

Université de Montréal

**Mécanismes électrophysiologiques responsables de
l'augmentation de la fréquence cardiaque induite par les
œstrogènes lors de la grossesse**

par Valérie Long

Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Juillet 2019

© Valérie, 2019

Résumé

Une accélération de la fréquence cardiaque (FC) au repos est observée chez les femmes enceintes. Au dernier trimestre, la FC accélère en moyenne de 15%, ce qui représente un facteur de risque dans le développement d'arythmies *de novo* ou dans l'exacerbation d'arythmies cardiaques préexistantes. Ceci est dangereux pour la mère ainsi que pour le fœtus. Cependant, les mécanismes responsables de ce changement cardiovasculaire restent peu connus.

Notre laboratoire a récemment démontré que la grossesse était associée à une augmentation de la densité du courant pacemaker (I_f) et du courant calcique de type L (I_{CaL}), ainsi qu'à des changements de l'homéostasie calcique dans les cellules de nœud sinusal (NS) de souris. Sachant que les concentrations plasmatiques en œstrogènes sont significativement augmentées pendant la grossesse et que ces hormones sexuelles féminines ont la capacité de modifier les propriétés électrophysiologiques du cœur, l'hypothèse de ce projet de recherche est que les œstrogènes jouent un rôle important dans l'augmentation de la FC associée à la grossesse et régulent les propriétés électrophysiologiques du NS. Les objectifs de ce projet de recherche sont de déterminer le rôle du 17β -œstradiol (E_2) dans l'augmentation de la FC, d'examiner si ces effets sont régulés par les récepteurs aux œstrogènes alpha ($ER\alpha$) et/ou bêta ($ER\beta$) ainsi que d'évaluer les différents mécanismes de régulation de l' E_2 sur l'électrophysiologie du NS.

Des souris femelles adultes non-gestantes (2-4 mois) déficientes en $ER\alpha$ (ERKO α) ou en $ER\beta$ (ERKO β) ont reçu un traitement chronique à l' E_2 (30 μ g deux fois par jour pendant quatre jours) simulant les concentrations plasmatiques en E_2 retrouvées en fin de grossesse (23,3 \pm 5,0 nM) chez la souris. L'analyse des électrocardiogrammes de surface montrent que la FC des souris ERKO β (ERKO β : 511 \pm 15 bpm; ERKO β + E_2 : 580 \pm 10 bpm, n = 10, p < 0,001) est significativement accélérée suivant le traitement à l' E_2 . Toutefois, la FC demeure inchangée chez les souris ERKO α (ERKO α : 520 \pm 16 bpm; ERKO α + E_2 : 530 \pm 21 bpm, n = 7, p = 0,114). La méthode du patch-clamp en mode courant-imposé a permis de démontrer une accélération de l'automatisme des cellules du NS des souris ERKO β suivant le traitement à l' E_2 , se traduisant par une augmentation de la fréquence des potentiels d'action spontanés

(ERKO β : 284 ± 24 bpm, n = 8; ERKO β +E $_2$: 354 ± 23 bpm, n = 15, p = 0,0395) et par une pente de dépolarisation diastolique plus rapide (ERKO β : 82 ± 12 mV/s, n = 8; ERKO β +E $_2$: 140 ± 14 mV/s, n = 15, p < 0,003). En lien avec ces résultats, le patch-clamp en mode voltage-imposé a permis de démontrer que la densité de I $_f$ est augmentée suivant un traitement à l'E $_2$ (à -90 mV : ERKO β : $-6,6 \pm 0,7$ pA/pF, n = 12-15; ERKO β +E $_2$: -11 ± 1 pA/pF, n = 9-11, p < 0,05). Cependant, I $_f$ est similaire chez les souris ERKO α traitées ou non à l'E $_2$. De plus, des cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites de type nodal (N-hiPSC-CM) ont une accélération de la fréquence des potentiels d'action (CTL : 69 ± 5 bpm, n = 12; +E $_2$: 99 ± 6 bpm, n = 14, p < 0,001) ainsi qu'une augmentation de la densité de I $_f$ (à -90 mV : CTL : $-0,95 \pm 0,14$ pA/pF, n = 7-10; +E $_2$: $-1,62 \pm 0,17$ pA/pF, n = 13-14, p < 0,05) suivant le traitement à l'E $_2$. L'administration d'E $_2$ ne modifie pas la fréquence des transitoires calciques des cellules de NS des souris ERKO α (139 ± 15 , n = 13-14; +E $_2$: 142 ± 14 , n = 15-16, p = ns) et ERKO β (142 ± 11 , n = 14-15; +E $_2$: 147 ± 13 , n = 15-16, p = ns). En lien avec ces résultats, le courant I $_{CaL}$ des N-hiPSC-CM est inchangé suivant le traitement d'E $_2$ (à 0 mV : CTL : $-14,0 \pm 1,3$ pA/pF, n = 12-13; +E $_2$: $-14,5 \pm 1,4$ pA/pF, n = 22, p = ns).

