *J Toxic Env Health* **4**, 785-803.

Pham T V, Robinson R, Danilo P & Rosen M (2002a). Effects of gonadal steroids on sex-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovasc Res* **53**, 752-762.

Pham T V, Sosunov E A, Anyukhovskiy E P, Danilo P Jr & Rosen M R (2002b). Testosterone diminishes the proarrhythmic effects of dofetilide in normal female rabbits. *Circulation* **106**, 2132-2136.

Pham T, Sosunov E, Gainullin R, Danilo P & Rosen M (2001). Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K-blocking drugs. *Circulation* **103**, 2207-2212.

Rautaharju P M, Zhou S H, Wong S, Calhoun H P, Berenson G S, Prineas R & Davignon A (1992). Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* **8**, 690-695.

Roy A K, Vellano R L, Jung M H & Chatterjee B (1997). Cellular and molecular effects of androgenic-anabolic steroids. In *Endocrine Toxicology*, eds. Thomas J A & Colby H D, pp. 213-225. Taylor & Francis.

Shuba Y M, Degtiar V E, Osipenko V N, Naidenov V G & Woosley R L (2001). Testosterone-mediated modulation of HERG blockade by proarrhythmic agents. *Biochem Pharmacol* **62**, 41-49.

Stolt A, Karila T, Viitasalo M, Mäntysaari M, Kujala U M & Karjalainen J (1999). QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *Am J Cardiol* **84**, 364-366.

Stramba-Badiale M, Spagnolo D, Bosi G & Schwartz P J (1995). Are sex differences in QTc present at birth? *Am J Cardiol* **75**, 1277-1278.

Tanabe S, Hata T & Hiraoka M (1999). Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* **46**, H826-H833.

Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A & Fiset C (2001). Sex-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* **89**, 437-444.

Wang Z, Fermini B & Nattel S (1993). Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* **73**, 1061-1076.

White C, Ferraro-Borgida M, Moyna N, McGill C, Ahlberg A, Thompson P & Heller G (1999). The effect of pharmacokinetically guided acute intravenous testosterone administration on electrocardiographic and blood pressure variables. *J Clin Pharmacol* **39**, 1038-1043.

Wickenden A D, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman G I & Backx P H (1999). Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K⁺ channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* **85**, 1067-1076.

Xu H, Barry D M, Li H, Brunet S, Guo W & Nerbonne J M (1999). Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 α subunit. *Circ Res* **85**, 623-633.

Yang H, Elko P F B S, Baga J J, Pires A A, Schuger C D, Steinman R T & Lehmann M H (1997). Maximal ascending and descending slopes of the T wave in men and women. *J Electrocardiol* **30**, 267-276.

Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson P A & Collins P (1995). Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* **91**, 1154-1160.

Zaritsky J J, Redell J B, Tempel B L & Schwarz T L (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* **533**, 697-710.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by operating and personal grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec, the Research Funds of the Montreal Heart Institute and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We would like to thank Chantale St-Michel, Louis-Robert Villeneuve and Marc-Antoine Gillis for technical assistance.

FIGURES AND LEGENDS**Figure 1. Comparison of QT interval between CTL and ORC mice**

A. Examples of lead I surface ECG obtained from one CTL and one ORC male mouse.

B. Table comparing mean QT, QTc and heart rate (HR) in CTL and ORC mice.

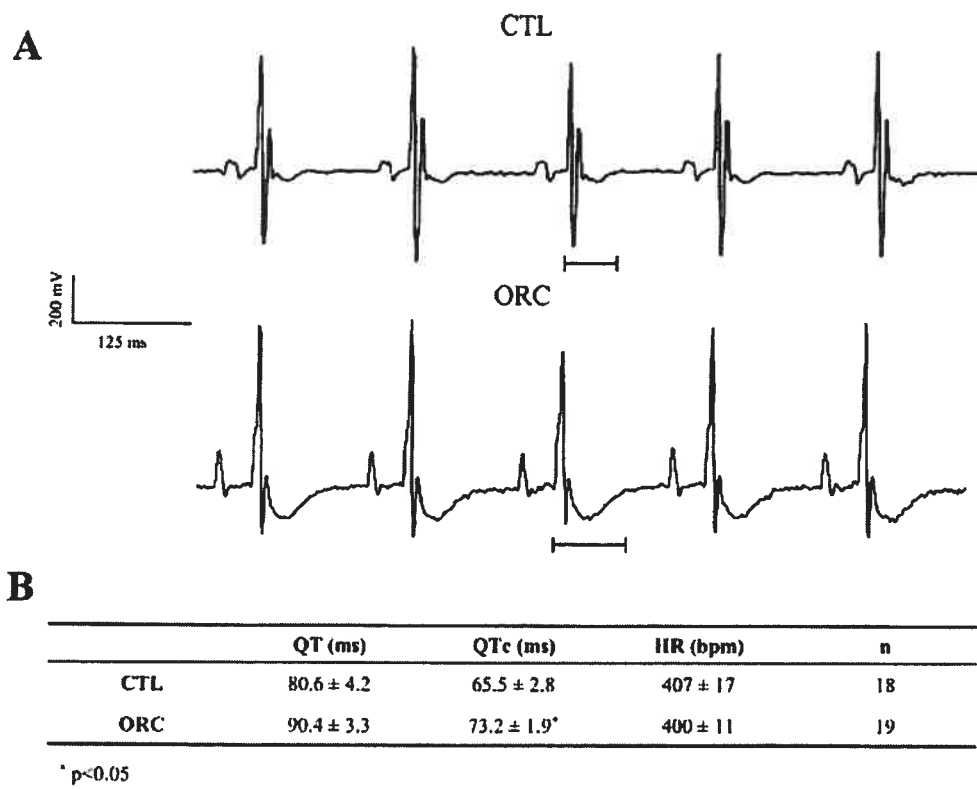


Figure 1

Figure 2. Comparison of action potentials between CTL and ORC mouse ventricular myocytes

A. Typical examples of action potentials recorded from CTL and ORC mice. Dotted lines represent the 0 mV level. *B.* Mean APD at 20%, 50% and 90% of repolarization in CTL and ORC mice. Action potentials were recorded at a frequency of 4 Hz. Recordings shown in this figure and all subsequent figures were measured at room temperature.

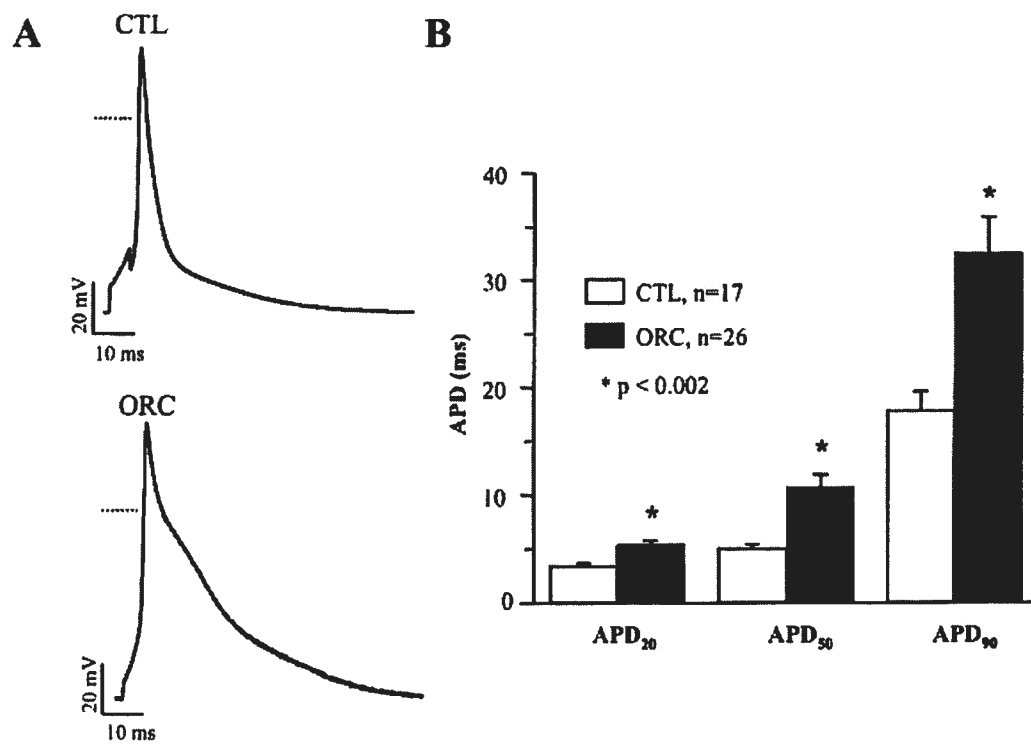


Figure 2

Figure 3. Comparison of total K^+ current (I_{peak}) and I_{Kslow} ($I_{Kur} + I_{ss}$) between CTL and ORC mouse ventricular myocytes

A. Family of K^+ currents recorded from CTL and ORC myocytes. Membrane currents were activated using the voltage protocol shown in the inset. **B.** Mean I-V relationships for the total K^+ current (I_{peak}) in CTL and ORC ventricular myocytes. **C.** Superimposed current traces of I_{Kslow} in CTL and ORC cells. I_{Kslow} was activated by 500 ms voltage steps preceded by 100 ms inactivating prepulse to -40 mV. **D.** Mean I-V curves for I_{Kslow} recorded from CTL and ORC mice. Note that the current densities of I_{K1} , which was activated by voltage steps ranging from -110 mV to -40 mV, were similar between ORC and CTL mice.

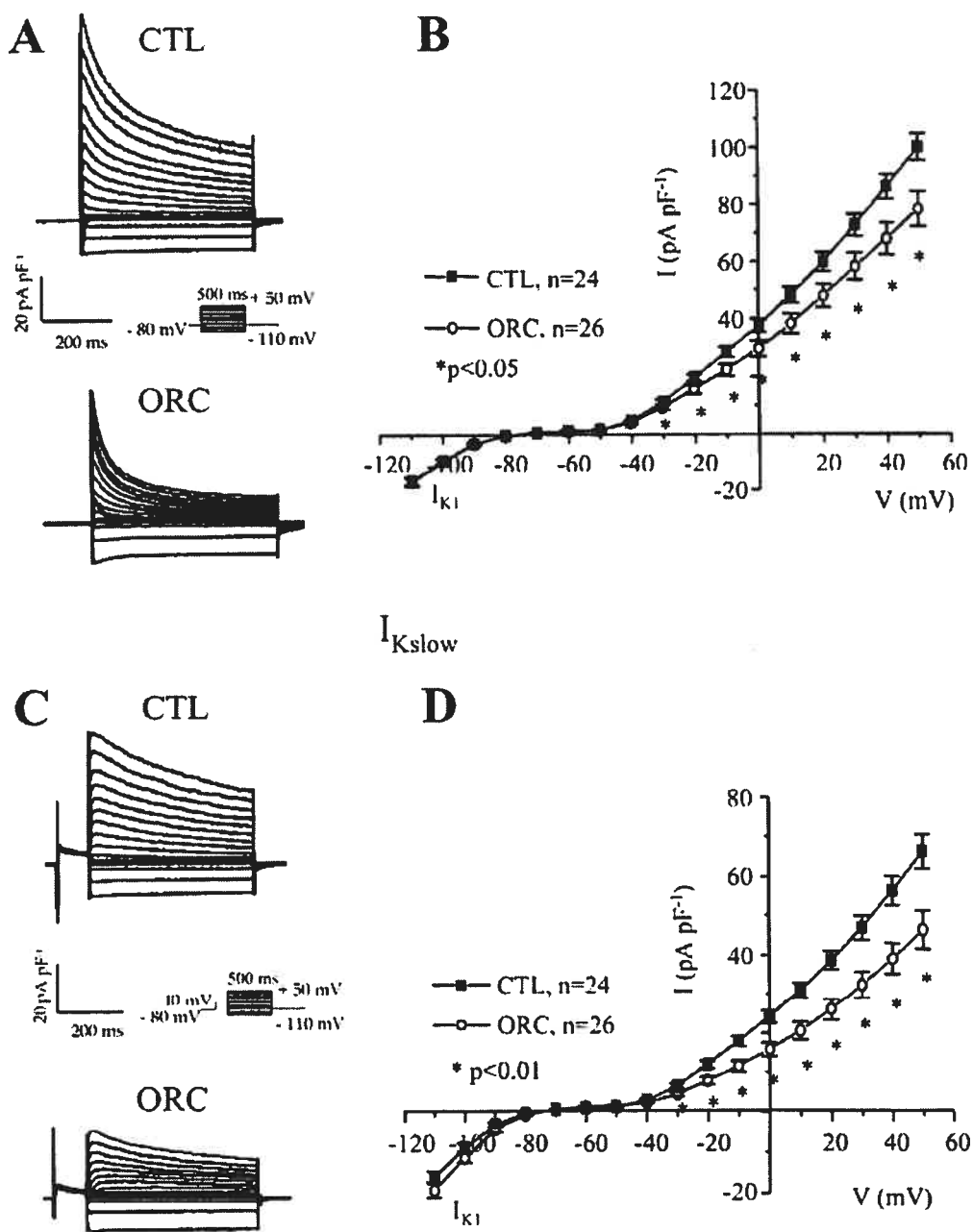
Total K^+ Current (I_{peak})

Figure 3

Figure 4. Comparison of the transient outward K⁺ current (I_{to}) and the steady-state K⁺ current (I_{ss}) between CTL and ORC mouse ventricular myocytes

A. Superimposed current records illustrating I_{to} were obtained by subtracting the corresponding currents recorded with (Figure 3C) and without (Figure 3A) the inactivating prepulse. *B.* Mean I-V relationships for I_{to} in CTL and ORC mice. *C.* Representative examples of I_{ss} in CTL and ORC myocytes. I_{ss} was measured after application of 200 μ M 4-AP using the inactivation prepulse protocol. *D.* I-V curves for I_{ss} recorded from CTL and ORC mice. NS, not significant.

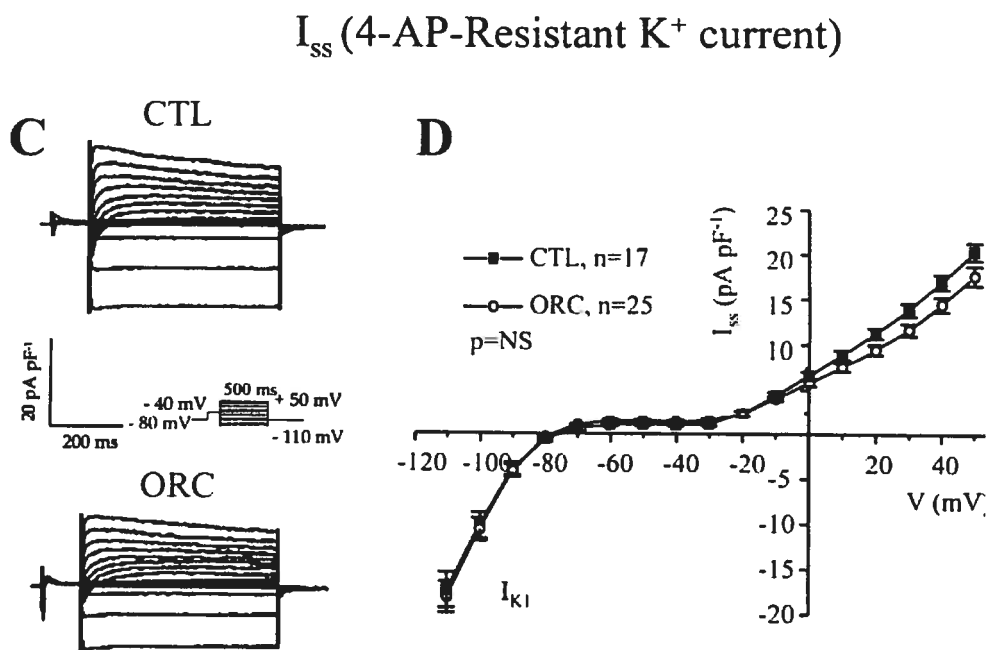
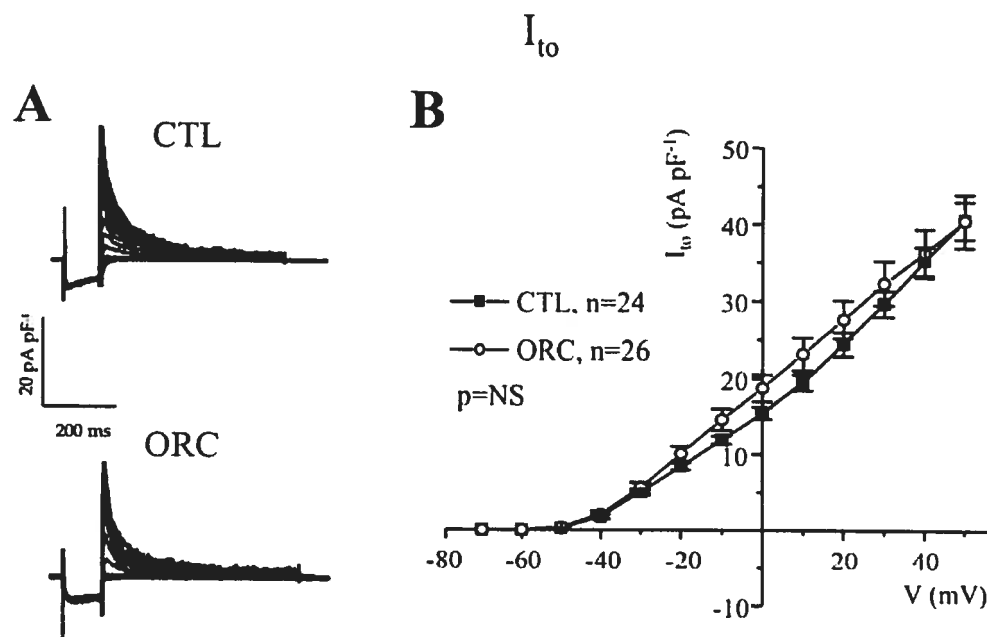


Figure 4

Figure 5. Comparison of I_{Kur} between CTL and ORC mouse ventricular myocytes. *A.* Family of membrane currents obtained by subtracting pairs of currents recorded with (Figure 4C) and without (Figure 3C) application of 200 μ M 4-AP in CTL and ORC cells. *B.* Mean I-V curves for I_{Kur} recorded from CTL and ORC mice.

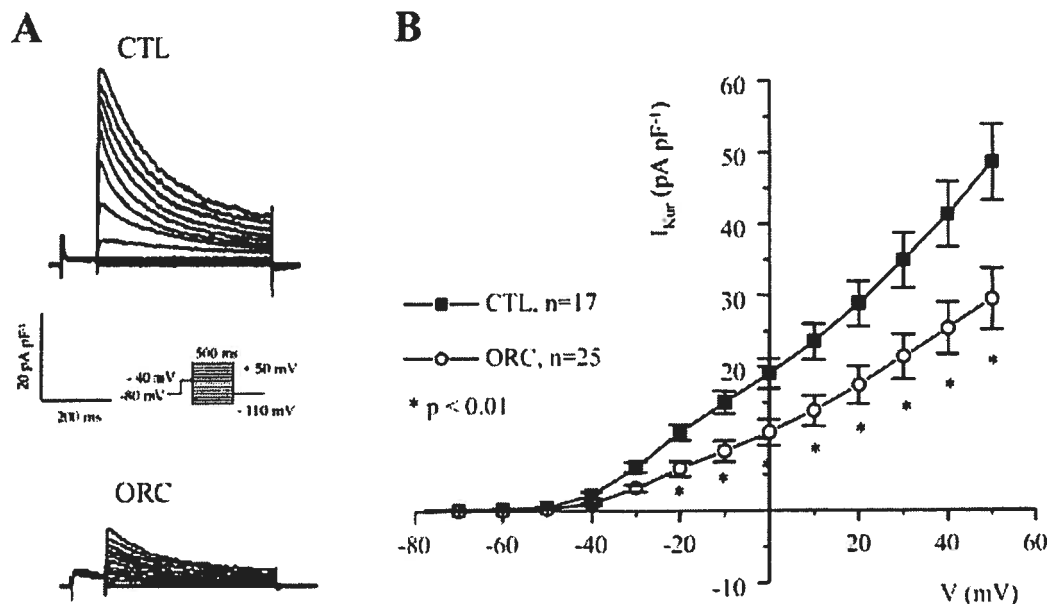
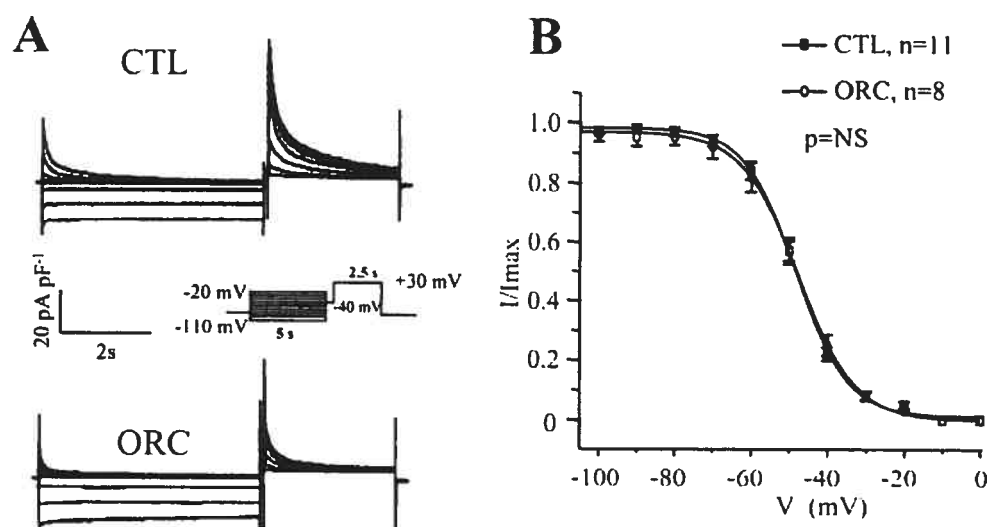
I_{Kur} (4-AP-sensitive K^+ current)

Figure 5

Figure 6. Comparison of kinetic parameters for I_{Kur} between CTL and ORC ventricular myocytes

A. Superimposed current records showing voltage dependence of steady-state inactivation for I_{Kur} in CTL and ORC myocytes. The cells were held at various test potentials varying from -110 mV to -20 mV for 5 s. A 2.5 s voltage step to +30 mV preceded by an inactivating prepulse (at -40 mV for 100 ms) was then applied to measure the remaining current. **B.** Graph comparing the voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} between CTL and ORC mice. I/I_{max} is the current normalized to the current obtained with the -110 mV voltage step. Smooth lines are best-fit Boltzmann functions. **C.** Family of current recordings showing the time course of recovery from inactivation for I_{Kur} in CTL and ORC cells. Two voltage steps (+30 mV; $P_1=1500$ ms, $P_2=500$ ms) separated by 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000 ms were applied. Both steps were preceded by the I_{to} inactivating prepulse. **D.** Graph comparing reactivation of I_{Kur} between CTL and ORC myocytes. P_2/P_1 represents the ratio of the amplitude of the current generated by each pulse.