En conclusion, l'accélération de l'automaticité cardiaque associée à la grossesse est, entre autres, expliquée par une augmentation de la densité de I $_f$, régulée par la voie de signalisation E $_2$ -ER α . Cependant, les changements de l'homéostasie calcique observés pendant la grossesse sont indépendants des niveaux élevés en œstrogènes. Les résultats obtenus sur les N-hiPSC-CM concordent avec ce qui est observé dans les cellules de NS de souris, ce qui démontre l'applicabilité humaine des résultats. Notre étude contribue à élucider l'influence de la grossesse et le rôle des hormones sexuelles féminines sur la fonction du NS et l'automaticité cardiaque. Ultiment, notre travail pourrait aider à développer une meilleure gestion des arythmies associées aux fluctuations hormonales féminines et/ou à la grossesse.

Mots-clés : Grossesse, Nœud sinusal, Automaticité cardiaque, Œstrogènes, Récepteurs aux œstrogènes, Courant pacemaker (I $_f$), Courant calcique de type L (I $_{CaL}$), Homéostasie calcique, Transitoires calciques, Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines de type nodal (N-hiPSC-CM)

Abstract

An increased heart rate (HR) is observed in pregnant women. In fact, in the last trimester, in average, the HR increases by 15%, which is a known risk factor to developing cardiac arrhythmias or exacerbating pre-existing arrhythmias. This can lead to major consequences for both the mother and fetus. However, the mechanisms underlying this increased HR remain largely unexplored.

Our laboratory recently demonstrate that pregnancy is associated with an increased density of the pacemaker current (I_f) and the L-type calcium current (I_{CaL}) as well as changes in calcium homeostasis of mouse sinoatrial node (SAN) cells. Knowing that estrogens are increased during pregnancy and that these sex hormones can modify cardiac electrophysiological properties, we hypothesized that estrogens play a key role in the pregnancy-induced increased HR and regulate the SAN electrophysiological properties. Our research project aims to determine the role of 17β -estradiol (E_2) on the pregnancy-induced increased HR, to determine if these effects are regulated through estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) and/or beta ($ER\beta$) and to study the E_2 underlying mechanisms on SAN electrophysiology.

Non-pregnant female mice (2-4 months) lacking $ER\alpha$ ($ERKO\alpha$) or $ER\beta$ ($ERKO\beta$) received a chronic E_2 treatment (30 μ g twice daily for four days) mimicking E_2 concentrations found in late pregnancy (23.3 ± 5.0 nM). Surface electrocardiogram analysis showed a significant increased HR in $ERKO\beta$ mice ($ERKO\beta$: 511 ± 15 bpm; $ERKO\beta + E_2$: 580 ± 10 bpm; $n = 10$; $p < 0.001$) following E_2 administration. However, the HR remains unchanged in $ERKO\alpha$ mice ($ERKO\alpha$: 520 ± 16 bpm; $ERKO\alpha + E_2$: 530 ± 21 bpm, $n = 7$, $p = 0.114$). Following E_2 treatment, current-clamp method demonstrates an increase SAN cells automaticity in $ERKO\beta$ mice, resulting in an increase in the spontaneous action potential frequency ($ERKO\beta$: 284 ± 24 bpm, $n = 8$; $ERKO\beta + E_2$: 354 ± 23 bpm, $n = 15$, $p = 0.0395$), associated with a steeper diastolic depolarization slope ($ERKO\beta$: 82 ± 12 mV/s, $n = 8$; $ERKO\beta + E_2$: 140 ± 14 mV/s, $n = 15$, $p < 0.003$), a major determinant of cardiac automaticity. In line with these results, voltage-clamp data showed an increased I_f density in SAN cells of $ERKO\beta$ mice treated with E_2 (at -90 mV: $ERKO\beta$: -6.6 ± 0.7 pA/pF, $n = 12-15$; $ERKO\beta + E_2$: -

11.0 ± 1.3 pA/pF, n = 9-11, p < 0.05). Nevertheless, I_f density was similar in E₂-treated ERKO α mice. E₂-treated nodal-like human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (N-hiPSC-CM) also showed an increased spontaneous action potential frequency (CTL : 69 ± 5 bpm, n = 12; +E₂ : 99 ± 6 bpm, n = 14, p < 0.001) and I_f density (at -90 mV: CTL: -0.95 ± 0.14 pA/pF, n = 7-10; +E₂: -1.62 ± 0.17 pA/pF, n = 13-14, p < 0.05). Following E₂ administration, the rate of calcium transient was similar in SAN cells from ERKO α (139 ± 15, n = 13-14; +E₂ : 142 ± 14, n = 15-16, p = ns) and ERKO β (142 ± 11, n = 14-15; +E₂ : 147 ± 13, n = 15-16, p = ns) mice. In line with these results, no modification was seen on I_{CaL} density in E₂-treated N-hiPSC-CM (at 0 mV: CTL: -14.0 ± 1.3 pA/pF, n = 12-13; +E₂: -14.5 ± 1.4 pA/pF, n = 22, p = ns).

In conclusion, the increased cardiac automaticity observed during pregnancy is, in part, explained by an increased I_f density. This mechanism is mediated by the E₂-ER α pathway. In the other hand, calcium homeostasis changes detected during pregnancy appear to be mediated by an E₂-independent mechanism. Finally, results obtained on N-hiPSC-CM are consistent with our observations on mouse SAN cells, demonstrating the human applicability of our results. This study provides novel insight on the effects of female sex hormones on the SAN functions. Ultimately, this information can lead to improved management of arrhythmias associated with female hormone fluctuations and/or pregnancy-induced arrhythmias.

Keywords: Pregnancy, Sinoatrial node, Cardiac automaticity, Estrogens, Estrogen receptor, Pacemaker current (I_f), L-type calcium current (I_{CaL}), Calcium homeostasis, Calcium transient, Nodal-like human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (N-hiPSC-CM)

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Changements cardiovasculaires associés à la grossesse.....	1
1.1.1 Le cœur.....	1
1.1.2 Le système de conduction cardiaque.....	1
1.1.3 Circulation sanguine normale.....	2
1.1.4 La grossesse.....	4
1.1.5 Changements hémodynamiques.....	4
1.1.6 Fonction cardiaque.....	4
1.1.7 Arythmies.....	6
1.1.7.1 Traitement des arythmies.....	7
1.1.8 Période post-partum.....	8
1.2 Hormones.....	8
1.2.1 Changements hormonaux pendant la grossesse.....	8
1.2.2 Les œstrogènes.....	9
1.2.3 Production d'œstrogènes pendant la grossesse.....	10
1.2.4 Effets cardiovasculaires des œstrogènes.....	10
1.3 Récepteurs aux œstrogènes.....	11
1.3.1 Récepteurs aux œstrogènes alpha (ER α) et bêta (ER β).....	11
1.3.2 Structure de ER α et ER β	13
1.3.3 Voies de signalisation des ER.....	13
1.3.4 Autres récepteurs aux œstrogènes.....	15