Steady-State Inactivation



Recovery from Inactivation

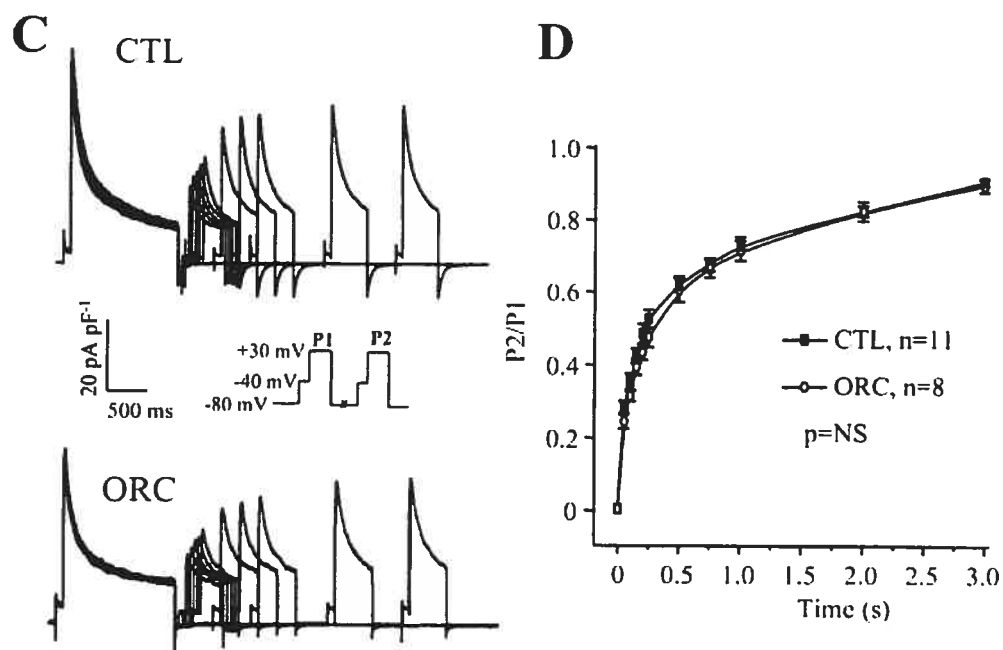


Figure 6

Figure 7. Western blot and immunofluorescence detection of K⁺ channels expression in CTL and ORC male mouse ventricle

A. Comparison of K⁺ channel protein expression in CTL and ORC ventricles. Western blot analysis of Kv1.5 (1:500), Kv4.2 (1:500), Kv4.3 (1:4000), Kv2.1 (1:300) and Kir2.1 (1:500) in sarcolemmal-enriched proteins (100 µg lane⁻¹) isolated from CTL and ORC mouse ventricles (n=2 per group; 3 pooled ventricles per n value). Antibodies used were all obtained from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), with the exception of Kv1.5, which was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Equal protein loading was confirmed by Ponceau-S stained membranes. Furthermore, we used Kir2.1 as an internal control on the same Western blot gel as Kv1.5 and found no difference in the density of this protein (data not shown). **B.** Immunofluorescence labeling of Kv1.5 in CTL and ORC male mouse ventricular myocytes. **Upper panels. (left)** Isolated cells were stained by exposure to the primary antibody and then to TRITC-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore, PA, USA). The red fluorescent staining indicates the presence of Kv1.5 in CTL and ORC myocytes. **(right)** Cells seen on the left at higher magnification. **Middle panel.** Bar graph showing the relative fluorescence intensity of Kv1.5 in CTL and ORC myocytes (2 mice per group; 10 cells studied per mouse). Individual values of Kv1.5 fluorescence intensity corresponded to whole-cell fluorescence intensity. These values were obtained with the laser scanning microscopy software using an indicator that recorded fluorescence intensity at every pixel of the cell image. These measures were then normalized to cell surface area to account for cell size. **Lower panels.** Phase contrast images **(left)** and immunofluorescence detection **(right)** of the same CTL and ORC cells. These negative controls show that no staining was apparent when the primary antibody was omitted in CTL and ORC cells. The experiment using a fusion protein specific for the sequence of the antibody shows the specificity of the staining for Kv1.5.

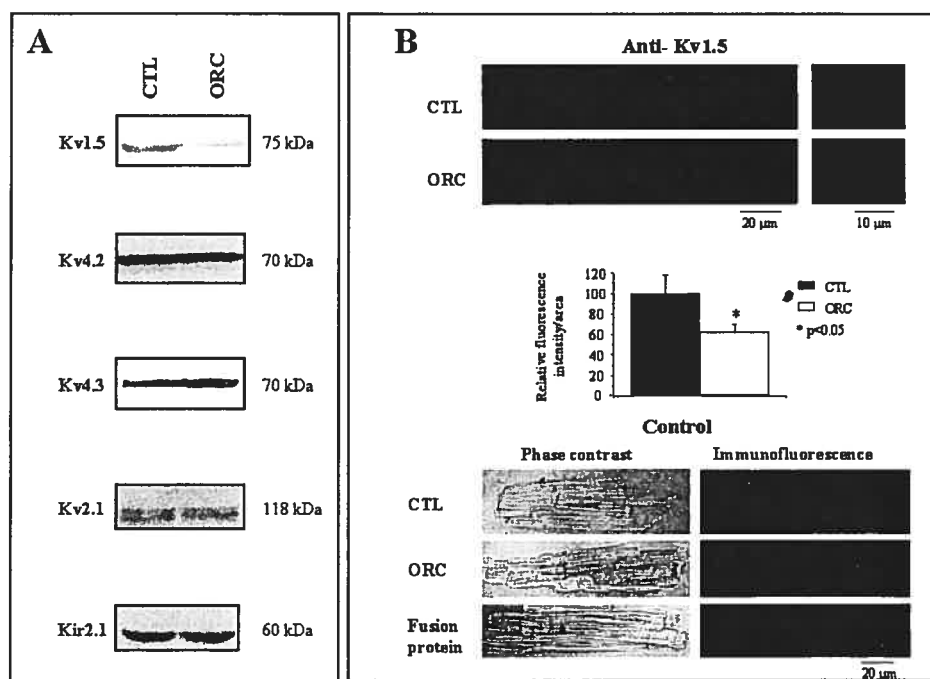


Figure 7

**Table 1. Comparison of QT, QTc and heart rate (HR)
between male and female mice**

	QT (ms)	QTc (ms)	HR (bpm)	n
Male	77.5 ± 3.7	64.0 ± 2.3	415 ± 14	11
Female	88.7 ± 4.3	74.3 ± 2.9*	427 ± 18	11

Two- to 3-month-old CD1 mice of both sexes were used. See ECG recordings in Methods. * P<0.01.

CHAPITRE 4 Importance des androgènes dans les différences de repolarisation reliées au sexe et à la lignée de souris

Suite à l'étude de Trépanier-Boulay et coll.¹¹⁸ effectuée dans le laboratoire, d'autres équipes de recherche ont aussi comparé la repolarisation cardiaque des souris mâles et femelles.^{126,127} Alors que certaines études ont observé des différences entre les sexes, d'autres ont plutôt rapporté des caractéristiques semblables. Afin de comprendre ces discordances, nous avons comparé les designs expérimentaux des études. Nous avons entre autres constaté que différentes lignées de souris avaient été étudiées: des souris CD-1, C57BL/6 et des souris provenant d'un croisement entre C57BL/6 et 129SVE.

La lecture parallèle d'une étude d'endocrinologie comparant divers types de souris nous a confirmé que le choix de la lignée pouvait réellement être la cause des contradictions apparentes. En effet, cette étude démontrait que les souris C57BL mâles avaient des niveaux d'androgènes très faibles alors que les CD-1 avaient des niveaux beaucoup plus élevés. Puisque nous avons démontré l'influence de ces hormones au niveau de la repolarisation cardiaque, il semblait alors logique que ces deux lignées présentent des caractéristiques électrophysiologiques distinctes.

L'article présenté dans ce chapitre profite du modèle de souris C57BL/6 ayant des niveaux d'androgènes extrêmement faibles pour confirmer le fait que ces hormones régulent la repolarisation cardiaque et qu'elles sont responsables de la différence observée à ce niveau. L'article traite aussi de l'effet d'une thérapie de substitution d'androgènes dans ce modèle et dans celui de la souris CD-1 castrée, décrit au chapitre précédent. Finalement, il présente les niveaux de testostérone et de DHT de diverses lignées de souris.

Cardiovascular Research 65 (2005) 148-157

**SEX AND STRAIN DIFFERENCES IN ADULT MOUSE CARDIAC REPOLARIZATION:
IMPORTANCE OF ANDROGENS**

Judith Brouillette,^{1,2} Katy Rivard^{1,2} Eric Lizotte^{1,2} and Céline Fiset^{1,2†}

¹Research Center, Montreal Heart Institute
5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

and


²Faculty of Pharmacy, University of Montreal
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Running title: Impact of androgen on mouse cardiac repolarization

†to whom all correspondence and reprint requests should be addressed

tel: (514) 376-3330 3025

fax: (514) 376-1355



ABSTRACT

Objective. Gender differences in mouse cardiac repolarization have been reported to be due to the stimulatory action of androgens on the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and its underlying Kv1.5 channel. To confirm the regulation of ventricular repolarization by androgens, the present study compared two strains of mice (CD-1 and C57BL/6), that present different androgen levels. **Methods and results.** Measurement of testosterone levels in different strains of mice (CD-1, C57BL/6, C3H and FVB) revealed that male C57BL/6 mice had very low levels of testosterone, whereas males of the other strains displayed normal testosterone levels. Furthermore, whole cell voltage clamp recordings in isolated ventricular myocytes showed that the current density of I_{Kur} in male C57BL/6 mice was similar to that in female mice but smaller with respect to male CD-1 mice. Androgen replacement in male C57BL/6 mice as well as in castrated male CD-1 mice shortened ventricular repolarization, increased I_{Kur} current density and increased expression of Kv1.5 channels. **Conclusion.** Strain and gender differences observed in mouse cardiac repolarization can be explained by different androgen levels. As a consequence, androgens are major regulatory factors in cardiac repolarization and special attention should be paid to the hormonal status of the animal when studying hormonal regulation of cardiac repolarization.

INTRODUCTION

In earlier studies, we demonstrated that CD-1 mice exhibited sex-specific differences in cardiac repolarization and that male mice subjected to castration presented a cardiac phenotype resembling that of female mice [6,25]. Indeed, both females and castrated male mice displayed longer action potential duration (APD) and QTc intervals compared to males. This prolonged repolarization was associated with a specific decrease in the density of the ultrarapid delayed rectifier K⁺ current (I_{Kur}) and of its underlying K⁺ channel isoform, Kv1.5. These results strongly suggested that gender difference in repolarization might be due to the action of androgens.

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

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

METHODS

Animals

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

Dihydrotestosterone (DHT) replacement

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

Measurements of androgen levels

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

Myocytes isolation

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

Electrophysiological Recordings

The whole-cell voltage and current recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols and analysis methods have been described previously [5]. Pipettes had resistances in the range 1.5-4 M Ω when filled with the following solution (mM): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂ATP and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1 kHz with a 4-pole Bessel analog filter, digitized at 4-10 kHz. All experiments were carried out at room temperature (20-22°C). To measure I_{Kur}, we applied 100 μ M 4-Aminopyridine (4-AP (which blocks I_{Kur}) [5,9,18,25] in combination with an

inactivating prepulse (which blocks I_{to}) and recorded the 4-AP resistant K^+ current, or I_{ss} . We then measured I_{Kur} by subtracting currents recorded in absence or presence of 4-AP ($I_{Kslow} - I_{ss}$). The description and validation of these pharmacological and biophysical methods has been recently published [5].

Western blot analysis

Protocols used for protein isolation and Western blots analysis were identical to those previously reported [6]. Proteins were prepared from mouse ventricles (3 pooled hearts/sample) homogenized in Tris-EDTA (TE) buffer (pH: 7.4) containing protease inhibitors (Leupeptin, Aprotinin, Benzamidine, Phenylmethyl sulfonyl fluoride [PMSF], and Na_3VO_4). The homogenate was centrifuged at 10,000 x g. The supernatant was ultracentrifuged 3 times at 200,000 x g for 20 min. The pellet was resuspended in TE buffer containing the protease inhibitors and 0.6 M KCl to dissolve contractile proteins. The pellet corresponds to the sarcolemmal-enriched proteins. Proteins were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blotted with anti-Kv1.5 (1:500; Upstate, Lake Placid, NY, USA). Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Bands were quantified by densitometry using Multi-Analyst program (Bio-Rad, CA, USA).

ECG recordings

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

Statistical analysis

Values are presented as mean \pm SEM and n refers to the number of different cells. An unpaired Student t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post test were used when appropriate. For the comparison of androgens levels, the non-parametric tests Kruskal-Wallis with a Dunns post test, or Mann-Whitney were used. P-values smaller than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

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

We used two strains of mice (CD-1 and C57BL/6) that present different androgen levels to further assess the association between androgen level and cardiac repolarization. We compared electrophysiological properties of C57BL/6 and CD-1 mice of both sexes. More precisely, we focused on I_{Kur} based on the fact that the relatively prolonged ventricular repolarization of female and orchietomized male CD-1 compared to normal male CD-1 mice is associated with a specific decrease in this K^+ current [6,25]. Figure 2 presents typical examples as well as mean data for the current density of I_{Kur} recorded in ventricular myocytes isolated from male and female CD-1 and C57BL/6 mice. I_{Kur} was measured as the 4-AP-sensitive (100 μ M) current elicited by 500 ms voltage step ranging from -110 mV to +50 mV from a holding potential of -80 mV (for more details, see Ref [5]). The current density of I_{Kur} at +30 mV was similar for male and female C57BL/6 mice (25.6 ± 2.6 and 24.5 ± 3.7 pA/pF, respectively). However, in male CD-1 mice, I_{Kur} density of 37.5 ± 3.3 pA/pF was significantly higher than that in male C57BL/6 mice (25.6 ± 2.6 pA/pF, $p < 0.05$). Consistent with previous results [25], I_{Kur} density in male CD-1 mice was significantly higher than that obtained in female CD-1 mice (at +30 mV, 24.2 ± 3.9 pA/pF, $p < 0.05$). In addition, we also compared the activation and inactivation kinetics of I_{Kur} between male C57BL/6 and CD-1 mice and found no strain difference for these parameters (data not shown).

Androgen regulation of cardiac repolarization was examined using chronic DHT treatment. DHT was favoured over testosterone as the androgenic compound because it cannot be converted into estrogens, as opposed to testosterone, hence avoiding a potential confounding factor. Castrated male mice were treated with a subcutaneous implant of DHT. Figures 3A and B present DHT and testosterone levels in three groups of male CD-1: intact, ORC, and DHT-treated ORC mice. The bar graphs show that castration leads to a complete loss of both male sex hormones levels and that DHT treatment restores physiological concentrations of DHT but not those of testosterone. These results are consistent with the fact that DHT cannot be converted into testosterone. Figure 4A presents I_{Kur} (or the 4-AP sensitive current) recorded in ventricular myocytes isolated from intact, ORC, and DHT-treated ORC male mice. As illustrated in Figure 4B, the density of I_{Kur} was smaller in ORC mice compared to both intact male and DHT-treated animals. Figure 4C shows the results of a Western Blot analysis performed on sarcolemmal-enriched proteins isolated from ventricles of each groups. Kv1.5, the K^+ channel underlying I_{Kur} , was present in all groups but displayed higher expression in both intact and DHT-treated male mice. The bands depicted on the lower panel correspond to proteins of the same membrane used to study Kv1.5. The proteins, coloured with Ponceau S, were equally loaded ruling out the possibility that unequal loading could account for the observed difference in Kv1.5 protein expression. We measured Kv1.5 density for each of the three groups studied by densitometry. These results are presented in Figure 4D. Altogether these results strongly suggest that treatment with DHT in ORC male CD-1 mice shortens repolarization by up-regulating Kv1.5 and increasing I_{Kur} density.

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

implanted DHT pellets in male C57BL/6 mice. The bar graphs presented in Figure 5 show that physiological concentrations of DHT were re-established by DHT replacement in male C57BL/6 mice. We then measured the current density of I_{Kur} in ventricular myocytes of these mice. The superimposed current traces presented in Figure 6A correspond to I_{Kur} recorded in male C57BL/6 mice treated or not with DHT. Figure 6B shows that mean current density of I_{Kur} was significantly larger in DHT-treated animals (e.g., at +30 mV, male C57BL/6: 25.6 ± 2.6 , +DHT: 40.6 ± 3.7 pA/pF, $p < 0.001$). In addition, I_{Kur} density was significantly different between male C57BL/6 mice treated with DHT and female C57BL/6 mice. In fact, the density of I_{Kur} in DHT-treated male C57BL/6 mice very much resembles that measured in male CD-1 mice (at +50 mV: 55 ± 5 , 53 ± 5 pA/pF, respectively). To verify whether this increase in I_{Kur} was due to a corresponding increase in the expression of Kv1.5 in ventricles of DHT-treated mice, Western Blot analysis was carried out in ventricular tissues isolated from C57BL/6 mice treated or not with DHT. Figure 6C shows that the expression level of Kv1.5 in DHT-treated mice is much higher compared with intact male C57BL/6 mice. Figure 6D shows that when we quantify Kv1.5 density for each of the two groups studied, we found that the increase in Kv1.5 in DHT-treated male C57BL/6 was statistically significant ($p = 0.01$). Similar to the findings obtained with the DHT-treated ORC CD-1 mice, these results also indicate that treatment with DHT significantly affects I_{Kur} and Kv1.5 in C57BL/6 mice. Ventricular action potentials (AP) were then recorded in both groups. Figure 7A depicts examples of action potentials recordings obtained in C57BL/6 mice treated or not with DHT. In line with the larger density of I_{Kur} , the action potential were significantly shorter in the DHT-treated group compared with the intact males, as shown in Figure 7B. Figure 8 presents examples of lead I surface ECG recordings obtained in one control and one DHT-treated male C57BL/6 mice. We were particularly interested in the measurement of the QT interval, which reflects ventricular repolarization. As shown by the examples, the QT interval was shorter in male C57BL/6 mice treated with DHT compared to control male C57BL/6 mice. The lower panel of Figure 8 presents mean data for QT, QTc and heart rate and shows that QTc intervals were significantly shorter in the DHT-treated group compared to the controls.

DISCUSSION

Summary of main findings

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

Choice of the mouse strains

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

(2- to 3- and 4- to 5-month-old animals), this strain represented a better model to study the effect of low level of androgen on ventricular repolarization.

Relation to Previous Studies

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

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

Very recently, another study examining gender difference in mouse ventricle was published by Brunet *et al.* [7]. In line with our results, they reported that I_{Kur} (or

$I_{K_{slow,1}}$) was smaller in CD-1 females. However, as opposed to our findings, they were unable to detect sex difference in the expression levels of Kv1.5. This inconsistency could possibly be due to different experimental conditions. The present paper, however, provides strong evidence for the up-regulation of Kv1.5 by androgens. Indeed, both castrated CD-1 and normal C57BL/6 displayed higher expression of Kv1.5 when they were treated with DHT. This is consistent with the well-known genomic action of androgens [16]. Of note, 14 out of 15 consecutive nucleotides of the androgen response element (ARE) are present in the 5'-flanking region of the mouse Kv1.5 coding region [18]. Therefore, our observation showing that male CD-1 mice have high levels of androgens compared to females and present higher Kv1.5 density than females is in accordance with these observations.

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

Male sex hormones concentrations

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

An important factor that has to be considered when measuring sex hormones is the age of the animal. Different groups have studied the effect of age on testosterone levels in mice. Krishnamurthy *et al* [13] studied wild-type CSV129 male mice from postnatal day 7 to 70. Testosterone levels were already substantial at day 7, stayed stable until day 35, reached a peak at day 42, returned to similar baseline mean testosterone levels at days 56 and 63 before reaching another peak at day 70. This study shows that for a given strain of mice, under similar experimental conditions, there are week-to-week fluctuations in testosterone levels, even during adulthood period. Jones *et al* [12] studied two groups of male C57BL/6 mice with mean age of 74 and 151 days old. Mean testosterone levels were higher in the older group but there was no mention whether or not this difference was statistically significant. Finally, Shapiro *et al.* [23] showed that testosterone levels were similar between mature male CD1 mice (98 days) and old mice (515 days). In keeping with this last study we found no difference in testosterone or DHT levels between 2- to 3-month-old and 4- to 5-month-old male CD-1 mice (data not shown). Similarly, the testosterone and DHT values of the C57BL/6 male mice were also comparable between the two age groups.

Effect of estrogen on cardiac repolarization

The present study focused on the regulation of $I_{K_{ur}}$ by male sex hormones based on the observation that the gender difference observed in this current was abolished following castration. However, female sex hormones have also been implicated in the regulation of K^+ currents in a variety of tissues including uterus, smooth and cardiac muscles [2,24,28]. Most of the studies focusing on cardiac K^+ channels show that acute administration of estrogen decreased K^+ current density [2,27]. This inhibitory effect of estrogen has been reported for the transient outward (I_{to}) [2] and the slow delayed rectifier (I_{Ks}) K^+ currents [27]. Theoretically, this action of estrogen could contribute to explain why females have longer cardiac repolarization than males. However, the concentration of estrogen used to elicit such effect exceeded the physiological concentration range. Furthermore, results from our group and others

laboratories demonstrated that mouse and rat I_{to} display no gender difference [7,14,25]. In addition to its fast action, long-term effects of estrogen on cardiac repolarization have also been studied. Saba *et al* [22] studied the effect of ovariectomy and estrogen treatment on mouse ECG parameters. Neither ovariectomy nor estrogen administration affected QT interval. Another group reported prolongation of QT interval and APD in a transgenic mice model lacking estrogen receptors (ERKO) [11]. The authors suggested that this prolongation was due to increased Ca^{2+} currents but no study was undertaken to verify the implication of K^+ currents in this phenotype. In summary, estrogens are potential regulators of cardiac repolarization but more studies are required to delineate their functional roles.

Limitations of the study

This study provides important information about gender and strain differences in cardiac repolarization of murine models. However, the fact that mouse and human ventricles share some but not all components of repolarizing K^+ currents may prevent direct extrapolation of these findings to the human situation. Indeed, although I_{Kur} is an important repolarizing K^+ current in mouse ventricular myocytes, this current is prominent in atrial but not in ventricular myocytes of humans. Nevertheless, these studies are relevant for many reasons. First, similar to human, mouse displays gender differences in ventricular repolarization. Moreover, mouse cardiac K^+ currents/channels can be regulated by variations in male sex steroid hormones levels and as mentioned earlier, growing clinical evidence also suggests that androgens regulate cardiac repolarization in humans. Thus, the mouse could be viewed as a useful model to study the general mechanisms of sex-related differences in cardiac repolarization. Furthermore, access to transgenic mice that lack sex steroid hormones receptors provides a valuable tool to further study the actions of these hormones and receptors on cardiac repolarization. It is also possible that in humans, the density of different repolarizing K^+ currents such as I_{Kr} and I_{Ks} may be similarly modified by sex steroid hormones. On that matter, ongoing studies in our laboratory are aimed at exploring the cellular and molecular mechanisms underlying gender difference in human repolarization.

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

REFERENCES

1. Bartke A. Increased Sensitivity of Seminal Vesicles to Testosterone in a Mouse Strain with Low Level of Testosterone. *J Endocrinol* 1974;60:145-8.
2. Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I, Weis TM. Effects of 17 β -estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naun Schmied Arch Pharmacol* 1997;356:788-96.
3. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E et al. Sex difference on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am heart J* 2000;140:678-83.
4. Braunstein B. Testes. In: Appleton & Lange, ed. *Basic & Clinical Endocrinology*, Norwalk, CT 1994:391-402.
5. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional Properties of K⁺ Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. *J Physiol (Lond)* 2004. Published online as 10.1113/jphysiol.2004.063446.
6. Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol (London)* 2003;546:403-13.
7. Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D et al. Heterogeneous Expression of Repolarizing, Voltage-gated K⁺ in Adult Mouse Ventricles. *J Physiol (Lond)* 2004;103-20.