1.4	Électrocardiogramme de surface.....	16
1.5	Électrophysiologie du nœud sinusal	18
1.5.1	Morphologie des cellules du nœud sinusal	18
1.5.2	Potentiel d'action	19
1.5.3	Voltage Clock	20
1.5.3.1	Courant pacemaker (I_f)	20
1.5.3.2	Courant calcique de type T (I_{CaT}).....	23
1.5.3.3	Courant calcique de type L (I_{CaL}).....	23
1.5.3.4	Composante rapide du courant potassique à rectification retardée (I_{Kr}).....	24
1.5.3.5	Autres courants ioniques du nœud sinusal.....	24
1.5.4	Calcium Clock	25
1.5.5	Coupled Clock	27
1.5.6	Système nerveux autonome	28
1.5.6.1	Système nerveux sympathique.....	28
1.5.6.2	Système nerveux parasympathique.....	30
1.5.7	Différences entre l'humain et la souris	30
1.6	La souris comme modèle animal	31
1.6.1	Différences entre les femelles et les souris femelles	31
1.7	Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC-CM) 32	
1.7.1	Limites des hiPSC-CM	32
1.8	Mise en contexte	34
1.9	Hypothèses.....	35
1.10	Objectifs.....	35
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
2.1	Animaux.....	37
2.2	Génotypage	37
2.3	Reproduction animale	38
2.4	Traitement hormonal au 17β -œstradiol.....	39
2.5	Prélèvement sanguin intracardiaque	39
2.6	Concentrations plasmatiques de 17β -œstradiol	39

2.7	Électrocardiogramme de surface.....	40
2.8	Isolation des cellules du nœud sinusal.....	42
2.9	Électrophysiologie cellulaire.....	43
2.10	Transitoires calciques.....	47
2.11	Culture cellulaire des cellules N-hiPSC-CM.....	49
2.12	Analyses statistiques.....	50
3	RÉSULTATS.....	51
3.1	Concentrations plasmatiques en 17β-œstradiol (E ₂).....	51
3.2	Fréquence cardiaque des souris traitées au 17β-œstradiol.....	54
3.3	Potentiels d'action spontanés des cellules de NS et de type nodal.....	57
3.3.1	Souris ERKOβ.....	57
3.3.2	Cellules N-hiPSC-CM.....	59
3.4	Courant pacemaker I _f des cellules de NS et des hiPSC-CM de type nodal.....	61
3.4.1	Souris ERKOβ.....	61
3.4.2	Souris ERKOα.....	61
3.4.3	Cellules N-hiPSC-CM.....	64
3.5	Homéostasie calcique.....	66
3.5.1	Transitoires calciques.....	66
3.5.1.1	Transitoires calciques spontanés.....	66
3.5.1.2	Transitoires calciques induits par la caféine.....	68
3.5.2	Courant calcique de type L (I _{CaL}).....	70
4	DISCUSSION.....	72
4.1	Résumé des principaux résultats.....	72
4.2	Régulation du courant pacemaker I _f par les œstrogènes dans d'autres tissus.....	73
4.3	Régulation du courant calcique de type L (I _{CaL}) par les œstrogènes.....	73
4.4	Courant calcique total et courant calcique de type T.....	76
4.5	Mécanismes potentiels de régulation des HCN par des concentrations élevées en œstrogènes.....	78
4.6	Implications cliniques potentielles.....	79
4.7	Limites de l'étude.....	80
4.8	Perspectives.....	81

5	CONCLUSION.....	84
6	BIBLIOGRAPHIE.....	85
7	ANNEXE 1 : Curriculum vitae abrégé.....	i

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau I. Comparaison des courants ioniques et des connexines présents dans les cellules du nœud sinusal entre l'homme et la souris	30
---	-----------

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau II. Amorces utilisées pour le génotypage des souris C57BL/6 ERK0α et ERK0β.....	38
Tableau III. Paramètres d'analyse de l'électrocardiogramme de surface	42
Tableau IV. Signification des différents paramètres des transitoires calciques.....	49

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1.	Système de conduction cardiaque.....	2
Figure 2.	Circulation sanguine normale.....	3
Figure 3.	Changements hémodynamiques associés à la grossesse	5
Figure 4.	Hypertrophie cardiaque associée à la grossesse.....	6
Figure 5.	Hormones associées à la grossesse.....	9
Figure 6.	Structures des récepteurs aux œstrogènes alpha et bêta.....	12
Figure 7.	Récepteurs aux œstrogènes et leurs voies de signalisation	14
Figure 8.	Paramètres de l'électrocardiogramme (ECG) de surface.....	17
Figure 9.	Différents types cellulaires cardiaques.....	19
Figure 10.	Paramètres du potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal .	21
Figure 11.	Paramètres du <i>voltage clock</i> impliqués dans le potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal.....	22
Figure 12.	Paramètres du <i>coupled clock</i> impliqués dans le potentiel d'action spontané et l'homéostasie calcique des cellules du nœud sinusal	26
Figure 13.	Rôles du système nerveux autonome dans l'automaticité du nœud sinusal.....	29
Figure 14.	Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites.....	33

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 18.	Paramètres d'analyse des électrocardiogrammes de surface	41
Figure 19.	Configurations possibles pour la technique de patch-clamp	44
Figure 20.	Patch-clamp en mode voltage-imposé.....	45
Figure 21.	Représentation d'un enregistrement de transitoires calciques.....	48

RÉSULTATS

Figure 22.	Concentrations plasmatiques basales en 17β -œstradiol des souris des lignées CD-1 et C57BL/6	52
------------	--	----

Figure 23.	Concentrations plasmatiques en 17β-œstradiol mesurées chez les souris CD-1 SNG et les souris C57BL/6 (WT, ERKOα, ERKOβ) traitées à l'E₂.....	53
Figure 24.	Fréquence cardiaque avant et après le traitement à l'E₂ dans les quatre groupes de souris.....	55
Figure 25.	Mesure des paramètres des ECG	56
Figure 26.	Potentiels d'action spontanés des cellules de nœud sinusal des souris ERKOβ traitées à l'E₂.....	58
Figure 27.	Potentiels d'action spontanés des hiPSC-CM de type nodal traitées à l'E₂.....	60
Figure 28.	Courant pacemaker (I_f) des cellules de nœud sinusal des souris ERKOβ traitées à l'E₂.	62
Figure 29.	Courant pacemaker (I_f) des cellules de nœud sinusal des souris ERKOα traitées à l'E₂.	63
Figure 30.	Courant pacemaker (I_f) des cellules N-hiPSC-CM traitées ou non à l'E₂.	65
Figure 31.	Paramètres des transitoires calciques spontanés des souris WT, ERKOα et ERKOβ traitées à l'E₂.....	67
Figure 32.	Paramètres des transitoires calciques induits par la caféine des souris WT, ERKOα et ERKOβ traitées à l'E₂	69
Figure 33.	Courant calcique de type L des cellules N-hiPSC-CM traitées à l'E₂.....	71

DISCUSSION

Figure 34.	Courant calcique soustrait des cellules N-hiPSC-CM	77
-------------------	---	-----------

Liste des sigles et des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AC : adénylate cyclase

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP1 : *activator protein 1*

ARNm : acide ribonucléique messenger

Asp⁻ : ion aspartate

ATP : adénosine triphosphate

β1-AR : récepteur β1 adrénergique

Bpm: battements par minute

Ca²⁺ : ion calcique

Ca_v : canal calcique activé par le voltage

Cx : connexine

E₁ : œstrone

E₂ : 17β-œstradiol

E₃ : œstriol

ECG : électrocardiogramme

ER : récepteur aux œstrogènes

ERα : récepteur aux œstrogènes alpha

ERβ : récepteur aux œstrogènes bêta

ERE : élément de réponse aux œstrogènes

ERKOα : souris déficiente en récepteur aux œstrogènes alpha de la lignée C57BL/6

ERKOβ : souris déficiente en récepteur aux œstrogènes bêta de la lignée C57BL/6

ERR : *Estrogen Related Receptor*

FC : fréquence cardiaque

GPER30 : récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G

hCG : gonadotrophine chorionique humaine

HCN : Canaux cationiques activés par hyperpolarisation et liaison d'AMPc
(*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*)