8. Drici MD, Baker L, Plan P, Barhanin J, Romey G, Salama G. Mice Display Sex Differences in Halothane-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* 2002;106:497-503.
9. Fiset C, Clark RB, Larsen TS, Giles WR. A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond)* 1997;504:557-63.
10. Hara M, Danilo PJr, Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1068-72.
11. Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol* 1997;110:135-40.
12. Jones R, Pugh P, Hall J, Channer K, Jones T. Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *European Journal of Endocrinology* 2003;148:111-20.
13. Krishnamurthy H, Babu PS, Morales CR, Sairam MR. Delay in Sexual Maturity of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Knockout Male Mouse. *Biology of Reproduction* 2001;65:522-31.
14. Leblanc N, Chartier D, Gosselin H, Rouleau JL. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol (Lond)* 1998;511:533-48.
15. Lehmann MH, Timothy KW, Frankovich D, Fromm BS, Keating M, Locati EH et al. Age-gender influence on the rate-corrected interval and the QT-heart rate

- relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:93-9.
16. Litwack G, Schmidt TJ. Biochemistry of hormones II: Steroid hormone. In: Devlin TM, ed. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, New York: Wiley-Liss, 1997:893-918.
 17. Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL et al. In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovasc Res* 2003;57:28-36.
 18. London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ et al. Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* 2001;88:940-6.
 19. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 1998;274:H747-51.
 20. Pham TV, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Danilo PJr, Rosen MR. Testosterone diminishes the proarrhythmic effects of dofetilide in normal female rabbits. *Circulation* 2002;106:2132-6.
 21. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992;8:690-5.

22. Saba S, Zhu W, Aronovitz MJ, Estes III NAM, Wang PJ, Mendelsohn ME et al. Effects of Estrogen on Cardiac Electrophysiology in Female Mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:276-80.
23. Shapiro BH, Niedermeyer TM, Babalola GO. Serum Androgen Levels in Senescent Cr1:CD-1(IRC)BR Mice: Effects of Castration and Testosterone Treatment. *Journal of Gerontology* 1989;44:B15-9.
24. Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei M, Olcese R et al. Remodeling of Kv4.3 Potassium Channel Gene Expression under the Control of Sex Hormones. *J Biol Chem* 2001;276:31883-90.
25. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89:437-44.
26. Valverde ER, Biagetti MO, Bertran GR, Arini PD, Bidoggia H, Quinteiro RA. Developmental changes of cardiac repolarization in rabbits: Implications for the role of sex hormones. *Cardiovasc Res* 2003;57:625-31.
27. Waldegger S, Lang U, Herzer T, Suessbrich H, Binder K, Lepple-Wienhues A, Nagl U et al. Inhibition of minK protein induced K^+ channels in *xenopus* oocytes by estrogens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996;354:698-702.
28. White RE, Darkow DJ, Falvo Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995;77:936-42.
29. Wu Y, Anderson ME. Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice. *Cardiovasc Res* 2002;53:763-69.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

FIGURES AND LEGENDS

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

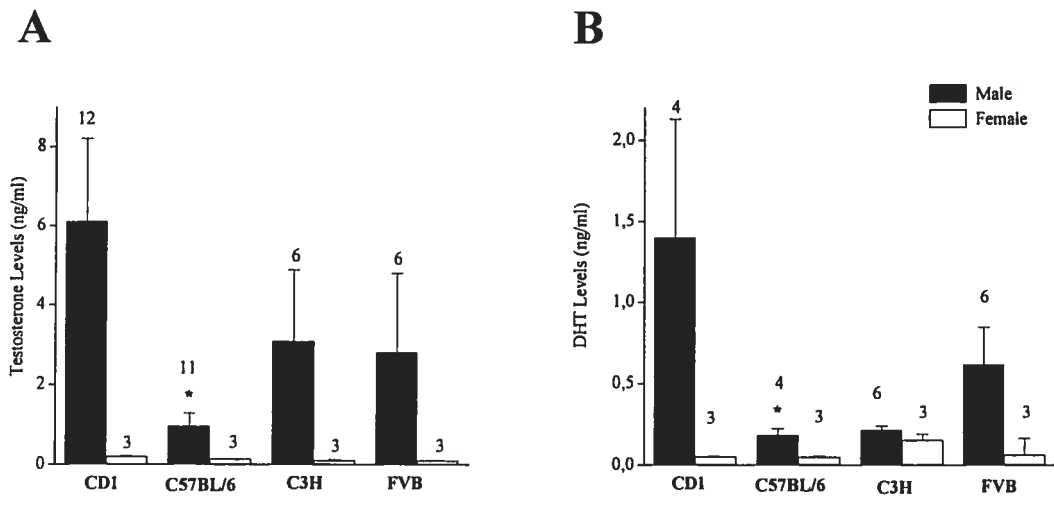


Figure 1

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

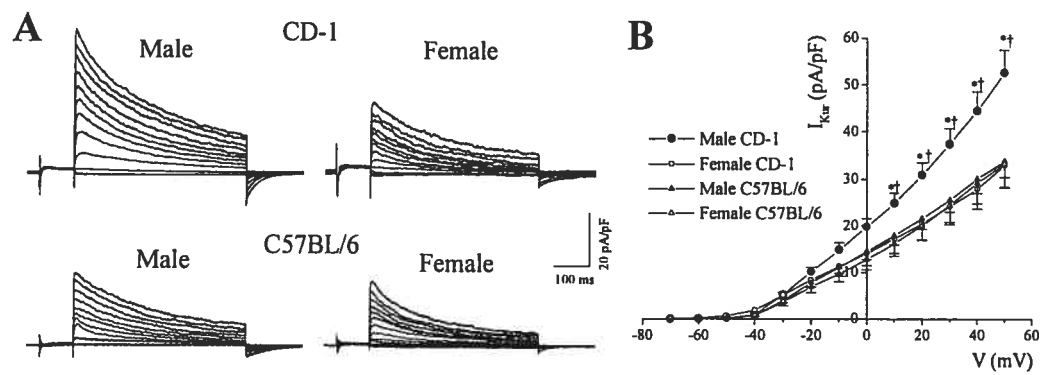


Figure 2

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

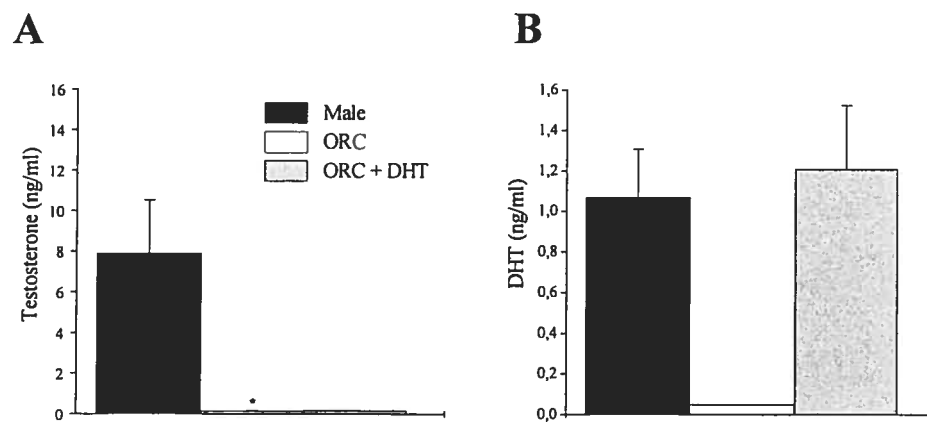


Figure 3

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

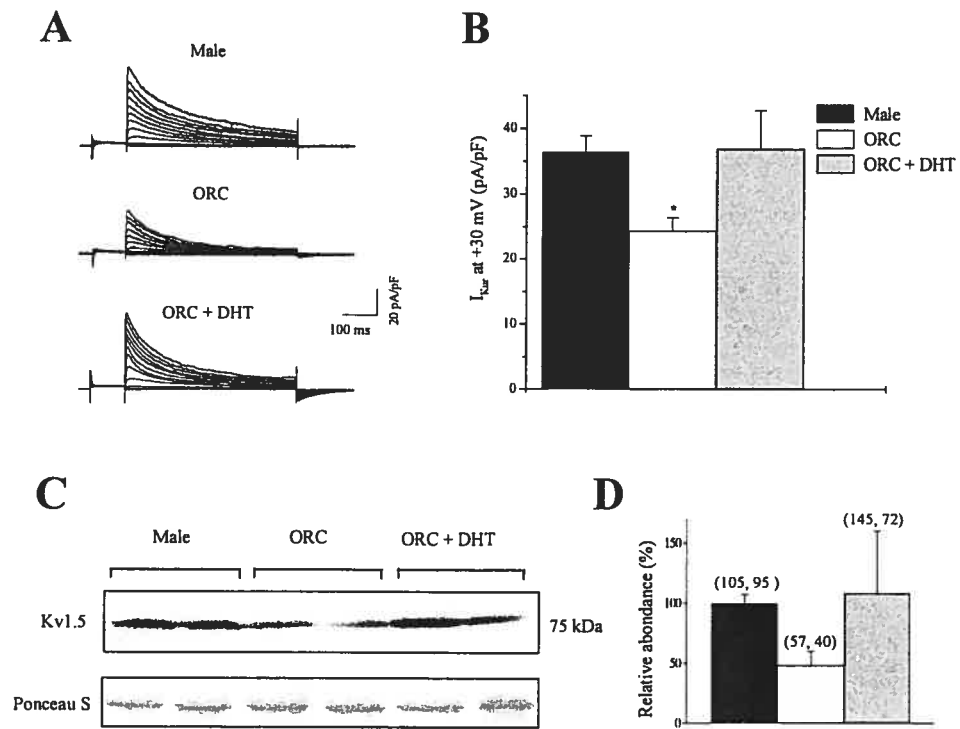


Figure 4

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

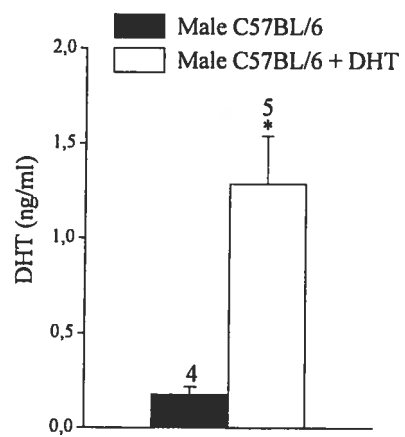


Figure 5

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

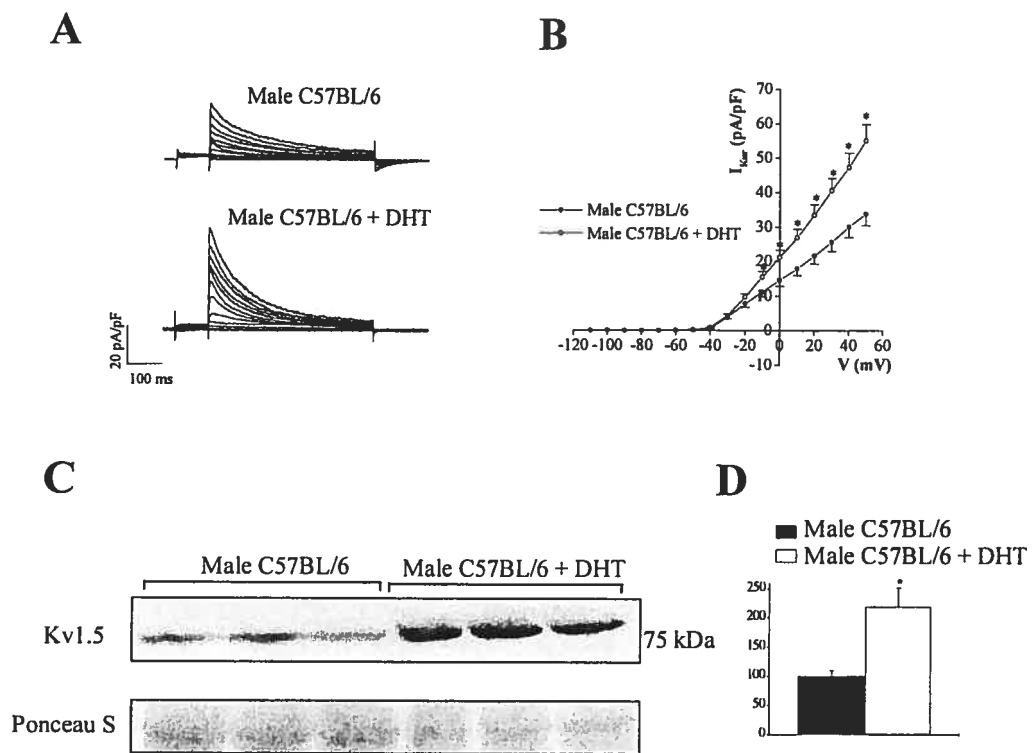


Figure 6

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

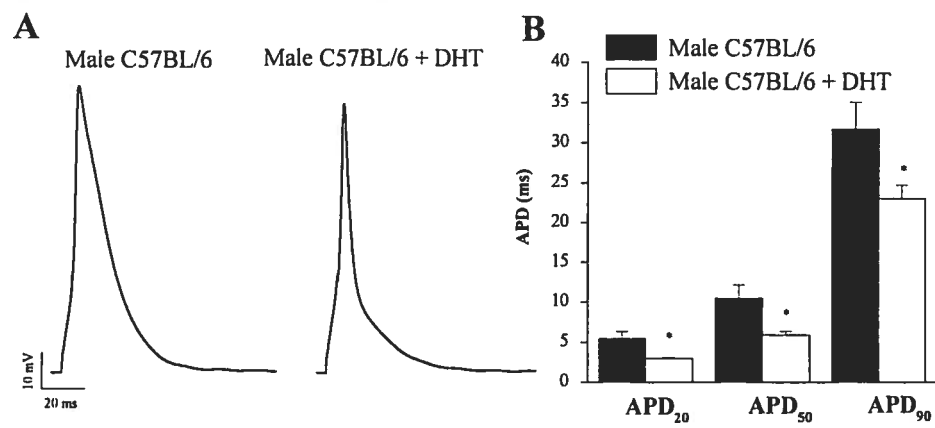


Figure7

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

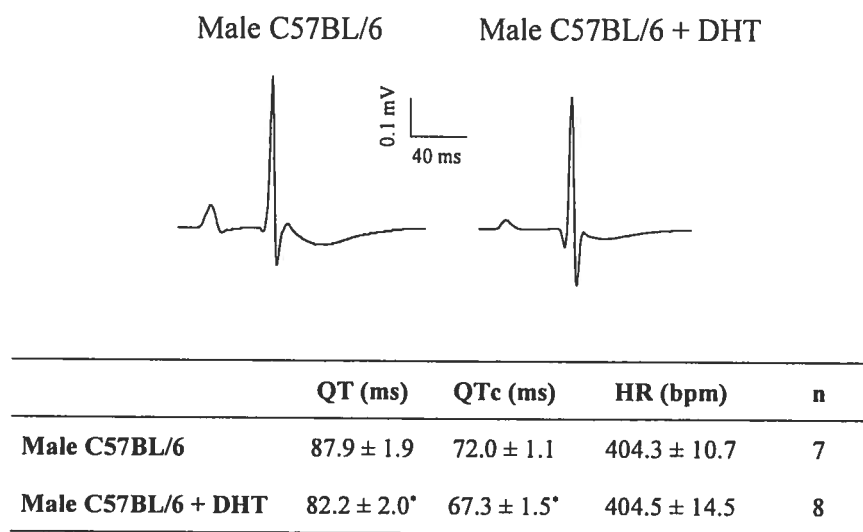


Figure 8

CHAPITRE 5 Caractérisation de la repolarisation cardiaque du cœur de cobayes mâles et femelles

La souris nous a permis d'étudier le mécanisme général responsable des différences reliées au sexe dans l'électrophysiologie cardiaque. Les études présentées dans les deux derniers chapitres démontrent clairement que les androgènes régulent I_{Kur} , le courant responsable de la différence mâle/femelle au niveau de la repolarisation ventriculaire. Nous étions alors intéressés à savoir si une régulation analogue s'opérait pour les courants I_{Kr} et I_{Ks} , retrouvés chez l'humain. Tel que mentionné dans l'introduction, nous avons choisi le cobaye pour l'étude de ces courants. Puisque la caractérisation mâle/femelle de la repolarisation du cobaye n'avait jamais été rapportée, nous avons effectué l'étude suivante.

**CHARACTERIZATION OF CARDIAC REPOLARIZATION IN MALE AND FEMALE
GUINEA PIG**

Judith Brouillette,^{1,2} Marie-Andrée Lupien^{1,2} Chantale St-Michel,^{1,2} Céline Fiset,^{1,2}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute

² Faculty of Pharmacy, University of Montreal
Montréal, Québec, Canada

Running Title: Absence of sex-related difference in guinea pig repolarization


Corresponding author: Dr. Céline Fiset

Research Center, Montreal Heart Institute

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

Phone : (514) 376-3330 (ext. 3025)

FAX : (514) 376-1355



INTRODUCTION

Women have longer QTc interval than men and are more prone to develop torsades de pointe in various settings of QT prolongation [1-4]. The mechanisms responsible for these sex differences are still largely unknown [5]. Results obtained from animal studies strongly suggest that sex hormones alter cardiac repolarization [6-9]. Nonetheless, direct extrapolation of these experimental data to human is not really practicable since all animal models studied have limitations. For instance, mouse and rat share some but not all components of human repolarizing K⁺ currents. Specifically, the rapid and the slow components of the delayed rectifier K⁺ current, I_{Kr} and I_{Ks}, implicated in the long QT syndrome do not play a significant role in these adult rodents [10,11]. On the other hand, rabbits and dogs express delayed rectifiers (I_K) [12] in their ventricles but these species have other important limitations. Rabbits, for instance, are coitus-induced ovulators and have very low levels of female sex hormones [13]. Although rabbit expresses the rapid component of I_K, the physiological contribution of the slow component (I_{Ks}) is probably limited in rabbit ventricle. Furthermore, in rabbit, the molecular basis of the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current (I_{to}) is different than that in human. Finally, female dogs have an estrus cycle of 6 months that comprises a period of anoestrus of 3-4 months in which all female sex hormones are very low [14]. Equally important, access to a homogeneous population of dogs is not always feasible and renders group comparison rather difficult. Surprisingly, very few studies have focused on sex-related differences in the electrophysiological properties of guinea pig, a species that expresses functional I_{Kr} and I_{Ks} [15,16] and in which females have an estrus cycle with anoestrus period lasting only few days [17]. However, while possessing these important characteristics, it is important to mention that guinea pigs lack I_{to}, reinforcing the notion that no animal model is perfect. However, this species appears as a valuable tool to gain considerable information on the contribution of I_{Kr} and I_{Ks} in sex-related difference of cardiac repolarization.

Accordingly, the aim of the present study was to establish whether there are sex differences in cardiac repolarization in adult guinea pig ventricle by measuring whole-cell K⁺ currents, K⁺ channels expression, action potential duration (APD) and

QTc intervals. Results presented here clearly demonstrate that adult guinea pig do not display sex-related differences in cardiac repolarization.

METHODS

Animals

Sexual maturity is reached differentially in male and female guinea pigs. Female guinea pigs can reproduce as early as 5 weeks of life while males have fertile sperms only at 9 weeks of age. According to the Canadian Council on Animal Care, ideal coupling time starts between 2 and 3 months and is optimal until 2 years of age [17]. Thus, we decided to study male and female guinea pigs between 13 and 17 weeks of age. Male and female guinea pigs weighted in average 764 ± 16 g (n=56) and 701 ± 11 g (n=47), respectively ($p < 0.005$).

Myocytes isolation

In accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health, animals were heparinized (1 U/kg; ip), anaesthetized by an injection of pentobarbital (38 mg/kg; ip) and then sacrificed by cervical dislocation. The hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused through the aorta using a modified Langendorff apparatus at a flow rate of 12 ml/min. The following solutions maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ were applied: (i) HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1.8 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 ; 0.33 Na_2HPO_4 ; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH) for 5 min; (ii) nominally Ca-free Tyrode solution for 5 min; (iii) Tyrode solution containing 300 U/ml collagenase type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA); 0.5 U/ml protease type XIV (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA), 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA); 20 mM taurine and 200 μM CaCl_2 for 7 min; and (iv) Tyrode solution containing 0.1% BSA; 20 mM taurine and 200 μM CaCl_2 for the final 5 min. At the end of the perfusion period, the lower half of the heart was removed from the perfusion system. The left ventricular free wall was isolated and removed of its papillary muscles before being cut into small pieces in a "KB" solution [18] containing (in mM): 100 K-glutamate; 10 K-aspartate; 25 KCl; 10 KH_2PO_4 ; 2 MgSO_4 ; 20 taurine; 5 creatine; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA; 20 glucose (pH

adjusted to 7.2 with KOH). The ventricular pieces were shaken gently for 5 minutes until dissociation into rod-shaped single myocytes. Isolated myocytes were given 15 minutes to deposit and were then resuspended in “KB” solution before being stored at 4°C until use.

Electrophysiological recordings

I_{Kr} was defined as the 5 μM E-4031-sensitive tail current elicited upon return to -40 mV after test pulses to various voltages from -30 mV to +60 mV (225 ms duration, 10 mV increments). I_{Ks} was defined as the 0.1 μM HMR1556-sensitive current elicited by 3.5 s voltage steps ranging from -30 to +50 mV at 0.033 Hz. The inward rectifier K^+ current (I_{K1}) was measured as the 1 mM BaCl_2 -sensitive current elicited by 500 ms voltage steps ranging from -110 to +50 mV at 0.3 Hz. The holding potential used to record these 3 K^+ currents was -80 mV. To avoid contamination by Na^+ and Ca^{2+} currents, voltage-clamp protocols for the measurement of I_{Kr} and I_{Ks} were preceded by a 100 ms inactivating step to -40 mV and myocytes were superfused with Tyrode solution containing 100 μM cadmium chloride. Action potential were recorded in absence of Ca^{2+} channel blocker at various frequencies ranging from 0.1 to 4 Hz by injecting suprathreshold current pulses through the patch-clamp pipette. I_{Kr} and I_{Ks} were recorded using the ruptured configuration while I_{K1} and action potentials were recorded using perforated patch-clamp technique. All recordings were obtained at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Cell capacitances were calculated by integrating the current elicited by a 10 ms voltage step from +30 to +40 mV. This choice of voltage prevented contamination of the capacitive current by the inward rectifier K^+ current I_{K1} . Whole-cell capacitances were similar between male (87 ± 6 pF, $n=38$) and female (87 ± 7 pF, $n=27$; $p=0.9$) ventricular myocytes. All current amplitudes were normalized to the cell capacitance and expressed as densities (pA/pF).

Whole-cell voltage and current recordings were made using a patch-clamp amplifier (AXOPATCH 200B, Axon Instruments, Foster City, USA). Pipettes were made from borosilicate glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL., USA), and had resistances in the range 1.5-4 M Ω when filled with the following solutions (mM):

110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 4 K₂ATP and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with KOH) for ruptured patch-clamp experiments and 110 K⁺-aspartate, 28 KCl, 8 NaCl and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with KOH) for perforated patch-clamp experiments. Perforated patch-clamp was performed using nystatin (350 µg/ml). Series resistance (R_s) compensation was applied to reduce R_s by 70-80%. Data were corrected for a liquid junction potential of -10 mV. Voltage-clamp currents were low-pass filtered with a 4-pole Bessel analog filter, digitized and stored in a microcomputer using PCLAMP 8.0 software (Axon Instruments, Foster City, USA).

Western blots

Sarcolemmal-enriched proteins were prepared from the left ventricular free wall from guinea pigs of both sexes (3 guinea pigs/group) as previously described [8]. Proteins (100 µg) were separated on 5-15% SDS-PAGE, transferred overnight at 90 mA on PVDF membranes (Millipore, U.S.A) and blocked in TBS (KvLQT1, Kir2.1 and minK) or PBS (HERG) buffer containing 0.1% Tween 20 (TBSt, PBSt) supplemented with 5% non-fat dried milk (NFDM) for 90 min at room temperature (RT). Membranes were then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal primary antibodies directed against HERG, minK, Kir2.1 (Alomone Labs, Israel) and KvLQT1 (Chemicon, U.S.A). After washing 3 times for 10 min with TBSt or PBSt 0.1% / 5% NFDM, membranes were incubated with secondary antibody (anti-rabbit-HRP conjugated IgG) for 3 hours at RT under agitation. Membranes were then washed 3 times for 10 minutes with TBSt or PBSt 0.1% before being treated with chemiluminescent substrate and exposed to autoradiography film.

Surface ECG recordings

Guinea pigs were anaesthetized with pentobarbital (i.p.). Platinum electrodes were positioned under the skin and lead II surface ECGs were acquired using the EMKA System (EMKA Technologies, France) at a rate of 2 kHz. Body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. QT intervals were corrected (QT_c) for heart rate using the Bazett formula $QT_c = QT/(RR)^{1/2}$ that has been reported to be the

most appropriate formula for correcting QT intervals of anaesthetized guinea pigs [19].

Langendorff perfusion

Experiments were performed as previously described [20]. Hearts were retrogradely perfused through the aorta at a constant perfusion pressure of 75 mm Hg with a Krebs-Henseleit buffer at 37°C and constantly gassed with 95% O₂/ 5% CO₂ containing (in mM) 11.2 glucose, 118.5 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 2.45 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 2 CaCl₂. An epicardial ECG was obtained by placing one silver electrode at the base of the heart under the right atrium and another in the apex of the left ventricle. After a 30 min-equilibration perfusion period with a Krebs-Henseleit buffer, the hearts were perfused for 10 min with 5 μM E-4031 to block I_{Kr}. HMR1556 (0.1 μM) was then added to the perfusion solution for an additional 10 min. ECG measurements were continuously recorded during the duration of the protocols and RR, PR, QRS and QT intervals were measured at the end of the perfusion periods. The Fridericia formula $QT_c = QT/(RR)^{1/3}$ was used for correcting QT for RR interval [21]. In a series of experiments, the sequence of the drug administration was inverted to determine whether the initial duration of the QT interval had any influence on the ability of the drugs to exert their effects.

Drugs

HMR1556 (a gift from Aventis Pharma) was dissolved in DMSO as 1 mM stock solution and diluted in the buffer to achieve a final concentration of 0.1 μM. The final concentrations of DMSO (0.01%) had no significant effects on the current traces and ECG parameters. E-4031 (Wako Chemicals USA Inc.) and all other drugs were prepared in distilled water before being diluted with control solutions.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Paired and unpaired Student t-test as well one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post test were used when appropriate. The results were considered statistically significant when P-values were smaller than 0.05.

RESULTS

K⁺ currents

Figure 1A presents examples of I_{Kr} currents recorded in ventricular cells isolated from guinea pigs of both sexes. These tail currents, recorded following a voltage step at +30 mV, were completely abolished by 5 μ M E-4031. As shown on Figure 1B, the mean I-V relationships for the E-4031-sensitive I_{Kr} tail currents were similar between male and female guinea pig ventricular cells. Figure 1C compares the deactivation of I_{Kr} between the two groups. The mean deactivation time constants were comparable between both groups.

Figure 2A illustrates representative examples of the HMR1556-sensitive I_{Ks} currents obtained in male and female ventricular cells. Figures 2B and 2C show that the I-V relationships of the time-dependent (step) current as well as that of the tail current were similar between both groups. In addition, no sex difference was observed in the deactivation of I_{Ks} as illustrated by the averaged values of the I_{Ks} deactivation time constant for both groups (Fig. 2D).

We also compared I_{K1} density in male and female guinea pig ventricular myocytes. Figure 3A presents examples of I_{K1} recorded in male and female myocytes. Figure 3B presents mean data for I_{K1} measured at the end of the 500 ms activation steps. The densities of the inward and outward portions were similar between both groups. In line with these results, there was no sex-related difference between in the resting membrane potentials of males (-83.9 ± 0.5 mV, $n=38$) and females (-84.7 ± 0.5 mV, $n=27$; $p=NS$). We also used a ramp voltage-clamp protocol from +30 to -110 mV to record instantaneous I_{K1} and found no sex difference for the inward and outward portions of I_{K1} (data not shown).

Protein expression of K⁺ channels

We compared the protein expression levels of the following K^+ channels responsible for the currents described above: ERG (I_{Kr}) [22], KvLQT1 and minK (I_{Ks}) [23,24] and Kir2.1 (I_{K1}) [25,26]. Consistent with the electrophysiological results, data

presented in Figure 4 show that the protein expression levels of all the K^+ channels studied were similar between male and female guinea pig ventricles.

Action potential duration

We recorded action potentials at five different frequencies to compare cellular repolarization between males and females. Figure 5A presents action potentials recorded at 4 Hz in myocytes isolated from male and female guinea pigs. Figure 5B depicts mean APD measured at 90% of repolarization for the entire frequency range studied. This graph shows that no sex difference was observed in the duration or the rate dependence of action potentials. Similar results were also obtained when APD were measured at 50% of repolarization (data not shown). The absence of sex differences in the rate-dependence of the APD was also consistent with the results of the voltage-clamp experiments showing that I_{Ks} was similar between male and female ventricular myocytes.

QT intervals

To compare QT intervals between males and females, surface ECG were performed on anaesthetized guinea pigs. Consistent with APD recorded in isolated ventricular myocytes, the QTc intervals measured in male guinea pigs were comparable to those of females (Fig. 6). The heart rate as well as all the other ECG parameters studied were also similar between both groups.

Langendorff-perfused heart

The next series of experiments were performed to further explore the impact of I_{Kr} and I_{Ks} at the whole heart level, i.e., on the ECG marker of repolarization, the QT interval. To do so, we used a Langendorff-perfused heart preparation rather than anaesthetized guinea pigs since desired drug concentrations could be much more easily achieved in isolated heart preparation.

Epicardial ECGs were recorded on Langendorff-perfused hearts isolated from male and female guinea pigs. Hearts were perfused with physiological solution (Krebs-Henseleit; KH) for the first 30 min, with KH containing 5 μ M E-4031 for the following 10 min and with KH supplemented with 5 μ M E-4031 plus 0.1 μ M

HMR1556 for the final 10 min of the perfusion. Figure 7A presents the averaged QTc intervals durations obtained under these conditions. E-4031 prolonged QTc intervals to a similar extent in males ($24\pm 3\%$, $n=13$) and females ($28\pm 4\%$, $n=11$, $p=0.4$). The combination of HMR1556 caused an additional increase in QTc intervals. Then again, this prolongation was not different between males ($17\pm 2\%$, $n=13$) and females ($15\pm 3\%$, $n=11$; $p=0.8$). We performed a second set of experiments in which the HMR1556 was administered first and then combined with E-4031. Findings obtained in these experiments indicate that the order of drug administration did not impact on the extent of prolongation produced by either drugs. For example, in males E-4031 induced a $24\pm 3\%$ increase from baseline and a $25\pm 3\%$ increase when the drug was administered in presence of HMR1556 ($p=0.8$). On the other hand, HMR1556 administered alone produced a $12\pm 3\%$ increase from baseline and a $17\pm 2\%$ increase when the drug was added to E-4031 ($p=0.3$). Bar graphs presented on Figure 7B show the cumulative data obtained from all these experiments. As illustrated, in both males ($n=21$) and females ($n=19$), the I_{Kr} and I_{Ks} blockers caused a significant prolongation of QTc intervals. Moreover, the increase induced by the I_{Kr} blocker was more pronounced compared to that produced by a block of I_{Ks} .

Figure 8 shows the impact of I_{Kr} and I_{Ks} block on the heart rate and reveals that both E-4031 and HMR1556 significantly reduced the heart rate. However, as illustrated in Figure 8B, the decrease in heart rate by HMR1556 (males: $-8\pm 1\%$, $n=21$; females: $-9\pm 2\%$, $n=19$) was less important than that of E-4031 (males: $-18\pm 2\%$, $n=21$; females: $-16\pm 2\%$, $n=19$). Furthermore, there was no sex-based difference in the effect of both drugs on the heart rate. It should be noted that no significant time-dependent changes were observed in QTc intervals or HR during the course of these experiments as illustrated by the control experiments presented on Figures 7 and 8.

DISCUSSION

Summary of main findings

By combining electrophysiological, pharmacological and molecular approaches, we provided compelling evidence demonstrating that adult guinea pigs do not display sex differences in ventricular repolarization. Despite the fact that guinea pigs share important repolarizing currents with humans, the absence of sex differences in ventricular repolarization implies that the guinea pig may not be a suitable model to study sex difference in cardiac repolarization.

Effects of I_{Kr} and I_{Ks} blockers on QT interval

The fact that both E-4031 and HMR1556 induced a significant prolongation of QTc intervals confirms that I_{Kr} and I_{Ks} are both important repolarizing currents in guinea pigs under baseline conditions. In different species, I_{Ks} is often viewed as a reserve current that comes into play only in settings of QTc prolongation. This does not appear to be the case in guinea pigs since perfusion of HMR1556 under baseline conditions or after exposure to E-4031 produced similar QTc prolongations. These findings are consistent with previous reports showing that blockade of I_{Ks} causes APD prolongation in guinea pig ventricles [27]. Furthermore, it is known that in guinea pig ventricular cells, I_{Ks} and I_{Kr} activate to equivalent magnitude during a 225-ms pulse to 0 mV [15]. Thus in the time course of guinea pig cardiac action potential both components of I_K play a significant role in repolarization.

Effect of I_{Kr} and I_{Ks} blockers on heart rate

E-4031 significantly lowered heart rate in both male and female guinea pigs, confirming the role of I_{Kr} in SA node function [28-31]. This characteristic has potentially clinical implications. Several drugs known to block I_{Kr} can induce torsades de pointe due to delayed ventricular repolarization. Furthermore, bradycardia may also predispose to acquired long QT syndrome and torsades de pointe. The effect of I_{Kr} blockers on two independent risk factors of torsades de pointe may contribute to increase the likelihood of these drugs to induce this ventricular arrhythmia.

The fact that HMR1556 also decreased the heart rate is consistent with previous reports demonstrating that I_{Ks} is important in controlling membrane repolarization of guinea pig SA node cells [32-35]. In the present study, we did not observe any sex difference in the effect of the I_{Kr} and I_{Ks} blockers on the heart rate, suggesting that these currents are also similar in male and female guinea pig SA node cells.

Relation to previous studies on guinea pigs

To our knowledge, there has been only another study focusing on sex-related differences in guinea pig ventricular repolarization. James *et al.* [36] compared male with female guinea pigs at two different stages of their estrus cycles. The first female group was studied at the time of estrus (day-0) and the other group, 4 days post-estrus (day-4). They observed that both groups of females had a significantly smaller I_{K1} at -120 mV compared to males. On the other hand, females of the day-4 group had smaller I_K tail current than males. They recorded action potentials and found that females in day-0 had longer action potentials compared with the two other groups. Those data are not consistent with our results. Since clinical studies have shown that QT interval do not vary with the phases of the menstrual cycle [37], we did not pay attention at the time of the estrus cycle of the female guinea pigs studied. We cannot, however, exclude a role for the female sex hormones and indeed, undergoing studies in our laboratory focus on the regulation of cardiac repolarization by these sex hormones. However, the fact that we did not separate the females with respect to the phases of their estrus cycle cannot explain the different findings between both studies. For example, in their study, James *et al.* found that I_{K1} was lower in both groups of females indicating that a pooled group of females would have also smaller density of inward I_{K1} compared to males. However, we did not observe any sex difference in this current. Furthermore, we observed no tendency for the females to have longer APD than males. Hence, other factors must explain the discrepancies between the two studies. A difference in the origin of the myocytes studied could contribute to explain these differences since it is now well recognized that spatial heterogeneity of repolarization exists within guinea pig ventricle [16]. To prevent variation due to this

factor, we performed the patch-clamp experiments on a precise cell population: myocytes isolated from the sub-endocardial layer of the apex of the left ventricular free wall. On the other hand, James *et al.* used myocytes isolated from the two ventricles without specification about the endocardial-epicardial nor apex-base localization. Other differences can arise from the fact that they compared weight-matched guinea pigs of 400-500 g whereas we compared age-matched animals of 13-17 week old for reasons already mentioned (Methods). In addition, we chose to compare age-matched guinea pigs to ensure that all animals have reached sexual maturity. For example, a 500 g female (\approx 8-10 weeks) is sexually mature whereas a 500 g male (\approx 6-8 weeks) may not have reached sexual maturity yet. When the age of the animals is controlled, mean body weight differs between the male and female groups. In order to verify if weight can affect ventricular repolarization, we performed a linear correlation between QTc intervals duration and body weight and found no relationship between these two parameters ($R^2=0.002$; $p=0.85$). Thus, the difference in body weight did not invalidate the interpretation of our results. Finally, comparison of the recordings conditions revealed another major difference between the two studies. Indeed, all the currents reported in the present study were “sensitive-current” meaning that specific blockers were used to measure them whereas in the study of James *et al.* this was not the case. In summary, the several differences in the experimental conditions between the two studies may, in part, explain differences in findings.

In a recent study comparing the effects of genistein on intracellular Ca^{2+} regulation in guinea pig, Liew *et al.* [38] reported action potential data in keeping with our own findings. Indeed, similar to what is reported here, Liew *et al.* reported that APD were similar between male and female guinea pig left ventricular myocytes.

Potential Limitations

We performed surface ECG recordings on anaesthetized guinea pigs. Since anaesthetic agents, including pentobarbital, are known to prolong repolarization [39-41], we cannot exclude the possibility that pentobarbital affected differentially males and females and could perhaps masked a sex difference. However, this is rather

unlikely considering that the QTc intervals obtained in the Langendorff studies did not exhibit any sex differences.

Since the sympathetic tone is known to increase the heart rate, the absence of sympathetic stimulation in the Langendorff-perfused guinea pig heart preparations most likely explains the slower heart rate (178 ± 4 , $n=41$) observed compared to that obtained in the surface ECG study (280 ± 10 , $n=20$). Of note, the heart rates measured in the Langendorff-perfused heart preparation were very similar to values reported by Jones *et al.* [42] which showed that the guinea pig intrinsic heart rate (i.e. the rate manifested by the autonomically denervated SA node) was 177 ± 5 bpm.

Guinea pig as a model to study hormonal regulation of cardiac repolarization

Guinea pigs share important repolarizing currents with humans, have similar levels of sex hormones [43,44] and express cardiac receptors for estrogens, progesterone and testosterone (data not shown). Yet, the absence of sex differences in ventricular repolarization reported here implies that the guinea pig may not be a suitable model to study sex difference in cardiac repolarization. On the other hand, if one wishes to study ventricular repolarization without any concern about potential variations due to hormonal regulation or sex-related differences, the guinea pig could become a model of choice.

In the present study, although we found no sex differences in the QTc interval of guinea pigs, we pursued to do a complete characterization of the repolarization profile of male and female guinea pigs not only at the cellular and molecular levels but also at the whole heart level. By doing so, we were able to rule out the possibility that the contribution of I_{Kr} and I_{Ks} was different between sexes. In addition to the outward K^+ currents, we also compared the density of the L-type Ca^{2+} currents between male and female guinea pigs and found no differences between the two groups (data not shown) eliminating the possibility that the balance between inward and outward currents was different between male and female animals. With the pharmacological studies performed on the Langendorff-perfused guinea pig hearts in presence of I_{Kr} and/or I_{Ks} blockers, we explored the impact of these currents at the whole heart level and established that the response to the I_{Kr} and I_{Ks} blockers were not

different between both sexes. These findings clearly substantiate the notion that any animal models used to study sex-related difference in repolarization should also display difference in the QTc interval.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). J. Brouillette is a recipient of a CIHR Studentship. C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The authors are thankful to M.-A. Gillis and R. Clément for technical assistance with the ECG experiments.

REFERENCES

- [1] Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* 1993;270:2590-2597.
- [2] Lehmann MH, Hardy S, Archibald D, Quart B, MacNeil DJ. Sex difference in risk of torsade de pointes with *d,l*-sotalol. *Circulation* 1996;94:2534-2541.
- [3] Locati E, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent M, Lehmann MH *et al*. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital Long-QT syndrome. Findings from the international LQTS registry. *Circulation* 1998;97:2237-2244.
- [4] Reinoehl J, Frankovich D, Machado C, Kawasaki R, Baga JJ, Pires LA *et al*. Probucof-associated tachyarrhythmic events and QT prolongation: importance of gender. *Am Heart J* 1996;131:1184-1191.
- [5] Hashiba K. Sex differences in phenotypic manifestation and gene transmission in the Romano-Ward syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1992;644:142-156.
- [6] Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circ Res* 1996;94:1471-1474.
- [7] Hara M, Danilo PJr, Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1068-1072.
- [8] Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;546:403-413.

- [9] Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 2005;65:148-157.
- [10] Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JG. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 1993;88:93-102.
- [11] Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-798.
- [12] Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525:285-298.
- [13] de Turckheim M, Berger M, Jean-Faucher C, Veyssière G, Jean C. Changes in ovarian oestrogens in plasma gonadotrophins in female rabbits from birth to adulthood. *Acta Endocrinol* 1983;103:125-130.
- [14] Nalbandov AV. *Reproductive Physiology*. San Francisco: W.H Freeman and Company, Inc, 1958.
- [15] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195-215.
- [16] Bryant SM, Wan X, Shipsey SJ, Hart G. Regional differences in the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res* 1998;40:322-331.
- [17] Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: 1984.
- [18] Isenberg G, Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflug Arch* 1982;395:6-18.

- [19] Hamlin RL, Kijawornrat A, Keene BW, Hamlin DM. QT and RR intervals in conscious and anesthetized guinea pigs with highly varying RR intervals and given QTc-lengthening test articles. *Toxicol Sci* 2003;76:437-442.
- [20] Turgeon J, Fiset C, Kingma ML, Lacoursiere L, Kingma JGJ. Influence of indapamide and chlorthalidone on reperfusion-induced ventricular fibrillation in isolated guinea pig hearts. *J Cardiovas Pharmacol* 1995;26:518-23.
- [21] Hamlin RL, Cruze CA, Mittestadt SW, Kijawornrat A, Keene BW, Roche BM *et al.* Sensitivity and specificity of isolated perfused guinea pig heart to test for drug-induced lengthening of QTc. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004;49:15-23.
- [22] Sanguinetti MC. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;81:299-307.
- [23] Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K_vLQT1 and I_{sK} (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 1996;384:78-80.
- [24] Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL *et al.* Coassembly of K_vLQT1 and minK (I_{sK}) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996;384:80-83.
- [25] Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine *Kir2.1* and *Kir2.2* genes. *J Physiol* 2001;533:697-710.
- [26] Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y *et al.* Unique *Kir2.x* Properties Determine Regional and Species Differences in the Cardiac Inward Rectifier K^+ Current. *Circ Res* 2004;94:1332-1339.

- [27] Bosch Ralph F., Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S. Effect of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K^+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1998;38:441-450.
- [28] Shinmura K, Tani M, Hasegawa H, Ebihara Y, Makamura Y. Effect of E4031, a class III antiarrhythmic drug, on ischemia-and reperfusion-induced arrhythmia in isolated rat hearts. *Jpn Heart J* 1998;39:183-197.
- [29] Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR. A rapidly activating delayed rectifier K^+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol* 2004;286:H1757-H1766.
- [30] Verheleijk E, Wilders R, Bouman L. Atrio-sinus interaction demonstrated by blockade of the rapid delayed rectifier current. *Circulation* 2002;105:880-885.
- [31] Verheleijk E, van Ginneken AC, Bourier J, Bouman L. Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circ Res* 2005;76:607-615.
- [32] Anumonwo JM, Freeman LC, Kwok WM, Kass RS. Delayed rectification in single cells isolated from guinea pig sinoatrial node. *Am J Physiol* 1992;262:H921-H925.
- [33] Freeman LC, Kass RS. Expression of a minimal K^+ channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart. *Circ Res* 1993;73:968-973.
- [34] Ono K, Shibata S, Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J Physiol* 2000;524:51-62.
- [35] Matsuura H, Ehara T, Ding W, Omatsu-Kanbe M, Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K^+ current in guinea pig sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol* 2002;540:815-830.

- [36] James AF, Arberry LA, Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol* 2004;99:183-192.
- [37] Burke JH, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Goldberger JJ, Kadish AH. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol* 1997;79:178-181.
- [38] Liew R, Stagg MA, Chan J, Collins P, Macleod KT. Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc Res* 2004;61:66-76.
- [39] Lingamaneni R, Hemmings HCJ. Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors. *Br J Anaesth* 2003;90:199-211.
- [40] Yamakura T, Lewohl JM, Harris RA. Differential effects of general anesthetics on G protein-coupled inwardly rectifying and other potassium channels. *Anesthesiology* 2001;95:144-153.
- [41] Rehberg B, Wittmann M, Urban BW. Sodium channels (from rat, mouse, and man) in neuroblastoma cells and different expression systems have similar sensitivities to pentobarbital. *Neurosci Lett* 1999;264:81-84.
- [42] Jones SA, Lancaster MK, Boyett MR. Ageing-related changes of connexins and conduction within the sinoatrial node. *J Physiol* 2004;560:429-437.
- [43] *Basic & Clinical Endocrinology*. Norwalk: Paramount Publishing Business and Professional Group, Inc, 1994.
- [44] Vaissaire J-P. *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire*. Paris: Imprimerie de Compiègne, Inc, 1977.

FIGURES & LEGENDS

Figure 1. I_{Kr} in male and female ventricular myocytes

A. Currents recorded before and after exposure to 5 μ M E-4031 in myocytes isolated from a male and a female guinea pig. Currents were measured upon repolarization to -40 mV from a test pulse to +30 mV. **B.** Mean I-V relationship of tail currents measured upon repolarization to -40 mV from the indicated membrane potentials in male (n=14) and female (n=8) myocytes. **C.** Time-course of deactivation of I_{Kr} in male and female myocytes. Plot of the time constants (τ) of deactivation against the test pulse potentials. I_{Kr} tail currents were fitted with a single exponential function. Only data obtained from tail currents coupled with activation steps positive to 0 mV are shown since more negative voltages were associated with density of tail currents too small to be fitted.

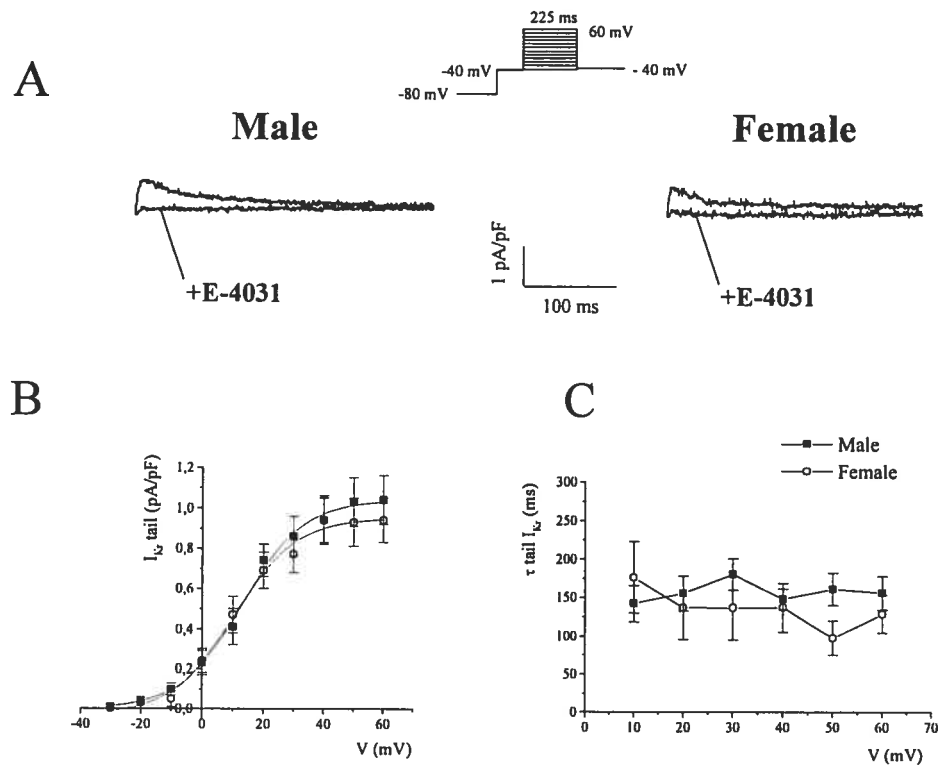


Figure 1

Figure 2. I_{Ks} in male and female ventricular myocytes

A. Typical examples of HMR 1556-sensitive currents (I_{Ks}) recorded in a male and female ventricular myocytes. I_{Ks} currents were recorded at test potentials ranging from -30 mV to +50 mV and upon repolarization to -40 mV. Figure 2B and C show mean I-V relationships of the time-dependent outward current measured at the end of the 3.5 s test pulse and the tail currents recorded at -40 mV in male (n=9) and female (n=7) myocytes. D. Time course of deactivation of I_{Ks} in male and female myocytes. Plot of the time constants of deactivation against the test pulse potentials. Tail currents were fitted with a single exponential function.