HR : *heart rate*

I_F : courant pacemaker
 I_{CaL} : courant calcique de type L
 I_{CaT} : courant calcique de type T
 I_{Kr} : composante rapide du courant potassique à rectification retardée
 I_{K1} : courant potassique à rectification entrante
 I_{to} : courant potassique transitoire sortant indépendant du calcium
iPSC-CM : cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites à partir de tissu humain
IV : courant-voltage
 K^+ : ion potassique
KB : solution physiologique de Kraft-Brühe
 K_v : canal potassique activé par le voltage
M2 : récepteur muscarinique
mg : milligramme
mL : millilitre
mM : millimolaire
ms : milliseconde
mV : millivolt
 Na^+ : ion sodique
NAV : nœud auriculo-ventriculaire
NCX1 : échangeur sodium-calcium
N-hiPSC-CM : cardiomyocytes de type nodaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites à partir de tissu humain
nM : nanomolaire
ns : non significatif
NS : nœud sinusal
 P_4 : progestérone
pA : picoAmpère
PA: potentiel d'action
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
pF : picoFarad

PKA: protéine kinase A
PLB: phospholamban
PP : souris post-partum de lignée CD-1
QTc: intervalle QT corrigée
RLX : relaxine
Rpm : rotation par minutes
RyR2 : récepteur à la ryanodine de type 2
SERCA2a : pompe calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique
SG : souris gestante de lignée CD-1
SNG : souris non gestante de lignée CD-1
SNP : polymorphisme nucléotidique
SP1 : *stimulatory protein 1*
TSV : tachycardie supraventriculaire
WT : souris *wild-type* de lignée C57BL/6

Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui ont su me soutenir et m'encourager.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dre Céline Fiset, qui a été à la fois ma directrice de maîtrise et mon mentor. Tout a commencé lorsque Dre Fiset m'a donné la chance de faire un stage d'été dans son laboratoire et qu'elle m'a par la suite offert d'entreprendre des études aux cycles supérieurs dans son laboratoire. Je ne remercierai jamais assez Dre Fiset pour cette formation et expérience exceptionnelle. En plus des nombreuses connaissances scientifiques acquises, Dre Fiset m'a appris à persévérer et à avoir confiance en moi.

J'aimerais spécialement remercier mon collègue et copain, Simon Thibault, pour son importante contribution scientifique quant au développement de mon projet de recherche, à l'acquisition des données ainsi qu'à son incroyable soutien, sa patience et ses encouragements.

Je remercie mes collègues qui font ou qui ont fait partie du laboratoire de Dre Fiset : Julie Demers, Nathalie Éthier, Patrice Naud, Édouard Marcoux, Anh-Tuan Ton et Nabil El Khoury, sans qui l'ambiance et mon expérience en laboratoire n'auraient pas été les mêmes. J'aimerais aussi souligner l'excellent travail des stagiaires (Mélodie Larose, Anne-Sophie Otis, Clara Girard et Amélie Lecourt) qui ont participé à l'acquisition des données de mon projet.

Mon projet de maîtrise n'aurait pas pu être complété sans l'expertise technique de Marc-Antoine Gillis et Louis Villeneuve, deux employés hautement qualifiés du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, qui ont respectivement participé à l'acquisition des données des électrocardiogrammes de surface de souris et des transitoires calciques des cellules de nœud sinusal de souris.

Je remercie les membres de mon comité aviseur (Dre Michèle Brochu et Dre Cathy Vaillancourt) d'avoir été présents lors des rencontres ainsi que pour leur contribution scientifique. Je remercie aussi les membres de mon comité évaluateur de mémoire (Dre Lucie Parent et Dr Gaétan Mayer) d'avoir pris le temps de lire mon mémoire et pour leurs corrections constructives quant à son écriture.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien constant et leurs encouragements quant à mon cheminement académique.

1 INTRODUCTION

1.1 Changements cardiovasculaires associés à la grossesse

1.1.1 Le cœur

Le cœur est formé de cellules musculaires, plus communément appelées cardiomyocytes. Contrairement aux autres cellules du corps, les cardiomyocytes ne se divisent pas. En fait, de la naissance à l'âge adulte, le cœur est composé du même nombre de cardiomyocytes. Pendant la croissance, le cœur grossit grâce à l'allongement de ses cellules. C'est ce que l'on appelle une hypertrophie physiologique.¹

Le cœur est composé de quatre cavités principales, soient deux oreillettes et deux ventricules. Lors de la diastole (relaxation), les oreillettes et les ventricules se remplissent de sang. Lors de la systole (contraction), les oreillettes transfèrent le sang aux ventricules, tandis que les ventricules propulsent le sang dans la circulation. Il est important de noter que lorsque les oreillettes sont en systole, les ventricules sont en diastole et vice-versa.