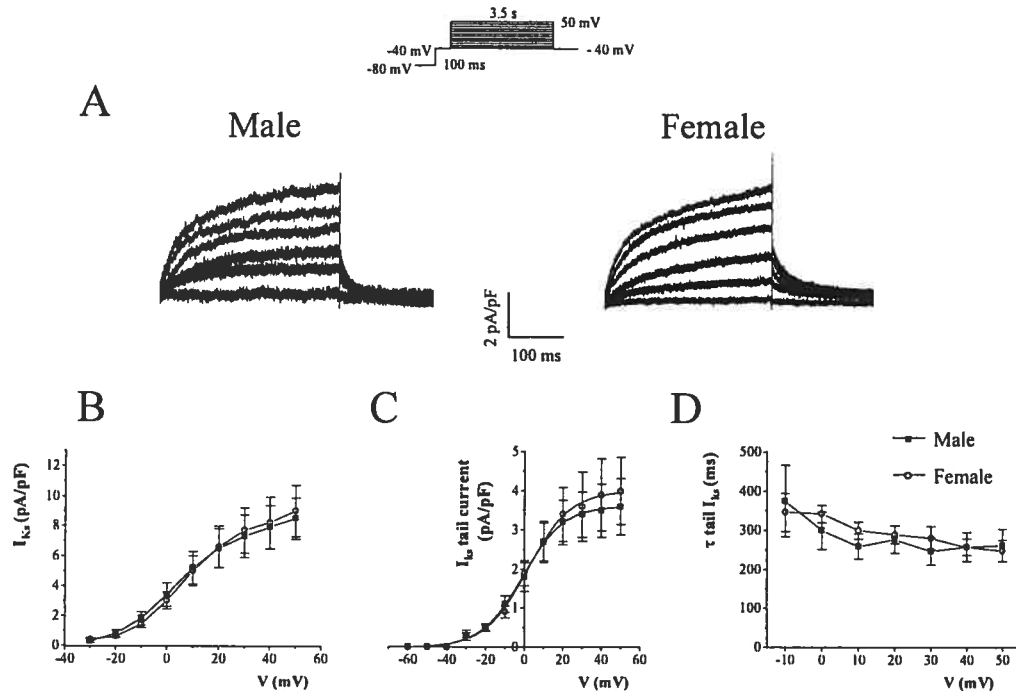


Figure 2

Figure 3. I_{K1} in male and female ventricular myocytes

A. Typical examples of I_{K1} recorded from ventricular myocytes isolated from male and female guinea pig. I_{K1} was measured as the 1 mM Ba^{2+} -sensitive current **B.** Mean I-V relationships for I_{K1} obtained in male (n=15) and female (n=12) ventricular myocytes.

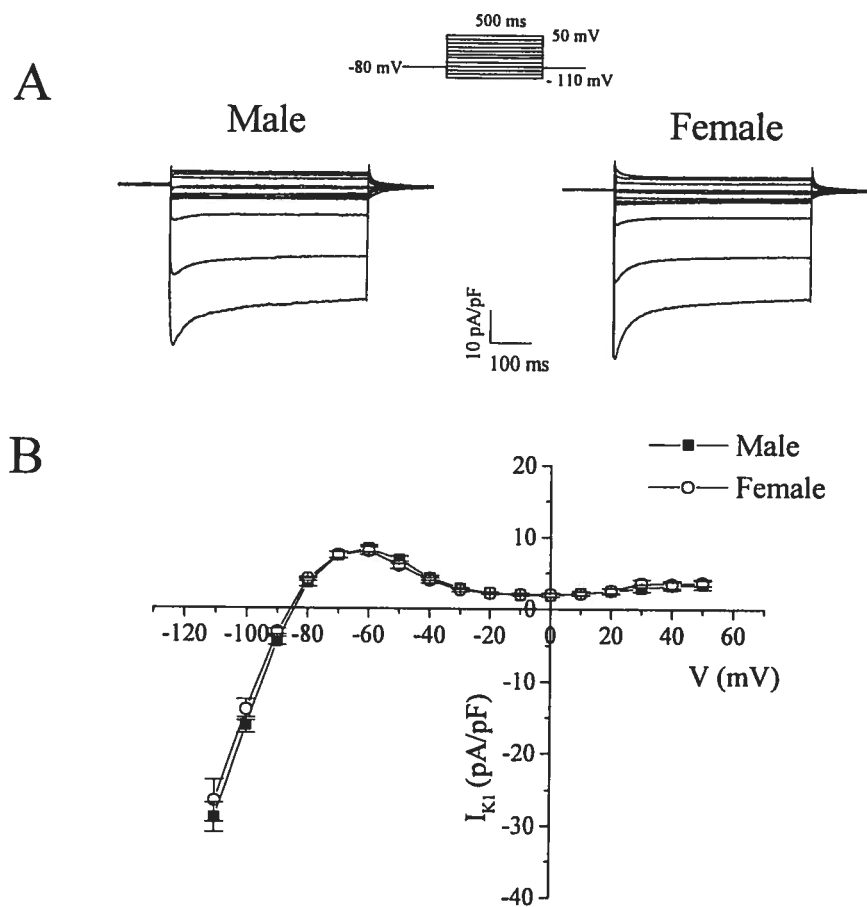


Figure 3

Figure 4. Western blot analysis of different K⁺ channels expression in male and female guinea pig ventricles

Western blot analysis of ERG, KvLQT1, minK and Kir2.1 on sarcolemmal-enriched proteins (100 µg/lane) isolated from male and female guinea pig ventricles. Ponceau S-stained membranes, confirmed equal protein loading. Each group lane contains proteins isolated from one different guinea pig for a total of 3 animals per group.

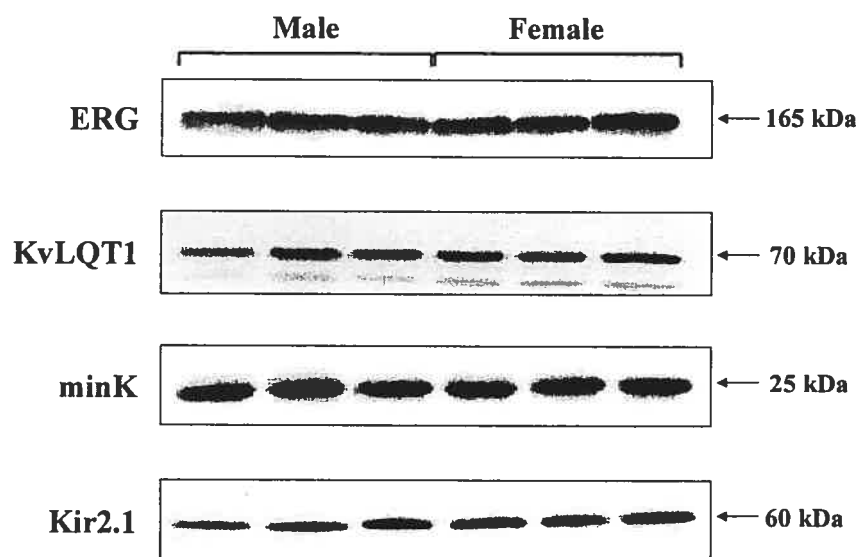


Figure 4

Figure 5. Action potential duration in male and female ventricular myocytes

A. Typical examples of action potential recorded from male and female guinea pig ventricular myocytes at 4 Hz. For the examples shown in this figure, resting membrane potential were -82 mV for the male and -85 mV for the female. **B.** Graph showing the APD (\pm SEM) at 90% repolarization obtained at 0.1, 1, 2, 3 and 4 Hz in male (n=41) and female (n=40) guinea pig myocytes.

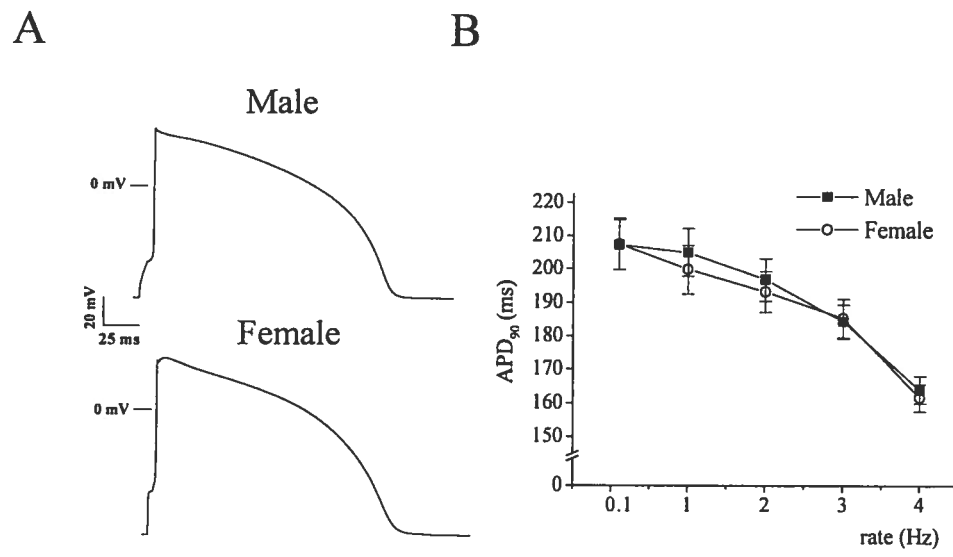


Figure 5

Figure 6. QT interval and other ECG parameters in male and female guinea pigs

A. Examples of lead II surface ECG obtained from male and female guinea pigs. **B.** Table comparing mean RR, PR, QRS, QT and QTc intervals in males and females. « n » corresponds to the number of guinea pigs studied.

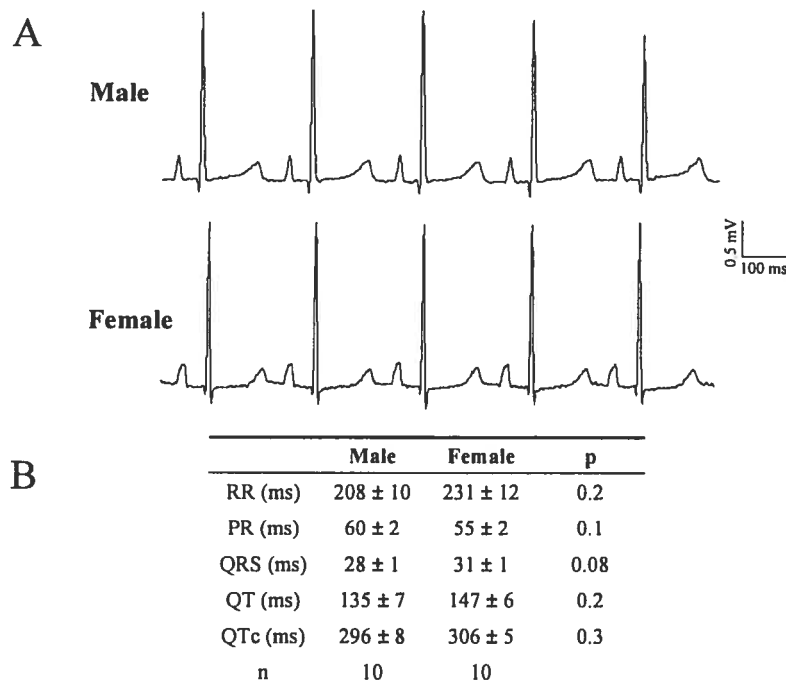


Figure 6

Figure 7: Effect of I_{Kr} and I_{Ks} blockers on the QTc interval in male and female guinea pigs

A. Top – Graph presenting mean QTc (\pm SEM) of isolated hearts of male (n=13) and female (n=11) guinea pigs before and after the application of 5 μ M E-4031 alone or combined with 0.1 μ M HMR1556 (*p<0.001, both drugs vs baseline; **p<0.001, vs E-4031). **Bottom** – Experiment performed under control conditions (heart not exposed to any drugs, except the vehicle) showing no significant variations in the QTc interval during the time course of these experiments. **B.** Bar graphs presenting the cumulative data of E-4031 and HMR1556 on the QTc in male (n=21) and female (n=19) hearts. (*p<0.0001, effect of E-4031 vs control condition; **p<0.005, effect of HMR1556 vs control condition). The effect of E-4031 was greater than that of HMR1556 in both genders (males, †p<0.01; females, †p<0.05).

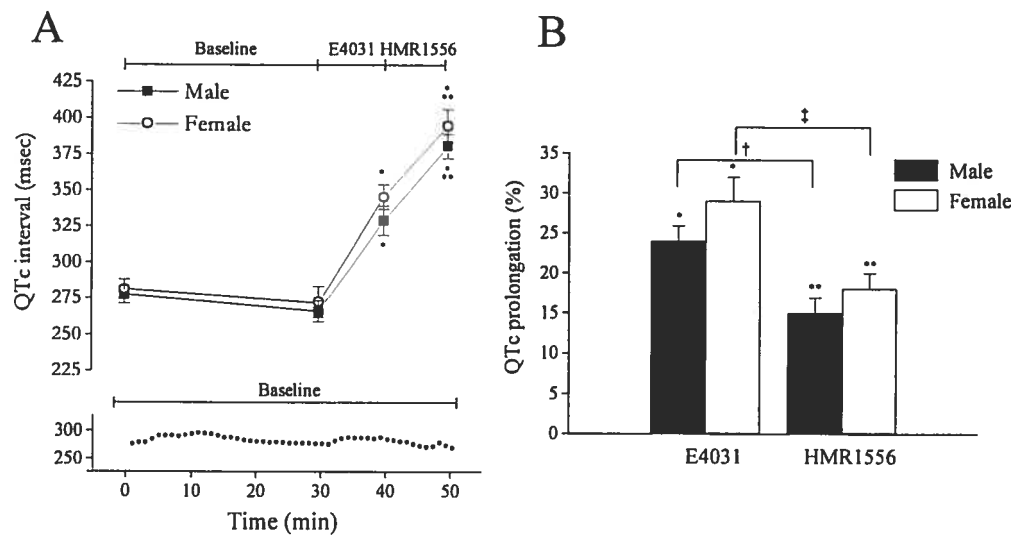


Figure 7

Figure 8: Effect of I_{Kr} and I_{Ks} blockers on the heart rate of male and female guinea pigs

A. Top – Graph presenting mean heart rate (\pm SEM) of isolated hearts of male (n=13) and female (n=11) guinea pigs before and after the application to 5 μ M E4031 alone or combined with 0.1 μ M HMR1556 (*p<0.001, both drugs vs baseline; **p<0.01, vs E-4031). **Bottom** – Experiment performed under control conditions (heart not exposed to any drugs, except the vehicle) showing no significant variations in the heart rate during the time course of these experiments. **B.** Bar graphs presenting the cumulative data of E-4031 and HMR1556 on the heart rate in male (n=21) and female (n=19) hearts. (*p<0.0001, effect of E-4031 vs control condition; **p<0.0001, effect of HMR1556 vs control condition). The effect of E-4031 was greater than that of HMR1556 in both genders (males, †p<0.0001; females, †p<0.05).

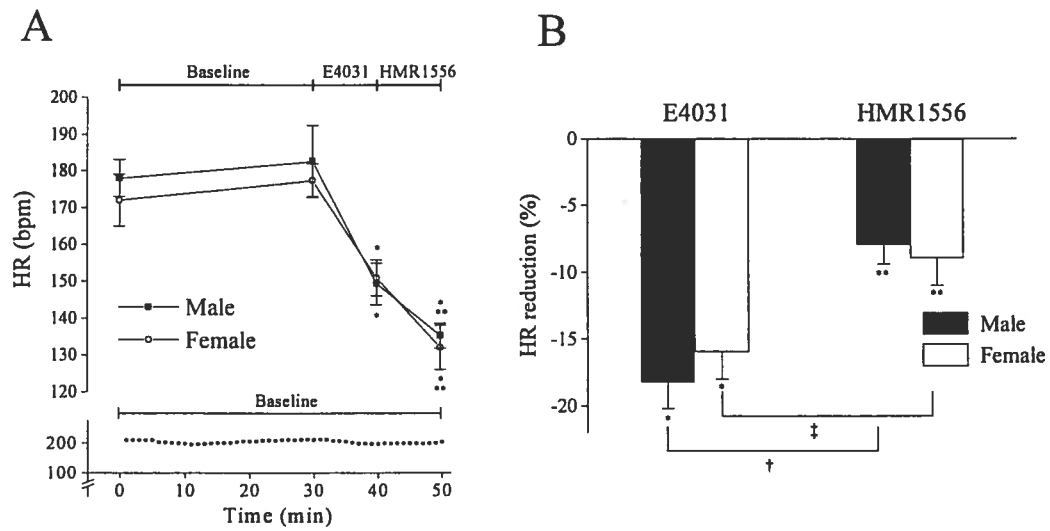


Figure 8

CHAPITRE 6 Discussion

6.1 Résumé des études présentées dans cette thèse

Cette thèse a été consacrée à la compréhension des différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation ventriculaire. La souris a constitué un excellent modèle de départ puisqu'elle présentait, comme l'humain, une différence mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque.¹¹⁸ Afin d'exploiter au maximum ce modèle, nous avons tout d'abord présenté et validé une méthodologie permettant la dissection complète des courants de repolarisation.¹⁰⁰ L'application de cette technique nous a permis de décrire les caractéristiques et les rôles physiologiques de chacun des courants K^+ sortants. De façon aussi importante, elle nous a donné les moyens d'investiguer en profondeur les mécanismes cellulaires responsables du phénomène électrophysiologique à l'étude.

Puisque plusieurs évidences cliniques suggéraient que les androgènes pouvaient réguler la repolarisation, nous avons étudié leurs rôles dans la différence liée au sexe au niveau cardiaque. Nous avons démontré que la castration entraînait un ralentissement de la repolarisation. Ce retard était associé à une plus faible densité du courant I_{Kur} et de son canal correspondant, $Kv1.5$,¹²⁸ tous deux impliqués dans l'observation initiale de la différence mâle/femelle chez la souris. Les mâles castrés présentaient un phénotype très similaire à celui des femelles, ce qui suggérait fortement que les androgènes étaient des facteurs clés dans la différence mâle/femelle. Nous avons confirmé ce résultat en utilisant un modèle naturel de déficience en androgènes, les souris C57BL/6. Notre étude a révélé que cette lignée de souris, dont les mâles avaient des taux très faibles de testostérone et de DHT, ne présentait pas de différence de repolarisation entre les sexes.¹¹¹ Ainsi, les hormones sexuelles mâles semblaient être essentielles à l'apparition de la différence mâle/femelle.

Ces résultats fort encourageants nous ont incités à étudier l'effet d'une thérapie de substitution en androgènes. Nous avons donc traité à la DHT les mâles CD-1

castrés et les mâles C57BL/6 intacts. Le traitement a restauré la différence mâle/femelle des CD-1 et en a généré une chez les souris C57BL/6. Ainsi, à l'aide de nos divers modèles de souris, nous avons clairement démontré le rôle important des androgènes dans la différence reliée au sexe dans la repolarisation ventriculaire.

Tout modèle, aussi bon soit-il, a ses limites. Dans le cas de la souris, la limite provient du fait que le courant K^+ sujet aux actions des androgènes, I_{Kur} , n'est pas exprimé dans le ventricule humain. Afin de poursuivre nos études, nous avons donc utilisé le cobaye, qui contrairement à la souris possède les courants I_{Kr} et I_{Ks} . Notre caractérisation de la repolarisation des cobayes mâles et femelles n'a révélé aucune différence au niveau de ces courants K^+ . Par ailleurs, les potentiels d'action, les intervalles QTc et la réponse à différents agents pharmacologiques étaient similaires entre les mâles et les femelles. Ainsi donc, contrairement à la souris, le cobaye ne présente pas de dimorphisme sexuel au niveau de la repolarisation.

6.2 Comment réconcilier les résultats obtenus chez le cobaye et la souris?

Les résultats obtenus chez la souris corrélaient parfaitement les données épidémiologiques suggérant que les androgènes régulent la repolarisation. Selon ces études, tout portait à croire que les androgènes pourraient affecter un courant K^+ dans les ventricules d'humains. Mais lequel? I_{Kur} , le courant qui était responsable des différences chez la souris n'est pas présent dans le ventricule d'humain. On a supposé que I_{Kr} ou I_{Ks} qui jouent des rôles semblables pourraient être affectés. Nos études ont par contre montré que ces courants n'étaient pas différents chez les cobayes mâles et femelles. Alors, quel est le lien manquant?

Pour une raison inconnue, il se peut que la régulation hormonale de la repolarisation du cobaye soit différente de celle de la souris et de l'homme. Ceci voudrait donc dire que le cobaye n'est pas un bon modèle pour l'étude des différences mâle/femelle au niveau de l'intervalle QTc. Cette hypothèse est toutefois peu convaincante en sachant que les cobayes ont des niveaux d'hormones sexuelles

semblables aux souris et aux humains et ont aussi des récepteurs aux hormones sexuelles. Ainsi, l'étude effectuée chez les cobayes pourrait simplement suggérer que les courants I_{Kr} et I_{Ks} ne présentent pas de différence reliée au sexe. Quels seraient donc les facteurs participant à l'établissement du phénomène? La section suivante propose plusieurs explications possibles.

6.3 Facteurs potentiellement impliqués dans la différence mâle/femelle

6.3.1 Courant $K^+ I_{to}$

L'absence de différence mâle/femelle dans la densité du courant I_{to} chez la souris nous avait fait écarter ce courant comme facteur responsable de la différence observée chez les humains. Des données récentes suggérant une régulation différente du courant I_{to} chez l'humain et la souris nous ont encouragé à reconsidérer cette hypothèse. Il est connu que le courant I_{to} est associé au canal Kv4.3 chez l'humain⁶⁵ et à la combinaison des canaux Kv4.2/Kv4.3 chez la souris.^{95,97} L'élément nouveau provient du fait que la régulation fine du courant I_{to} pourrait différer entre la souris et l'homme. Par exemple, le mécanisme sous-jacent à l'hétérogénéité du courant I_{to} à travers le myocarde (I_{to} est beaucoup plus proéminent dans l'épicarde que dans l'endocarde) est différent entre les deux types de mammifères. Chez l'humain, KChIP2, une sous-unité accessoire, agit comme élément régulateur alors que Kv4.2 joue ce rôle chez la souris.^{129,130} Ainsi, les résultats obtenus chez la souris qui ont trait au courant I_{to} ne peuvent être directement extrapolés à l'humain. Ce courant reste donc un candidat pouvant potentiellement expliquer la différence de repolarisation entre l'homme et la femme. Cette piste semble plausible puisqu'une étude fondamentale a justement dévoilé une densité plus grande de courant chez des chiens mâles comparés aux femelles.¹³¹ Il est important de noter que le courant I_{to} du chien est associé au canal Kv4.3 et que son hétérogénéité transmurale est due à KChIP2, comme chez l'humain.^{65,130,132} Si on extrapole les données recueillies chez le chien vers l'humain, une densité du courant I_{to} plus grande chez les hommes pourraient

expliquer leur repolarisation plus rapide. Par ailleurs, plusieurs observations concordent avec cette hypothèse. Une analyse approfondie de l'intervalle QTc des hommes et des femmes révèle que la différence provient de la phase de repolarisation initiale et non de la phase finale puisque le segment entre le pic de l'onde T et la fin de celle-ci est similaire entre les sexes.¹³³ Ainsi, un courant à activation rapide, tel que I_{to} , est fort probablement responsable de la différence. De plus, le segment ST, grandement influencé par le courant I_{to} , présente une différence inter-sexe. En effet, il est plus élevé chez les hommes que chez les femmes, ce qui concorderait avec un I_{to} plus grand chez les sujets masculins.¹³³ Pour réconcilier parfaitement les données épidémiologiques, le courant responsable devrait être régulé par les hormones sexuelles mâles pour expliquer le fait que la différence de QTc chez l'homme apparaît après la puberté et qu'elle est abolie par la castration.^{52,56} Or, il a été rapporté dans une étude de cas que deux patients ayant subi une castration ont vu leur segment ST rabaisser et leur intervalle QTc rallonger.¹³⁴ Toutes ces données suggèrent que le courant I_{to} pourrait être modulé par les androgènes et qu'il pourrait contribuer à la différence liée au sexe dans l'intervalle QTc. D'autres études devront être effectuées afin de consolider cette hypothèse (voir section 6.5.2, p.254).

6.3.2 Courants ioniques autres que K^+

Les courants autres que K^+ impliqués dans le potentiel d'action pourraient aussi être la cible des hormones sexuelles. Les résultats de plusieurs études démontrent en fait une régulation hormonale du courant calcique. Dans la majorité de ces études, la densité du courant calcique est diminuée suite à une exposition aiguë aux œstrogènes.¹³⁵⁻¹³⁷ Cet effet ne peut malheureusement pas expliquer la différence liée au sexe puisqu'un courant calcique plus petit chez la femme serait associé à des potentiels d'action et des intervalles QTc plus courts. De plus, les concentrations utilisées étaient supra physiologiques, ce qui limite la portée de ces études. Finalement, les courants Ca^{2+} des souris,¹¹⁸ des rats¹¹⁷ et des cobayes (réf CHAPITRE 5, p.198) sont similaires entre les mâles et les femelles. Peu d'études se sont penchées sur l'implication du courant Na^+ dans la différence liée au sexe. Chez l'humain, le complexe QRS est plus court chez les femmes que chez les hommes.⁵² Cette

observation cadrerait avec l'hypothèse d'un courant Na^+ plus important chez les femmes qui pourrait expliquer leur intervalle QTc plus long. Les résultats obtenus par notre laboratoire vont toutefois à l'encontre de cette hypothèse. En effet, notre groupe a démontré que le courant Na^+ ne présentait pas de différence mâle/femelle chez la souris.¹¹⁸ Ici encore, d'autres études sont requises afin d'éclaircir ces observations opposées.

6.3.3 Sous-unités accessoires aux canaux ioniques

En plus des sous-unités α qui forment le pore des canaux ioniques, les sous-unité β et les protéines impliquées dans le trafic et le ciblage des canaux pourraient être la cible des hormones sexuelles et contribuer à la différence mâle/femelle au niveau de la repolarisation. Par exemple, minK, la sous-unité β associée au courant I_{Ks} , semble être régulée par les hormones sexuelles. En effet, l'ARNm de cette protéine était grandement diminuée dans les ventricules de lapines OVX traitées aux œstrogènes ou à la DHT.¹¹⁹ Par ailleurs, les résultats d'une étude effectuée au niveau de l'utérus appuient l'idée d'une régulation hormonale des canaux Kv par le trafic de ceux-ci. Dans cette étude, l'injection d'œstrogènes a, en plus de diminuer les ARNm de Kv4.3, induit une accumulation de ce canal autour du noyau.¹²⁴ Les mécanismes responsables de cette perturbation restent toutefois à être élucidés. Un autre groupe a récemment montré que l'augmentation du courant I_{to} des cardiomyocytes observée durant la période développementale du rat était associée à une augmentation drastique de l'ARNm de KChIP alors que l'ARNm de Kv4.2 et de Kv4.3 ne présentaient que de faibles variations durant cette même période.¹³⁸ Ce type de régulation est potentiellement important et reste à être exploré. Dans nos études chez la souris, nous n'avons pas investigué cette avenue puisque la diminution du courant sensible aux androgènes était expliquée par une diminution de l'expression de sa sous-unité principale.

6.3.4 Régulation du calcium intracellulaire

Le rôle principal des protéines et échangeurs régulant le calcium intracellulaire est de contrôler la contraction. Toutefois, puisqu'ils impliquent des transferts d'ions électrogéniques, ils ont aussi un impact sur la durée du potentiel d'action (voir Figure 1, p.20 pour la contribution de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ au potentiel d'action). Par ailleurs, une partie de l'inactivation des courants Ca^{2+} dépend du calcium et peut donc être modulée indirectement par les protéines responsables du calcium intracellulaire. Le tout récent dévoilement du mécanisme responsable du quatrième type de LQTS a fourni une autre indication quant à la relation possible entre le calcium et la durée de la repolarisation cardiaque. En effet, la prolongation de l'intervalle QTc chez les patients LQTS4 est associée à une dysfonction de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et du récepteur à l' IP_3 ,³⁰ tous impliqués, directement ou indirectement, dans la gestion du calcium intracellulaire. Le lien entre ces protéines et la prolongation de la repolarisation reste toutefois à être élucidé.

Quelques études seulement ont adressé la possibilité d'une différence mâle/femelle dans la régulation du calcium intracellulaire. Leblanc et coll. ont observé des niveaux de calcium intracellulaire plus faibles chez les femelles que chez les mâles.¹¹⁷ Alors que cette différence corrélait la force de contraction plus faible des femelles, elle ne semblait pas avoir d'impact sur la repolarisation puisque les durées de potentiels d'action étaient comparables entre les deux sexes. Bien que ce résultat n'appuie pas l'hypothèse d'une différence mâle/femelle expliquée par le calcium intracellulaire, le faible nombre d'études ne permet pas d'écarter complètement cette piste. Les protéines impliquées dans la régulation du calcium intracellulaire influent non seulement sur la contraction et la repolarisation, mais aussi sur la conduction, ce qui complexifie leur étude. De plus, elles sont impliquées dans la génération de dépolarisations précoces. Il se peut donc qu'une différence mâle/femelle soit révélée en conditions pathologiques seulement.

6.3.5 Système nerveux autonome

Plusieurs observations suggèrent que le contrôle exercé par le système autonome sur le cœur présente des variations inter-sexe.¹³⁹ Entre autres, la bradycardie réflexe survenant suite à une augmentation de la pression artérielle est plus importante chez l'homme que chez la femme.¹⁴⁰ Une étude expérimentale portant sur ce sujet a même démontré que la testostérone était impliquée dans cette différence.¹⁴¹ Puisque l'intervalle QT est aussi influencé par le système nerveux autonome¹⁴² via certains courants ioniques, il est permis de suggérer un lien possible entre les différences mâle/femelle dans l'intervalle QTc et ce système. Une étude a testé cette hypothèse en mesurant les intervalles QTc d'hommes et de femmes avant et après un double blocage du système autonome. La différence reliée au sexe présente en conditions contrôles demeurait après l'injection de propranolol et d'atropine, inhibiteurs des récepteurs β -adrénergiques et muscariniques, respectivement.¹⁴³ Selon ce résultat, il est peu probable que le système autonome soit responsable des différences homme/femme observées dans la repolarisation ventriculaire.

6.3.6 Couplage cellulaire

Le couplage cellulaire influence la vitesse de conduction et la repolarisation ventriculaire. Au cours des dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées à la régulation des connexines, protéines responsables du couplage cellulaire, ainsi qu'à leur implication dans le développement de certains types d'arythmies. Les études de régulation ont majoritairement porté sur l'impact de l'âge¹⁴⁴ sur les connexines. À ma connaissance, aucune étude n'a vérifié l'effet du sexe et des hormones sexuelles au niveau du couplage ventriculaire. Ce domaine est donc à découvrir. Une piste intéressante serait de comparer la composition, la densité et la localisation sous-cellulaire des connexines entre les mâles et les femelles.

6.3.7 Résumé

Plusieurs facteurs pourraient contribuer à expliquer la différence au niveau de l'intervalle QTc des hommes et des femmes. Toutefois, je considère que la piste la plus prometteuse demeure la régulation hormonale des canaux ioniques. Des idées de recherches futures seront présentées à la section 6.5.2, p.254.

6.4 Avancements scientifiques et impact des résultats

6.4.1 Portée de la méthodologie proposée pour l'enregistrement de courants K^+ de souris

6.4.1.1 Essor du modèle de la souris pour l'étude du système cardiovasculaire

L'accès aux souris transgéniques constitue une avancée majeure pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les phénomènes physiologiques et pathologiques. D'innombrables modèles de souris transgéniques ont été utilisés dans les dernières années et de nombreux autres verront le jour. Le domaine des maladies cardiovasculaires n'échappe pas à cette tendance.^{145,146} Puisque plusieurs pathologies cardiaques sont associées à une prolongation du potentiel d'action,^{147,148} plusieurs chercheurs s'intéressent aux courants de repolarisation. Il est donc crucial de bien caractériser les courants K^+ de la souris. La méthodologie présentée au CHAPITRE 2 répond à ce besoin. Cette méthode est en fait la seule disponible à ce jour qui permette non seulement l'étude de la densité des divers courants présents chez la souris mais aussi la caractérisation de leurs propriétés cinétiques. Ceci est crucial puisque la fonction physiologique d'un courant est étroitement liée à sa cinétique.

6.4.1.2 Importance de l'étude de la cinétique des courants K^+

6.4.1.2.1 Identification du rôle physiologique des courants K^+

Les propriétés cinétiques des courants ioniques englobent les vitesses d'activation et d'inactivation, le recouvrement de l'inactivation et l'inactivation à l'équilibre. Tous ces paramètres ont un impact sur le rôle physiologique du courant. Par exemple, la vitesse d'activation détermine la rapidité de l'impact d'un courant sur le potentiel d'action. De son côté, le recouvrement de l'inactivation indique le temps requis pour un canal de sortir de l'état inactivé et d'être à nouveau fonctionnel. Finalement, l'inactivation à l'équilibre mesure la proportion de canaux inactivés à un voltage donné. La caractérisation des propriétés cinétiques des courants K^+ sortants de la souris, rendue possible grâce à notre méthode, permet de dresser un portrait de leur importance relative sur le potentiel d'action.¹⁰⁰

La vitesse d'activation des courants K^+ ventriculaires est un paramètre très important chez la souris puisqu'elle possède des potentiels d'action très courts. Ainsi, l'activation rapide des courants I_{to} et I_{Kur} contribue à leur grande participation à la phase initiale de la repolarisation. En revanche, l'activation de I_{ss} est beaucoup plus lente. Ce courant a donc peu d'impact sur la phase de repolarisation rapide. Du point de vue de la phase d'inactivation, I_{to} s'inactive environ cinq fois plus rapidement que I_{Kur} à un voltage donné alors que I_{ss} ne s'inactive presque pas. Par conséquent, les impacts de I_{Kur} et de I_{ss} sont plus soutenus. Il faut toutefois rappeler que l'activation lente de I_{ss} retarde son entrée en jeu. De plus, sa densité est deux fois plus faible que celles des autres courants. Ainsi donc, son impact sera soutenu mais faible. Par ailleurs, I_{to} recouvre environ 20 fois plus rapidement de son inactivation que I_{Kur} . Ceci renforce son rôle chez la souris dont le rythme cardiaque est très élevé. Finalement, les études d'inactivation à l'équilibre montrent qu'à des voltages voisins du potentiel de repos, tous les canaux associés aux courants I_{to} et I_{Kur} sont prêts à s'activer, ce qui corrobore leurs implications physiologiques.

6.4.1.2.2 Étude de la régulation des canaux K^+

Il existe une grande variété de canaux K^+ cardiaques selon le type de cellules, la chambre du cœur ou l'espèce étudiée. De surcroît, certains courants ayant la même base moléculaire ont des caractéristiques distinctes selon leur lieu d'expression, ce qui accroît la diversité. Par exemple, les courants I_{Kur} des oreillettes de souris et d'humain sont tous deux associés au canal $Kv1.5$ mais ont des cinétiques d'inactivation très différentes. En effet, celui de l'humain s'inactive beaucoup plus lentement que celui de la souris.^{100,149} Cette observation n'est qu'un exemple parmi plusieurs révélant le grand rôle des sous-unités régulatrices. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs chercheurs se penchent maintenant sur ce sujet. À l'aide des techniques de clonage et d'expression dans des lignées cellulaires, des chercheurs ont éclairci le rôle de certaines sous-unités β dans la génération de courants K^+ spécifiques.^{64,150} Ils ont aussi découvert qu'une sous-unité β pouvait interagir avec plus d'une sous-unité α (voir Tableau VI, p.45).^{29,63} Cette observation contribue certainement à expliquer la grande diversité de densités, de cinétiques et de composition des courants K^+ à travers le cœur et les espèces. Cette diversité permet possiblement une régulation précise des courants K^+ selon le lieu d'expression, ce qui renforce la notion que la durée de la repolarisation est un paramètre crucial qui doit être adapté spécifiquement selon la fonction de chaque cellule.

Puisque dans certains cas, des souris transgéniques sont utilisées afin d'étudier le rôle des sous-unités régulatrices,^{63,151,152} notre méthode d'isolation de courants K^+ sera grandement utile pour les futures recherches dans ce domaine. En effet, elle permettra l'étude individuelle des cinétiques des courants K^+ sortants. De plus, elle s'appliquera aussi pour l'étude des effets des agents pharmacologiques sur les canaux K^+ , de même que pour toutes les autres conditions associées à un changement cinétique. L'exemple suivant décrit une situation pathologique associée à des dérèglements d'ordre cinétique.

6.4.1.2.3 *Identification des mécanismes responsables de la prolongation de la repolarisation dans diverses situations pathologiques*

En 2001, nous avons été sollicités afin d'étudier la repolarisation cardiaque des souris transgéniques du VIH-1. Ces souris, en plus de présenter des troubles du système immunitaire, développaient des symptômes cardiaques.^{153,154} En effet, certaines souris avaient un intervalle QT prolongé et mourraient soudainement. À l'aide de notre méthode de séparation de courants, nous avons démontré que la prolongation de la repolarisation était due à une réduction des courants K^+ sortants I_{to} , I_{Kur} et I_{ss} .¹⁵⁵ Nous avons ensuite vérifié la cause de la diminution des courants K^+ . Nous avons démontré que la densité plus faible des courants K^+ n'était pas due à une expression réduite des canaux mais bien à une modification des cinétiques d'inactivation. Cette découverte n'a été possible que par l'application de notre technique.

6.4.1.3 **Polyvalence de la méthode proposée**

En plus de décrire une méthode pour séparer les divers courants K^+ de la souris, l'article du CHAPITRE 2 fournit les critères de sélection de chacune des étapes choisies. Il s'agit donc d'un protocole "clé en mains" qui peut être adapté par chaque laboratoire, selon leurs conditions expérimentales. Par exemple, la méthode de base s'applique pour des enregistrements effectués à température ambiante mais peut être ajustée pour des températures plus physiologiques. Un protocole modifié pour des enregistrements à 32°C a même été suggéré et validé dans l'article.¹⁰⁰ De surcroît, notre méthode s'applique aux myocytes ventriculaires et auriculaires. Elle pourrait aussi être utilisée chez le rat qui possède deux des trois courants K^+ sortants retrouvés chez la souris (I_{to} et I_{ss}) ainsi qu'au niveau des oreillettes humaines, qui possèdent I_{to} et I_{Kur} .

En résumé, cette méthode offre des avantages substantiels par rapport aux autres méthodes disponibles et a un très grand potentiel d'application.

6.4.2 Progrès dans l'étude de la régulation hormonale de la repolarisation

6.4.2.1 Identification du rôle crucial des hormones sexuelles mâles dans la différence mâle/femelle

Les résultats des études expérimentales effectuées jusqu'à ce jour montraient qu'une administration d'androgènes était associée à des changements au niveau de la repolarisation cardiaque.^{119,125,156} Nous avons été les premiers à révéler le rôle direct de ces hormones dans la différence mâle/femelle au niveau de la repolarisation. Nos résultats démontrent que la déficience en androgènes abolit cette différence alors que la présence d'androgènes permet son émergence. Ces conclusions ont été tirées d'études effectuées sur divers modèles (voir Figure 12, p.248), ce qui constitue une force de nos études. En effet, le nombre considérable de modèles étudiés dans cette thèse permet même de tester la corrélation entre les niveaux d'androgènes et la densité du courant impliqué dans la différence mâle/femelle. Le graphique suivant regroupe les données des huit différents modèles de souris utilisés dans les différents projets réunis dans cette thèse et démontre qu'il existe une forte corrélation entre les niveaux de DHT et la densité du courant I_{Kur} ($R = 0.97$, $p < 0.0001$)

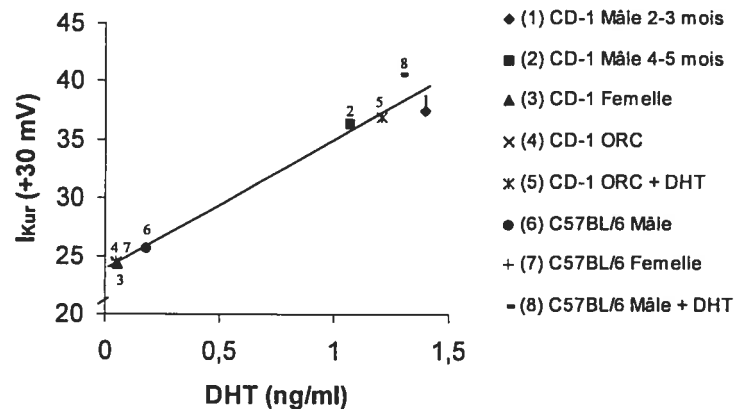


Figure 12: Relation entre les niveaux de DHT et la densité de I_{Kur} dans les différents modèles de souris étudiés dans cette thèse
 ORC: castré ("orchietomized")

6.4.2.1.1 Mécanisme d'action des androgènes

L'originalité de nos études provient aussi du fait que nous avons suivi l'impact des androgènes à plusieurs niveaux de la repolarisation ventriculaire (moléculaire, cellulaire et cœur entier). Ainsi, dans tous les modèles utilisés, nous avons observé un effet sur l'intervalle QTc, les potentiels d'action, le courant I_{Kur} et son canal associé Kv1.5. Ce suivi en profondeur nous a aussi permis d'identifier le mécanisme d'action des androgènes : hausse du nombre de canaux K^+ , augmentation subséquente de la densité du courant et accélération de la repolarisation. Par ailleurs, les raisons suivantes suggèrent fortement que la hausse de la densité protéique résulte d'une transcription accrue du canal K^+ .

1. L'action principale des hormones sexuelles est la régulation de la transcription via leurs récepteurs, qui sont considérés comme des facteurs de transcription;
2. Les ventricules de souris expriment les récepteurs aux androgènes;
3. 14 des 15 nucléotides consécutifs formant l'élément de réponse des androgènes sont présents dans le gène Kv1.5;⁹⁸
4. Les niveaux d'ARNm de Kv1.5 sont plus abondants chez les souris CD-1 mâles que femelles.¹¹⁸

6.4.2.1.2 Seuil d'androgènes nécessaire pour une action au niveau cardiaque

D'après nos études, il semble que les niveaux de testostérone et de DHT circulants doivent dépasser un certain seuil pour induire les effets observés sur l'électrophysiologie cardiaque. Par exemple, les souris C57BL/6 ne sont pas complètement déficientes en hormones sexuelles mâles : elles possèdent des niveaux d'androgènes faibles qui assurent tout de même une fonction reproductrice. Par contre, ces niveaux ne semblent pas suffisants pour générer une différence liée au sexe dans la repolarisation cardiaque. Il est possible que le seuil d'androgènes requis pour déclencher une action cardiaque soit plus élevé que celui du système reproducteur. Cette affirmation semble très plausible en considérant que les organes reproducteurs sont les tissus cibles des hormones sexuelles et sont vraisemblablement plus sensibles à leur action. En fait, les récepteurs aux hormones sexuelles sont beaucoup plus abondants dans les organes reproducteurs que dans le cœur.⁷³ D'autre part, l'action des androgènes peut être plus importante dans les testicules puisque ce tissu est le site même de la synthèse des hormones sexuelles et que leurs concentrations y sont plus élevées que dans le sang.^{111,157}

6.4.2.1.3 Durée d'exposition requise pour un impact sur la repolarisation

Qu'en est-il du temps d'exposition aux androgènes nécessaire pour induire des effets sur l'activité électrique du cœur? Dans nos études, nous avons obtenu des réponses positives au traitement à la DHT chez les mâles C57BL/6 et CD-1 castrés ayant été traités un et trois mois, respectivement. Dans une étude effectuée chez le lapin, un raccourcissement de la repolarisation est survenu après 21 jours de traitement à la DHT.¹²⁵ Ainsi, trois à quatre semaines de traitement semblent suffisantes pour générer des changements au niveau cardiaque. Il est peu probable que cette période soit beaucoup plus courte puisque les androgènes exercent un effet génomique, et donc à long terme, sur le cœur. De plus, deux études, dont une réalisée pendant un de mes stages d'été au laboratoire (données non publiées), ont montré qu'une exposition aiguë à la DHT n'entraînait aucun changement au niveau des courants K^+ ou des potentiels d'action.¹³⁵

6.4.2.1.4 Durée de déficience requise pour un impact sur la repolarisation

L'impact d'un retrait d'hormones sexuelles mâles semble s'exercer beaucoup plus lentement qu'une thérapie de remplacement. En effet, il a fallu attendre de trois à quatre mois après la castration des souris CD-1 pour observer des différences significatives dans la repolarisation ventriculaire. Les souris castrées étudiées de un à deux mois après la chirurgie présentaient un phénotype intermédiaire mais non statistiquement différent des mâles.

Il est possible que ce long délai soit dû au fait que les souris aient été exposées aux androgènes avant d'être castrées. En effet, les souris mâles ont des taux de testostérone considérables dès les premiers jours de vie¹⁰⁸ alors que dans notre étude, la castration survenait à 37 jours de vie. Ce choix d'âge était justifié d'une part par un désir de ne pas perturber le développement normal des souris et d'autre part, par une volonté de les castrer à l'aube de leur maturité sexuelle. Tel que mentionné dans la section précédente, un mois d'exposition aux androgènes est suffisant pour induire une réponse cardiaque. Il se peut donc que plusieurs mois de déficience soient

nécessaires afin de renverser l'effet des androgènes sur le cœur, une cible secondaire des hormones sexuelles.¹⁵⁸

6.4.3 Importance du choix d'un modèle expérimental

La découverte de différences mâle/femelle dans la repolarisation cardiaque chez la souris CD-1 a soulevé l'importance de comparer des groupes du même sexe pour toutes les études touchant l'électrophysiologie cardiaque. Dans la présente thèse, il a été démontré que les souris C57BL/6 ne présentaient pas une telle différence. Ainsi, cette directive ne s'appliquerait donc pas nécessairement à cette lignée. Il serait toutefois recommandé de l'appliquer puisqu'il est important de contrôler le plus de paramètres possibles à l'intérieur d'une étude.

6.4.3.1 Niveaux d'hormones et maturité sexuelle

La similarité du phénotype électrophysiologique des souris C57BL/6 mâles et femelles découlaient des faibles concentrations d'androgènes dans cette lignée. Ceci fait en sorte que ces souris ne constituent pas un modèle optimal pour l'étude de la régulation hormonale de la repolarisation cardiaque. Puisque cette particularité n'était pas apparente à première vue, il apparaît crucial de doser les niveaux d'hormones sexuelles mâles et femelles avant d'entreprendre de telles études. Pour les mêmes raisons, il serait préférable que tout modèle utilisé soit étudié après l'atteinte de sa maturité sexuelle et avant la période de ménopause/andropause afin qu'il soit exposé à des niveaux d'hormones maximaux.

6.4.3.2 Différence basale dans l'intervalle QTc

L'étude effectuée chez le cobaye nous a fait réfléchir à un autre critère que devrait préféablement posséder un modèle pour l'étude des différences mâle/femelle dans la repolarisation. En plus d'avoir des profils sexuel et électrophysiologique cardiaque semblables à l'humain, le modèle devrait présenter une différence reliée au sexe dans l'intervalle QTc. Sans cette différence, les résultats expérimentaux sont difficiles à interpréter. D'une part, la découverte d'une différence mâle/femelle au

niveau cellulaire serait intrigante puisqu'elle n'aurait pas eu de répercussion au niveau de l'intervalle QTc. D'autre part, une absence de différence au niveau cellulaire peut simplement expliquer les intervalles QTc similaires des animaux mâles et femelles. Bref, il est fortement recommandé de vérifier les intervalles QTc des mâles et des femelles avant d'investiguer les mécanismes cellulaires électrophysiologiques.

6.5 Perspectives

6.5.1 Régulation cardiaque par les hormones sexuelles féminines

Le dévoilement d'une régulation de l'électrophysiologie cardiaque par les hormones sexuelles mâles ouvre la porte à l'étude des effets des hormones sexuelles féminines. Comme pour les androgènes, les hormones sexuelles féminines se lient à leurs récepteurs et agissent comme facteurs de transcription. La présence de récepteurs aux œstrogènes a été démontrée dans les cœurs de mammifères tels la souris, le rat et l'humain.^{72,92,101} Récemment, un étudiant du laboratoire a démontré que le récepteur ER α était surexprimé chez des souris ovariectomisées, ce qui prouve que les myocytes ventriculaires répondent aux changements de concentration d'hormones sexuelles féminines.¹⁰¹

Par ailleurs, des études ont démontré que les œstrogènes agissent au niveau des canaux K⁺ des artères coronariennes¹⁵⁹⁻¹⁶¹ et des muscles lisses de l'utérus.^{124,162-164} Le courant affecté dans le muscle utérin, I_{to}, est aussi présent dans le muscle cardiaque de plusieurs espèces dont la souris et l'humain. Tout récemment, Eghbali et coll. ont montré que le courant I_{to} cardiaque était aussi régulé par des variations hormonales. En effet, la densité de ce courant ainsi que l'expression (ARNm et protéine) de l'un de ses canaux associés, Kv4.3, étaient réduites chez des souris enceintes. Les mêmes changements étaient observés chez des souris OVX traitées aux œstrogènes mais non chez celles traitées à la progestérone. La présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs aux œstrogènes, le ICI 182,-780, prévenait la diminution de l'ARNm du canal Kv4.3, prouvant ainsi l'implication des œstrogènes et de leurs récepteurs dans ce phénomène.¹⁶⁵

De mon côté, j'ai aussi étudié l'effet des hormones sexuelles féminines au niveau de la repolarisation ventriculaire. À cette fin, j'ai comparé les durées de potentiels d'action et les courants K^+ de souris femelles ovariectomisées ou non. Les résultats obtenus sont les suivants:

1. Les durées de potentiels d'action mesurées à 90% de repolarisation étaient plus courtes chez les souris OVX comparées aux femelles contrôles;
2. La densité du courant global K^+ sortant était plus élevée chez les OVX alors que la densité du courant entrant était similaire entre les deux groupes;
3. L'augmentation du courant K^+ sortant reflétait une augmentation du courant I_{to} dans les myocytes de souris OVX. Les autres courants sortants (I_{Kur} , I_{ss}) étaient inchangés chez les OVX.

Ces résultats, combinés à ceux de Eghbali et coll., démontrent qu'une forte présence d'œstrogènes (ex. fin de grossesse) ainsi qu'une absence (OVX) induisent des changements au niveau du courant de repolarisation I_{to} . Par conséquent, se pourrait-il que ces hormones soient impliquées dans la différence au niveau de l'intervalle QTc?

À prime abord, cette hypothèse paraît séduisante. Premièrement, une répression du courant I_{to} par les œstrogènes expliquerait parfaitement la repolarisation plus longue des femmes/femelles. Deuxièmement, l'absence du courant I_{to} chez le cobaye éclaircirait l'absence de différences mâle/femelle au niveau de l'intervalle QTc chez cet animal. Toutefois, plusieurs observations sont défavorables à l'implication des hormones sexuelles féminines dans ce phénomène. Tout d'abord, le cycle menstruel¹⁴³ et l'hormonothérapie¹⁶⁶ n'affectent pas l'intervalle QTc. Ensuite, l'intervalle QTc ne varie ni à l'adolescence, ni à la ménopause chez la femme.⁵² Ainsi, l'intervalle QTc demeure inchangé dans tous les cas mentionnés ci-haut, pourtant associés à des changements physiologiques notables d'hormones sexuelles féminines. Tout récemment, une équipe a étudié le profil électrophysiologique des souris α ERKO et β ERKO, déficientes en récepteurs aux œstrogènes α et β , respectivement.¹⁶⁷ L'étude de la densité de l'ARNm du canal Kv4.3 a révélé une densité réduite chez les souris β ERKO. Étonnamment, cette réduction n'a eu aucun

impact sur l'ECG puisque les intervalles PR, QRS, QT, QTc et RR étaient similaires entre les souris α ERKO, β ERKO et les souris contrôles. Par contre, en situation pathologique (infarctus), les souris β ERKO présentaient une repolarisation prolongée et une réduction des événements ventriculaires spontanés. Ainsi, l'impact de l'absence du récepteur aux œstrogènes ER β et la réduction associée de Kv4.3 n'était pas apparent en conditions physiologiques mais était dévoilé en situations pathologiques. De façon similaire, l'impact des œstrogènes sur les canaux potassiques pourrait être subtil en conditions basales mais déterminant en conditions pathologiques. Définitivement, d'autres études sont requises pour éclaircir le rôle exact des œstrogènes au niveau cardiaque. Une attention particulière pourrait notamment être portée au développement pathologique associé aux maladies liées à l'ischémie.

6.5.2 Suite des travaux sur l'action des androgènes

6.5.2.1 Effet des androgènes au niveau du promoteur de Kv1.5

Les études présentées dans cette thèse démontrent clairement que le canal Kv1.5 est régulé par les androgènes. Bien que plusieurs observations suggèrent que la régulation hormonale se fasse au niveau transcriptionnel (voir section 6.4.2.1.1, p.248), d'autres études sont requises pour confirmer cette affirmation. Il serait tout particulièrement intéressant de tester l'impact des androgènes sur le promoteur du gène Kv1.5. Il serait d'abord important de vérifier si le gène Kv1.5 est régulé par les androgènes dans ce système. Pour ce faire, des études de "Western blot" pourraient être effectuées sur des préparations de myocytes de souris nouveau-nées préalablement transfectés avec le gène Kv1.5 et cultivés en présence ou en absence d'androgènes. Par la suite, le gène Kv1.5 pourrait être muté au niveau du promoteur avant d'être transfecté et stimulé à nouveau. Ces études permettraient de comprendre l'implication du promoteur dans la régulation hormonale du gène Kv1.5. De plus, des études subséquentes pourraient être effectuées afin de déterminer quelle partie spécifique du promoteur est impliquée dans cette régulation.

6.5.3 Suite des travaux sur la différence reliée au sexe dans la repolarisation cardiaque

Les études présentées dans cette thèse exposent les mécanismes d'action impliqués dans la différence mâle/femelle au niveau de la repolarisation cardiaque chez la souris. Du même fait, elles guident les futures recherches sur ce sujet. Plus précisément, elles ciblent un canal K^+ ventriculaire dont l'expression serait plus abondante chez les hommes que chez les femmes, dû à un plus haut taux d'androgènes.

Cette thèse propose aussi plusieurs recommandations quant au choix du modèle pour l'étude de ce phénomène. Par contre, plus les critères sont nombreux, plus il devient difficile de trouver un bon modèle. Tel que mentionné dans l'introduction, l'étude directe de l'humain a aussi ses propres limitations dont entre autres, la difficulté d'isoler des myocytes de qualité. Les résultats présentés dans cette thèse permettent peut-être de contourner cette limitation. En effet, puisque nos études suggèrent la présence d'une différence au niveau de l'expression d'un canal K^+ , une analyse protéique du tissu ventriculaire pourrait répondre à l'hypothèse, sans avoir à enregistrer les courants K^+ . Il serait aussi intéressant d'étudier parallèlement les niveaux d'ARNm des diverses sous-unités responsables des courants K^+ et en particulier, ceux de Kv4.3 et de KChIP2, pour les raisons énumérées à la section 6.3.1. La sélection des tissus humains devrait par contre être extrêmement rigoureuse et respecter les critères suivants :

1. Puisque le phénomène à l'étude est dépendant des androgènes, il est essentiel que le donneur ait des niveaux d'hormones sexuelles normaux. Il ne devrait donc pas avoir dépassé l'andropause. Contrairement à la ménopause, l'andropause est un phénomène graduel s'étalant sur plusieurs années et qui survient relativement tard, aux environs de 60 à 80 ans.¹⁶⁸ Puisque la variabilité des niveaux de testostérone entre les hommes de cet âge est très grande, il serait préférable de doser les niveaux d'hormones plutôt que d'établir un critère de sélection selon l'âge, qui serait probablement trop restrictif;

2. Le ou la donneur(euse) ne devrait pas souffrir d'hypertrophie ventriculaire ou d'insuffisance cardiaque puisque ces maladies sont associées à des diminutions d'expression de canaux K^+ ;^{147,148}
3. Les tissus devraient tous provenir de la même chambre et de la même couche du cœur puisque les canaux K^+ sont exprimés de façon hétérogène à travers les diverses parties du cœur.¹⁶⁹

Si ces conditions sont respectées et que le nombre d'échantillons est suffisant, l'humain constituerait un bon modèle pour poursuivre ces recherches.

6.6 Commentaires finaux

Cette thèse a mené à des avancements majeurs dans le domaine de la régulation hormonale de l'électrophysiologie cardiaque. Entre autres, elle propose une nouvelle méthodologie pour l'enregistrement des courants K^+ chez la souris, elle éclaire les mécanismes responsables des différences reliées au sexe et elle soulève l'importance du choix du modèle expérimental. L'avancement du savoir dans ces domaines aidera à développer des stratégies thérapeutiques améliorées afin de prévenir le développement de torsades de pointes chez la femme.

Bibliographie

1. Oudit, G. Y., Ramirez, R. J., & Backx, P. H. (2004). Voltage-regulated Potassium Channels. In *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 19-32. Elsevier Inc, Philadelphia.
2. Aehlert, B. (2002). *ECGs made easy*, 2nd ed. St-Louis.
3. London, B. (2004). Mouse Models of Cardiac Arrhythmias. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell To Bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 433-443. Elsevier Inc, Philadelphia.
4. Liu, G., Iden, J. B., Kovithavongs, K., Gulamhusein, R., Duff, H. J., & Kavanagh, K. M. (2003). *In vivo* temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave. *Journal of Physiology* **555**, 267-279.
5. Danik, S., Cabo, C., Chiello, C., Kang, S., Wit, A. L., & Coromilas, J. (2002). Correlation of repolarization of ventricular monophasic action potential with ECG in the murine heart. *American Journal of Physiology* **283**, H372-H381.
6. McLerie, M. & Lopatin, A. (2003). Dominant-negative suppression of I_{K1} in the mouse leads to altered cardiac excitability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **35**, 367-378.
7. Li, J., McLerie, M., & Lopatin, A. N. (2004). Transgenic upregulation of I_{K1} in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *American Journal of Physiology* **287**, H2790-H2802.
8. Yang, H., Elko, P. F. B. S., Baga, J. J., Pires, A. A., Schuger, C. D., Steinman, R. T., & Lehmann, M. H. (1997). Maximal ascending and descending slopes of the T wave in men and women. *Journal of Electrocardiology* **30**, 267-276.
9. Bazett, H. (1920). An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* **7**, 353-370.
10. Fridericia, L. (1920). EKG systolic duration in normal subject and heart disease patients. *Acta Medica Scandinavica* **53**, 469-488.

11. Sagie, A., Larson, M., Goldberg, R., Bengtson, J., & Levy, D. (1992). An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *American Journal of Cardiology* **70**, 797-801.
12. Mitchell, G. F., Jeron, A., & Koren, G. (1998). Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *American Journal of Physiology* **274**, H747-H751.
13. Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compernelle, V., Rudy, Y., Smits, J. F., Flameng, W., Clancy, C. E., Moons, L., Vos, M. A., Dewerchin, M., Benndorf, K., Collen, D., Carmeliet, E., & Carmeliet, P. (2002). Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nature Medicine* **7**, 1021-1027.
14. Bedmar, M. M., Harrigan, E. P., Anziano, R. J., Camm, A. J., & Ruskin, J. N. (2001). The QT Interval. *Progress in Cardiovascular Diseases* **43**, 1-45.
15. Roden, D. M. & Spooner, P. M. (1999). Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **10**, 1664-1683.
16. Schwartz, P. J., Moss, A. J., Vincent, G. M., & Crampton, R. S. (1993). Diagnostic Criteria for the Long QT Syndrome: An Update. *Circulation* **88**, 782-784.
17. Roden, D. M., Lazzara, R., Rosen, M. R., Schwartz, P. J., Towbin, J., & Vincent, G. M. (1996). Multiple mechanisms in the Long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. *Circulation* **94**, 1996-2012.
18. Marban, E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature* **415**, 213-218.
19. Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vincentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., Folli, R., & Cappelletti, D. (2003). Risk Stratification in the Long-QT Syndrome. *New England Journal of Medicine* **348**, 1866-1874.
20. Priori, S. G., Rivolta, I., & Napolitano, C. (2005). Genetics of Long QT, Brugada, and Other Channelopathies. In *Cardiac electrophysiology : from cell*

to bedside, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 462-470. Elsevier Inc, Philadelphia.

21. Tristani-Firouzi, M., Jenson, J. L., Donaldson, M. R., Sansone, V., Meola, G., Hahn, A., Bendahhou, S., Kwiecinski, H., Fidzianska, A., Plaster, N., Fu, Y.-H., Ptacek, L. J., & Tawill, R. (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Anderson syndrome). *Journal of Clinical Investigation* **110**, 381-388.
22. Chauhan, V. S., Tuvia, S., Buhusi, M., Bennett, V., & Grant, A. O. (2000). Abnormal Cardiac Na⁺ Channel Properties and QT Heart Rate Adaptation in Neonatal Ankyrin-B Knockout Mice. *Circulation Research* **86**, 441-447.
23. Huang, L., Bitner-Glindzicz, M., Tranebjaerg, L., & Tinker, A. (2001). A spectrum of functional effects for disease causing mutations in the Jervell and Lange-Nielson syndrome. *Cardiovascular Research* **51**, 670-680.
24. Gouas, L., Beelocq, C., Berthet, M., Potet, F., Demolombe, S., Forhan, A., Lescasse, R., Simon, F., Balkau, B., Denjoy, I., Hainque, B., Baro, I., & Guicheney, P. (2004). New KCNQ1 mutations leading to haploinsufficiency in a general population: Defective trafficking of a KvLQT1 mutant. *Cardiovascular Research* **63**, 60-68.
25. Abbott, G. W. (1999). MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.
26. Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., & Hebert, T. E. (2002). A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *Journal of Physiology* **540**, 15-27.
27. Zhang, M., Jiang, M., & Tseng, G. N. (2001). MinK-Related Peptide 1 Associates With Kv4.2 and Modulates Its Gating Function : Potential Role as {beta} Subunit of Cardiac Transient Outward Channel? *Circulation Research* **88**, 1012-1019.
28. Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO Journal* **19**, 6326-6330.

29. Jiang, M., Zhang, M., Tang, D. G., Clemo, H. F., Liu, J., Holwitt, D., Kasirajan, V., Pond, A. L., Wettwer, E., & Tseng, G.-N. (2004). KCNE2 Protein Is Expressed in Ventricles of Different Species, and Changes in Its Expression Contribute to Electrical Remodeling in Diseased Hearts. *Circulation* **109**, 1783-1788.
30. Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., DuBell, W. H., Song, L.-S., Haurogné, K., Kyndt, F., All, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., & Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-638.
31. Jackman, W. M., Friday, K. J., Anderson, J. L., Aliot, E. M., Clark, M., & Lazzara, R. (1998). The long QT syndromes: a critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Progress in Cardiovascular Diseases* **31**, 115-172.
32. El-Sherif, N. & Turitto, G. (2004). Torsade de pointes. In *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 687-699. Elsevier Inc, Philadelphia.
33. Rampe, D., Roy, M.-L., Dennis, A., & Brown, A. M. (1997). A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of human cardiac potassium channel HERG. *FEBS Letters* **417**, 28-32.
34. Roy, M.-L., Dumaine, R., & Brown, A. M. (1996). HERG, a Primary Human Ventricular Target of the Nonsedating Antihistamine Terfenadine. *Circulation* **94**, 817-823.
35. Daleau, P., Lessard, E., Groleau, M.-F., & Turgeon, J. (1995). Erythromycin Blocks the Rapid Component of the Delayed Rectifier Potassium Current and Lengthens Repolarization of Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Circulation* **91**, 3010-3016.
36. Napolitano, C., Schwartz, P. J., Brown, A. M., Ronchetti, E., Bianchi, L., Pinnavaia, A., Acquaro, G., & Priori, S. G. (2000). Evidence for a cardiac ion channel mutation underlying drug-induced QT prolongation and life-threatening arrhythmias. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **11**, 691-696.

37. Sesti, F., Abbott, G. W., Wei, J., Murray, K. T., Saksena, S., Schwartz, P. J., Priori, S. G., Roden, D. M., George, A. L. J., & Goldstein, S. A. N. (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10613-10618.
38. Dessertenne, F. (1966). La tachycardie ventriculaire à deux foyers opposés variables. *Archives des maladies du cœur* **2**, 263-272.
39. Viskin, S., Alla, S. R., Barron, H. V., Heller, K., Saxon, L., Kitzis, I., vanHare, G. F., Wong, M. J., Lesh, M. D., & Sheinman, M. M. (1996). Mode of Onset of Torsade de Pointes in Congenital Long QT Syndrom. *Journal of American College of Cardiology* **28**, 1262-1268.
40. Eckardt, L., Haverkamp, W., Borggrefe, M., & Breithardt, G. (1998). Experimental models of torsade de pointes. *Cardiovascular Research* **39**, 178-193.
41. Kaseda, S., Gilmour, R. F. Jr., & Zipes, D. P. (1989). Depressant effect of magnesium on early afterdepolarizations and triggered activity induced by cesium, quinidine and 4-aminopyridine in canine cardiac Purkinje fibers. *American Heart Journal* **118**, 458-466.
42. Roden, D. M. (2004). Drug-Induced Prolongation of the QT interval. *New England Journal of Medicine* **350**, 1013-1022.
43. Rudy, Y. (2004). Ionic Mechanism of Cardiac Electrical Activity: A Theoretical Approach. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell To Bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 255-266. Elsevier Inc, Philadelphia.
44. Thomsen, M. B., Verduyn, S. C., Stengl, M., Beekman, J. D. M., de Pater, G., van Opstal, J., Volders, P. G. A., & Vos, M. A. (2004). Increased Short-Term Variability of Repolarization Predicts d-Sotalol-Induced Torsades de Pointes in Dogs. *Circulation* **110**, 2453-2459.
45. Kozhevnikov, D. O., Yamamoto, K., Robotis, D., Restivo, M., & El-Sherif, N. (2002). Electrophysiological Mechanism of Enhanced Susceptibility of Hypertrophied Heart to Acquired Torsades de Pointes Arrhythmias. *Circulation* **105**, 1128-1134.

46. Schwartz, P. J., Priori, S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M. T., Towbin, J. A., Beggs, A. H., Brink, P., Wilde, A. A. M., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J. L., Timothy, K. W., Corfield, V., Wattanasirichaigoon, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M. H., Schwartz, K., Coumel, P., & Bloise, R. (2001). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**, 89-95.
47. Lehmann, M. H., Hardy, S., Archibald, D., Quart, B., & MacNeil, D. J. (1996). Sex difference in risk of torsade de pointes with *d,l*-sotalol. *Circulation* **94**, 2534-2541.
48. Makkar, R. R., Fromm, B. S., Steinman, R. T., Meissner, M. D., & Lehmann, M. H. (1993). Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *Journal of American Medical Association* **270**, 2590-2597.
49. Reinoehl, J., Frankovich, D., Machado, C., Kawasaki, R., Baga, J. J., Pires, L. A., Steinman, R. T., Fromm, B. S., & Lehmann, M. H. (1996). Probucol-associated tachyarrhythmic events and QT prolongation: importance of gender. *American Heart Journal* **131**, 1184-1191.
50. Locati, E., Zareba, W., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Vincent, M., Lehmann, M. H., Towbin, J., Priori, S. G., Napolitano, C., Robinson, J. L., Andrews, M., Timothy, K. W., & Hall, W. J. (1998). Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital Long-QT syndrome. Findings from the international LQTS registry. *Circulation* **97**, 2237-2244.
51. Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Frankovich, D., Fromm, B. S., Keating, M., Locati, E. H., Taggard, R. T., Towbin, J. A., Moss, A. J., Schwartz, P. J., & Vincent, M. (1997). Age-gender influence on the rate-corrected interval and the QT-heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *Journal of American College of Cardiology* **29**, 93-99.
52. Rautaharju, P. M., Zhou, S. H., Wong, S., Calhoun, H. P., Berenson, G. S., Prineas, R., & Davignon, A. (1992). Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Canadian Journal of Cardiology* **8**, 690-695.

53. Stramba-Badiale, M., Spagnolo, D., Bosi, G., & Schwartz, P. J. (1995). Are gender differences in QTc present at birth? *American Journal of Cardiology* **75**, 1277-1278.
54. Hashiba, K. (1992). Sex differences in phenotypic manifestation and gene transmission in the Romano-Ward syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* **644**, 142-156.
55. Stramba-Badiale, M., Locati, E., & Martinelli, A. (1997). Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-hour Holter monitor recordings. *European Heart Journal* **18**, 1000-1006.
56. Bidoggia, H., Maciel, J. P., Capalozza, N., Mosca, S., Blaksley, E. J., Valverde, E., Bertran, G., Arini, P., Biagetti, M. O., & Quinteiro, R. (2000). Sex difference on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *American Heart Journal* **140**, 678-683.
57. Stolt, A., Karila, T., Viitasalo, M., Mäntysaari, M., Kujala, U. M., & Karjalainen, J. (1999). QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *American Journal of Cardiology* **84**, 364-366.
58. Campbell, N. A. (1995). *Biologie*, Éditions du renouveau pédagogique ed. The Benjamin/Cummings Publishing Compagny.
59. Vaissaire, J.-P. (1977). *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire*, pp. 1-454. Imprimerie de Compiègne, Paris.
60. Majumder, K., De, B. M., Wang, Z., & Wible, B. A. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Letters* **361**, 13-16.
61. Uebele, V. N., England, S. K., Chaudhary, A., Tamkun, M. M., & Snyders, D. J. (1996). Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2406-2412.

62. Kuryshev, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A., & Wible, B. (2000). KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels. *American Journal of Physiology* **278**, C931-C941.
63. Aimond, F., Kwak, S. P., Rhodes, K. J., & Nerbonne, J. M. (2005). Accessory Kv β 1 Subunits Differentially Modulate the Functional Expression of Voltage-Gated K⁺ Channels in Mouse Ventricular Myocytes. *Circulation Research* **96**, 451-458.
64. Radicke, S., Cotella, D., Graf, E. M., Ravens, U., & Wettwer, E. (2005). Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative β subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *Journal of Physiology* **565**, 751-756.
65. Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S., & McKinnon, D. (1996). Role of the Kv4.3 potassium channel in ventricular muscle: a molecular correlate for the transient outward current. *Circulation Research* **79**, 659-668.
66. Fedida, D., Wible, B., Fermini, B., Faust, F., & Nattel, S. (1993). Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circulation Research* **73**, 210-216.
67. Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetsky, B., & Robertson, G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**, 659-668.
68. Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *Journal of Physiology* **525**, 285-298.
69. Bosch Ralph F., Gaspo, R., Busch, A. E., Lang, H. J., Li, G. R., & Nattel, S. (1998). Effect of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* **38**, 441-450.
70. Guyton, A. C. (2000). *Textbook of Medical Physiology*, 10 ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data.

71. Goldfien, A., Monroe, S.E (1994). *Basic & Clinical Endocrinology*, 4 ed. Paramount Publishing Business and Professional Group, Norwalk.
72. Taylor, A. H. & Al-Azzawi, F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* **24**, 145-155.
73. Ruizeveld de Winter, J. A., Trapman, J., Vermey, M., Mulder, E., Zegers, N. D., & Van der Kwast, T. H. (1991). Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **7**, 927-936.
74. Liu, D. W. & Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circulation Research* **76**, 351-365.
75. Litovsky, S. H. & Antzelevitch, C. (1988). Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circulation Research* **62**, 116-126.
76. Volders, P. G., Sipido, K. R., Carmeliet, E., Spatjens, R. L., Wellens, H. J., & Vos, M. A. (1999). Repolarizing K^+ currents I_{to1} and I_{Ks} are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation* **99**, 206-210.
77. Haskins, S., Pascoe, P. J., Ilkiw, J. E., Fudge, J., Hopper, K., & Aldrich, J. (2005). Reference cardiopulmonary values in normal dogs. *Comparative medicine* **55**, 156-161.
78. Nalbandov, A. V. (1958). *Reproductive Physiology*, pp. 1-271. W.H Freeman and Company, San Francisco.
79. Giles, W. R. & Imaizumi, Y. (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *Journal of Physiology* **405**, 123-145.
80. Varro, A., Lathrop, D. A., Hester, S. B., Nanasi, P. P., & Papp, J. G. (1993). Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Research in Cardiology* **88**, 93-102.

81. van den Buuse, M. & Malpas, S. C. (1997). 24-hour recordings of blood pressure, heart rate and behavioural activity in rabbits by radio-telemetry: effects of feeding and hypertension. *Physiology & behavior* **62**, 83-89.
82. Canadian Council on Animal Care (1984). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* Ottawa.
83. de Turckheim, M., Berger, M., Jean-Faucher, C., Veyssière, G., & Jean, C. (1983). Changes in ovarian oestrogens in plasma gonadotrophins in female rabbits from birth to adulthood. *Acta Endocrinologica* **103**, 125-130.
84. Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *Journal of General Physiology* **96**, 195-215.
85. Sanguinetti, M. C. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.
86. Dhamoon, A. S., Pandit, S. V., Sarmast, F., Parisian, K. R., Guha, P., Li, Y., Bagwe, S., Taffet, S. M., & Anumonwo, J. M. (2004). Unique Kir2.x Properties Determine Regional and Species Differences in the Cardiac Inward Rectifier K⁺ Current. *Circulation Research* **94**, 1332-1339.
87. Akita, M., Ishii, K., Kuwahara, M., & Tsubone, H. (2001). The daily pattern of heart rate, body temperature, and locomotor activity in guinea pigs. *Experimental animals* **50**, 409-415.
88. Dixon, J. E. & McKinnon, D. (1994). Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circulation Research* **75**, 252-260.
89. Fiset, C., Clark, R. B., Shimoni, Y., & Giles, W. R. (1997). *Shal*-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *Journal of Physiology* **500.1**, 51-64.
90. Clark, R. B., Bouchard, R. A., Salinas-Stefanon, E., Sanchez-Chapula, J., & Giles, W. R. (1993). Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovascular Research* **27**, 1795-1799.

91. Buttner, D. & Wollnik, F. (1982). Spontaneous short-term fluctuations in the daily pattern of heart rate, body temperature and locomotor activity in the laboratory rat. *Laboratory animals* **16**, 319-326.
92. Grohé, C., Kahlert, S., Löbbert, K., Stimpel, M., Karas, R. H., Vetter, H., & Neyses, L. (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters* **416**, 107-112.
93. Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.
94. Fiset, C., Clark, R. B., Larsen, T. S., & Giles, W. R. (1997). A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *Journal of Physiology* **504**, 557-563.
95. Barry, D. M., Xu, H., Schuessler, R. B., & Nerbonne, J. M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α -subunit. *Circulation Research* **83**, 560-567.
96. Xu, H., Barry, D. M., Li, H., Brunet, S., Guo, W., & Nerbonne, J. M. (1999). Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 α subunit. *Circulation Research* **85**, 623-633.
97. Wickenden, A. D., Lee, P., Sah, R., Huang, Q., Fishman, G. I., & Backx, P. H. (1999). Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K^+ channel subunit in the mouse heart. *Circulation Research* **85**, 1067-1076.
98. London, B., Guo, W., Pan, X., Lee, J. S., Shusterman, V., Rocco, C. J., Logothetis, D. A., Nerbonne, J. M., & Hill, J. A. (2001). Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circulation Research* **88**, 940-946.
99. Zaritsky, J. J., Redell, J. B., Tempel, B. L., & Schwarz, T. L. (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *Journal of Physiology* **533**, 697-710.

100. Brouillette, J., Clark, R. B., Giles, W. R., & Fiset, C. (2004). Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of Physiology* **559**, 777-798.
101. Lizotte, E. Localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans le cœur de souris. 2005. Université de Montréal.
Ref Type: Thesis/Dissertation
102. Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M., & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 13612-13617.
103. Karas, R. H., Schulen, H., Pare, G., Aronovitz, M., Ohlsson, C., Gustafsson, J. A., & Mendelsohn, M. E. (2001). Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor α,β (double) knockout mice. *Circulation Research* **89**, 534-539.
104. Iafrati, M. D., Karas, R. H., Aronovitz, M., Kim, S., Sullivan, T. R. J., Lubahn, D., O'Donnel, T. F. J., Korach, K. S., & Mendelsohn, M. E. (1997). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor α -deficient mice. *Nature Medicine* **3**, 545-548.
105. Karas, R. H., Hodgin, J. B., Kwoun, M., Kregge, J. H., Aronovitz, M., Mackey, W., Gustafsson, J. A., Korach, K. S., Smithies, O., & Mendelsohn, M. E. (1999). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor β -deficient female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 15133-15136.
106. Couse, J. F. & Korach, K. S. (1998). Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice. *Journal of Molecular Medicine* **76**, 497-511.
107. Li, G. R., Feng, J., Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1996). Adrenergic Modulation of Ultrarapid Delayed Rectifier K⁺ Current in Human Atrial Myocytes. *Circulation Research* **78**, 903-915.
108. Overpeck, J. G., Colson, S. H., Hohmann, J. R., Applestine, M. S., & Reilly, J. F. (1978). Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and

hamsters: a literature survey. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **4**, 785-803.

109. Mischke, R., Meurer, D., Hoppen, H. O., Ueberschar, S., Hewicker-Trautwein, M., & (2002). Blood plasma concentrations of oestradiol-17 β , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. *Research in Veterinary Science* **73**, 267-272.
110. Pham, T. V., Robinson, R., Danilo, P., & Rosen, M. (2002). Effects of gonadal steroids on gender-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovascular Research* **53**, 752-762.
111. Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E., & Fiset, C. (2005). Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovascular Research* **65**, 148-157.
112. Ruckebusch, Y., Phaneuf, L.-P., & Dunlop, R. (1991). *Physiology of Small and Large Animals* B.C Decker Inc, Philadelphia.
113. Goldfien, A. & Monroe, S. C. (1994). Ovaries. In *Basic & Clinical Endocrinology*, eds. Greenspan, F. S. & Baxter, J. D., Paramount Publishing Business and Professional Group, Norwalk.
114. Liu, X. K., Katchman, A., Drici, M. D., Ebert, S. N., Ducic, I., Morad, M., & Woosley, R. L. (1998). Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **285**, 672-679.
115. Liu, X. K., Wang, W., Ebert, S. N., Franz, M. R., Katchman, A., & Woosley, R. L. (1999). Female gender is a risk factor for torsades de pointes in an in vitro animal model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34**, 287-294.
116. Pham, T., Sosunov, E., Gainullin, R., Danilo, P., & Rosen, M. (2001). Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K-blocking drugs. *Circulation* **103**, 2207-2212.
117. Leblanc, N., Chartier, D., Gosselin, H., & Rouleau, J. L. (1998). Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *Journal of Physiology* **511**, 533-548.

118. Trépanier-Boulay, V., St-Michel, C., Tremblay, A., & Fiset, C. (2001). Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation Research* **89**, 437-444.
119. Drici, M. D., Burklow, T. R., Haridasse, V., Glazer, R. I., & Woosley, R. L. (1996). Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation Research* **94**, 1471-1474.
120. Takimoto, K. & Levitan, E. S. (1994). Glucocorticoid induction of Kv1.5 K⁺ channel gene expression in ventricle of rat heart. *Circulation Research* **75**, 1006-1013.
121. Litwack, G. & Schmidt, T. J. (1997). Biochemistry of hormones II: Steroid hormone. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, ed. Devlin, T. M., pp. 893-918. Wiley-Liss, New York.
122. Lin, A. L., McGill, H. C., & Shain, S. A. (1982). Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. *Circulation Research* **50**, 610-616.
123. Mueller, S. O. & Korach, K. S. (2001). Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **1**, 613-619.
124. Song, M., Helguera, G., Eghbali, M., Zhu, N., Zarei, M. M., Olcese, R., Toro, L., & Stefani, E. (2001). Remodeling of Kv4.3 Potassium Channel Gene Expression under the Control of Sex Hormones. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 31883-31890.
125. Hara, M., Danilo, P. Jr., & Rosen, M. R. (1998). Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **285**, 1068-1072.
126. Brunet, S., Aimond, F., Li, H., Guo, W., Eldstrom, J., Fedida, D., Yamada, K. A., & Nerbonne, J. M. (2004). Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *Journal of Physiology* **559**, 103-120.
127. Wu, Y. & Anderson, M. E. (2002). Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice. *Cardiovascular Research* **53**, 763-769.

128. Brouillette, J., Trepanier-Boulay, V., & Fiset, C. (2003). Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *Journal of Physiology* **546**, 403-413.
129. Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, D. C., Rhodes, K. J., Trimmer, J. S., & Nerbonne, J. M. (2002). Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K^+ current. *Circulation Research* **90**, 586-593.
130. Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H.-S., Cohen, I., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (2001). Regulation of *KChIP2* potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricles. *Journal of Physiology* **553**, 119-125.
131. Di Diego, J. M., Cordeiro, J. M., Goodrow, R. J., Fish, J. M., Zygmunt, A. C., Pérez, G. J., Scornik, F. S., & Antzelevitch, C. (2002). Ionic and Cellular Basis for the Predominance of the Brugada Syndrome Phenotype in Males. *Circulation* **106**, 2004-2011.
132. Rosati, B., Grau, F., Rodriguez, S., Li, H., & Nerbonne, J. M. (2003). Concordant expression of *KChIP2* mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *Journal of Physiology* **548**, 815-822.
133. Bidoggia, H., Maciel, J. P., Capalozza, N., Mosca, S., Blaksley, E. J., Valverde, E., Bertran, G., Arini, P., Biagetti, M. O., & Quinteiro, R. (2000). Sex-dependent electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. *American Heart Journal* **140**, 430-436.
134. Matsuo, K., Akahoshi, M., Seto, S., & Yano, K. (2003). Disappearance of the Brugada-Type Electrocardiogram After Surgical Castration. *Pacing and clinical electrophysiology: PACE* **26**, 1551-1553.
135. Jiang, C., Sarrel, P. M., Poole-Wilson, P. A., & Collins, P. (1992). Effect of 17β -oestradiol on contraction, Ca^{2+} current and intracellular free Ca^{2+} in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology* **263**, H271-H275.
136. Nakajima, T., Iwasawa, K., Oonuma, H., Morita, T., Goto, A., Wang, Y., & Hazama, H. (1999). Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17β -estradiol in cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology* **127**, 429-440.

137. Berger, F., Borchard, U., Hafner, D., Pütz, I., & Weis, T. M. (1997). Effects of 17 β -estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* **356**, 788-796.
138. Kobayashi, T., Yamada, Y., Nagashima, M., Seki, S., Tsutsuura, M., Ito, Y., Sakuma, I., Hamada, H., Abe, T., Tohse, & N. (2003). Contribution of KChip2 to the developmental increase in transient outward current of rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **35**, 1073-1082.
139. Larsen, J. A. & Kadish, A. H. (1998). Effects of gender on cardiac arrhythmias. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **9**, 655-664.
140. Abdel-Rahman, A. A., Merrill, T. H., & Wooles, W. R. (1994). Gender-related difference in the baroreceptor reflex control of heart rate in normotensive humans. *Journal of Applied Physiology* **77**, 606-613.
141. El-Mas, M. M., Afify, E. A., Mohy El-Din, M. M., Omar, A. G., & Sharabi, F. M. (2001). Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **38**, 754-763.
142. Can, I., Aytemir, K., Kose, S., & Oto, A. (2005). Physiological mechanisms influencing cardiac repolarization and QT interval. *Cardiac electrophysiology review* **6**, 278-281.
143. Burke, J. H., Ehlert, F. A., Kruse, J. T., Parker, M. A., Goldberger, J. J., & Kadish, A. H. (1997). Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *American Journal of Cardiology* **79**, 178-181.
144. Nattel, S. (2005). Age, gender, and supraventricular arrhythmias: roles of ion channels, connexins, and tissue architecture? *Heart rhythm* **1**, 397-398.
145. Christensen, G., Wang, Y., & Chien, K. R. (1997). Physiological assessment of complex cardiac phenotypes in genetically engineered mice. *American Journal of Physiology* H2513-H2524.
146. Field, L. J. (1991). Cardiovascular research in transgenic animals. *Trends Cardiovascular Medicine* **1**, 141-146.

147. Beuckelmann, D. J., Nabauer, M., & Erdmann, E. (1993). Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation Research* **73**, 379-385.
148. Kaab, S., Nuss, H. B., Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Pak, P. H., Kass, D. A., Marban, E., & Tomita, F. (1996). Ionic mechanisms of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation Research* **78**, 262-273.
149. Sanguinetti, M. C. & Tristani-Firouzi, M. (2004). Gating of Cardiac Delayed Rectifier K⁺ Channels. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell To Bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 88-95. Elsevier Inc, Philadelphia.
150. Deschênes, I., DiSilvestre, D., Juang, G. J., Wu, R. C., An, W. F., & Tomaselli, G. F. (2002). Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants. *Circulation* **106**, 423-429.
151. Kuo, H. C., Cheng, C. F., Clark, R. B., Lin, J. J. C., Lin, J. L. C., Hoshijima, M., Nguyen-Tran, V. T. B., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu, P. H., Ross, J. Jr., Giles, W. R., & Chien, K. R. (2001). A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107**, 801-813.
152. Balasubramaniam, R., Grace, A. A., Saumarez, R. C., Vandenberg, J. I., & Huang, C. L.-H. (2003). Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1. *Journal of Physiology* **552**, 535-546.
153. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., & Jolicœur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for AIDS-like disease by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **95**, 163-175.
154. Kay, D. G., Yue, P., Hanna, Z., Jothy, S., Tremblay, E., & Jolicœur, P. (2002). Cardiac disease in transgenic mice expressing HIV-1 Nef in cells of the immune system. *American Journal of Pathology* **161**, 321-335.
155. Brouillette, J., Yue, P., Kay, D. G., Jolicœur, P., & Fiset, C. (2005). Lengthening of Cardiac Repolarization in CD4/HIV Transgenic Mice: Implication of the HIV-1 Gene *Nef*. (*destiné à Cell*).

156. Liu, X. K., Katchman, A., Whitfield, B. H., Wan, G., Janowski, E. M., Woosley, R. L., & Ebert, S. N. (2003). In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovascular Research* **57**, 28-36.
157. Kangasniemi, M., Dodge, K., Pemberton, E., Huhtaniemi, I., & Meistrich, M. L. (1996). Suppression of Mouse Spermatogenesis by a Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist and Antiandrogen: Failure to Protect Against Radiation-Induced Gonadal Damage. *Endocrinology* **137**, 949-955.
158. Roy, A. K., Vellanoweth, R. L., Jung, M. H., & Chatterjee, B. (1997). Cellular and molecular effects of androgenic-anabolic steroids. In *Endocrine Toxicology*, eds. Thomas, J. A. & Colby, H. D., pp. 213-225. Taylor & Francis.
159. White, R. E., Darkow, D. J., & Falvo Lang, J. L. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research* **77**, 936-942.
160. Wellman, G. C., Bonev, A. D., Nelson, M. T., & Brayden, J. E. (1996). Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circulation Research* **79**, 1024-1030.
161. Darkow, D. J., Lu, L., & White, R. E. (1997). Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *American Journal of Physiology* **272**, H2765-H2773.
162. Erulkar, S. D., Rendt, J., Nori, R. D., & Ger, B. (1994). The influence of 17 β -oestradiol on K⁺ currents in smooth muscle cells isolated from immature rat uterus. *Proceeding of Royal Society of London B*, 59-65.
163. Boyle, M. B., MacLusky, N. J., Naftolin, F., & Kaczmarek, L. K. (1987). Hormonal regulation of K⁺ channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy. *Nature* **330**, 373-375.
164. Pragnell, M., Snay, K. J., Trimmer, J. S., MacLusky, N. J., Naftolin, F., Kaczmarek, L. K., & Boyle, M. B. (1990). Estrogen induction of a small putative K⁺ channel mRNA in rat uterus. *Neuron* **4**, 807-812.

165. Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y., Toro, L., & Stefani, E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research* **96**, 1208-1216.
166. Larsen, J. A., Tung, R., Sadananda, R., Goldberger, J. J., Horvath, G., Parker, M. A., & Kadish, A. H. (1998). Effects of hormone replacement therapy on QT interval. *American Journal of Cardiology* **82**, 993-995.
167. Korte, T., Fuchs, M., Arkudas, A., Geertz, S., Meyer, R., Gardiwal, A., Klein, G., Niehaus, M., Krust, A., Chambon, P., Drexler, H., Fink, K., & Grohe, C. (2005). Female mice lacking estrogen receptor β display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation* **111**, 2282-2290.
168. Lamberts, S. W., van den Beld, A. W., & van der Lely, A.-J. (1997). The Endocrinology of Aging. *Science* **278**, 419-424.
169. Li, G. R., Feng, J., Yue, L., & Carrier, M. (1998). Transmural heterogeneity of action potential and I_{to} in myocytes isolated from human right ventricle. *American Journal of Physiology* **275**, H369-H377.

Liste des publications

ARTICLES

1. Derakhchan, K., Li, D., Courtemanche, M., Smith, B., Brouillette, J., Pagé, P.L., Nattel, S. A Method For Simultaneous Epicardial and Endocardial Mapping of the in vivo Canine Heart: Application to Atrial Conduction Properties and Arrhythmia Mechanisms. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2001; 12: 548-555.
2. Brouillette, J., Trépanier-Boulay, V., Fiset, C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *Journal of Physiology*. 2003; 546: 403-413.
3. Brouillette, J., Clark, R.B., Giles, W.R., Fiset, C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of Physiology*. 2004; 559 :777-798.
4. Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E., Fiset, C. Sex- and Strain-Differences in Adult Mouse Cardiac Repolarization:Importance of Androgens. *Cardiovascular Research*. 2005; 65(1):148-157.
5. Brouillette, J., Lupien, M-A., St-Michel, C., Fiset, C. Characterization of Cardiac Repolarization in Male and Female Guinea Pig (soumis à *Cardiovascular Research*).
6. Brouillette, J., Kay, D., Ping, Y., Jolicœur P., Fiset, C. Delayed Cardiac Repolarization in HIV Transgenic Mice (destiné à *Cell*).

COMMUNICATIONS

1. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Prolongation de la repolarisation cardiaque chez des souris transgéniques du VIH. IV Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal; juin 2001.
2. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Prolongation de la repolarisation cardiaque chez des souris transgéniques du VIH . Club de recherches cliniques du Québec; *Médecine Sciences*. 2001; Supplément N°2, vol 17:76.
3. Brouillette, J., Yue, P., Fiset, C., Jolicœur, P. Delayed Cardiac Repolarization in HIV Transgenic Mice. Annual meeting of the American Heart Association. *Circulation*. 2001; 104 (17):II-133.
4. Brouillette, J. et Fiset, C. Effet d'une déficience en androgènes sur la repolarisation cardiaque murine. Séminaires des étudiants gradués, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal. Mai 2002.
5. Brouillette, J. et Fiset, C. Effet de la castration sur la repolarisation cardiaque murine. V Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal; Mai 2002.
6. Brouillette, J., Trépanier-Boulay, V., Fiset, C. Gender-based Differences and Hormonal Regulation of Cardiac Repolarization in Mouse, Gordon Research Conference. Cardiac Regulatory Mechanism. New London, Connecticut. 2002
7. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Prolongation of Cardiac Repolarization in HIV Transgenic Mice. Gordon Research Conference. Cardiac Regulatory Mechanism. New London, Connecticut. 2002.
8. Brouillette, J. et Fiset, C. Effet de la déficience en androgènes sur la repolarisation cardiaque murine. Réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec; *Médecine Sciences*. 2002; Supplément N°2, vol 18:103.

COMMUNICATIONS (SUITE)

9. Kay, D., Yue, P., Hanna, Z., Brouillette, J., Jothy, S., Tremblay, E., Fiset, C., Jolicœur, P. Cardiomyopathie chez les souris transgéniques exprimant le gène *Nef* du VIH-1 dans les cellules du système immunitaire. Réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec; *Médecine Sciences*. 2002; Supplément N°2, vol 18:105.
10. Brouillette, J., Trépanier-Boulay, V., Fiset, C. Prolonged Cardiac Repolarization in Castrated Male Mice. 47th Annual meeting of the Biophysical Society. *Biophysical Journal*. 2003; 84 (2): 2066.
11. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Lengthening of Repolarization in HIV Transgenic Mice. Réunion annuelle de l'Association des facultés de pharmacie du Canada. Montréal; Mai 2003.
12. Brouillette, J., Kay, D.G., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Retard de repolarisation chez la souris transgénique du VIH : implication du gène *nef*. VI Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal; juin 2003.
13. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. The Gene *Nef* is Responsible for the Lengthening of Cardiac Repolarization in HIV Mice. Annual meeting of the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 108 (17):IV-119.
14. Brouillette, J., Yue, P., Jolicœur, P., Fiset, C. Le gène *nef* du VIH est responsable du retard de repolarisation cardiaque observé chez la souris transgénique CD4C/HIV. Séminaires des étudiants gradués, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal. Janvier 2004.
15. Brouillette, J., Lizotte, E., Rivard, K., Fiset, C. Importance of Androgens in the Sex- and Strain-Differences in Mouse Cardiac Repolarization. Canadian Society of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology 47th Annual Meeting; Mai 2004.
16. Brouillette, J., Lizotte, E., Rivard, K., Fiset, C. Role of Androgen in the Sex- and Strain-Differences Observed in Adult Mouse Cardiac Repolarization. VII Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal; Juin 2004.

COMMUNICATIONS (SUITE)

17. Brouillette, J., Lizotte, E., Rivard, K., Fiset, C. Sex- and Strain-Differences in Adult Mouse Cardiac Repolarization: Importance of Androgens. 2004 ISHR World Congress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004; 37: 262.

18. Brouillette, J., Fiset, C. Étude des différences mâle/femelle au niveau des propriétés électrophysiologiques cardiaques du cobaye. Séminaires des étudiants gradués, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal. Janvier 2005.

19. Brouillette, J., Lupien, M-A., Fiset, C. Gender Differences in Cardiac Repolarization in Guinea Pig Ventricle. 49th Annual meeting of the Biophysical Society. *Biophysical Journal*. 2005.

20. Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E., Fiset, C. Importance of androgens on cardiac repolarization: Study on different strains of mice. 49th Annual meeting of the Biophysical Society. *Biophysical Journal*. 2005.

21. Brouillette, J., Clark, RB., Giles, W., Fiset, C. A Method for Separating and Discerning the Functional Properties of K⁺ Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. 49th Annual meeting of the Biophysical Society. *Biophysical Journal*. 2005.

22. Brouillette, J., Lupien, M-A., St-Michel, C., Fiset, C. Étude comparative de la repolarisation cardiaque des cobayes mâles et femelles. VIII Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal; Juin 2005.