1.1.2 Le système de conduction cardiaque

Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires qui se contractent de manière synchronisée afin d'engendrer un battement cardiaque. Chacun de ces battements est précédé d'une stimulation électrique se propageant dans le cœur par le système de conduction électrique (figure 1).²

Les stimulations électriques prennent naissance dans le nœud sinusal (NS). L'influx se propage dans l'oreillette droite par les faisceaux internodaux et dans l'oreillette gauche par le faisceau de Bachmann, ce qui permet la dépolarisation des oreillettes. Par la suite, l'influx se rend au nœud auriculo-ventriculaire (NAV), qui comme son nom l'indique, est situé à la jonction entre les oreillettes et les ventricules. Lorsque le NAV est atteint, l'influx peut se propager dans les ventricules par les faisceaux de His et les fibres de Purkinje, permettant la dépolarisation des ventricules.

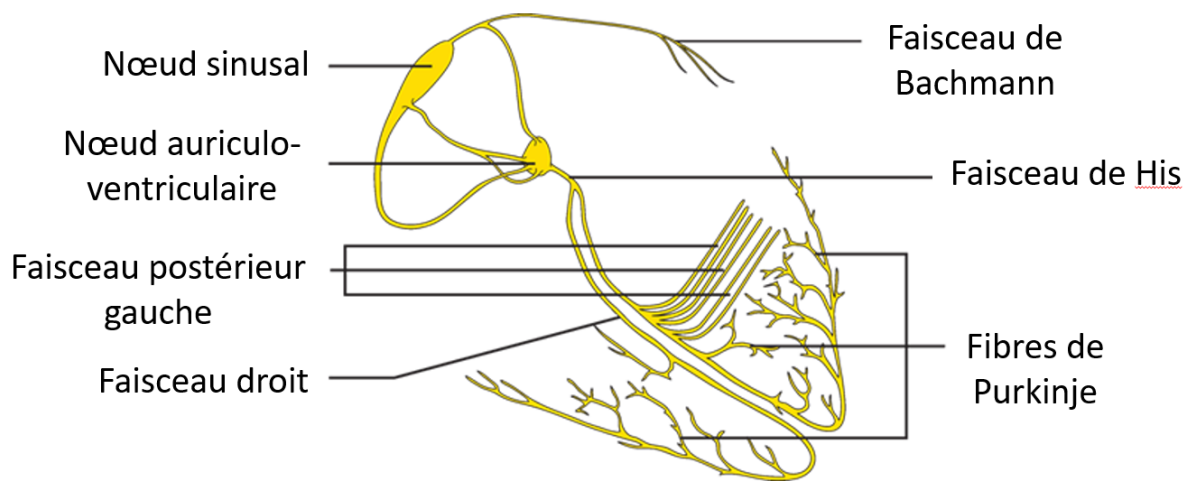


Figure 1. Système de conduction cardiaque. L'influx électrique débute dans le nœud sinusal et se poursuit dans l'oreillette droite pour se rendre jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire (NAV). Finalement, l'influx électrique passe dans les ventricules par les faisceaux de His (droit et gauche) puis dans les fibres de Purkinje (adapté de Wikimedia Commons).

1.1.3 Circulation sanguine normale

Le ventricule gauche propulse le sang oxygéné par l'aorte (figure 2). Le sang rejoint alors la circulation systémique dans le but d'irriguer les différents organes et tissus, tel le foie, les intestins, l'estomac et les muscles, à l'exception des poumons. Le sang, maintenant pauvre en oxygène et en nutriments, retourne au cœur par les veines caves (supérieures et inférieures) donnant accès à l'oreillette droite. Par la suite, il est transféré de l'oreillette droite au ventricule droit par la valve tricuspide. Le ventricule droit propulse le sang vers les poumons (circulation pulmonaire) par les artères pulmonaires afin qu'il soit oxygéné. Finalement, le sang retourne au cœur par les veines pulmonaires dans l'oreillette gauche pour être transféré au ventricule gauche par la valve mitrale.

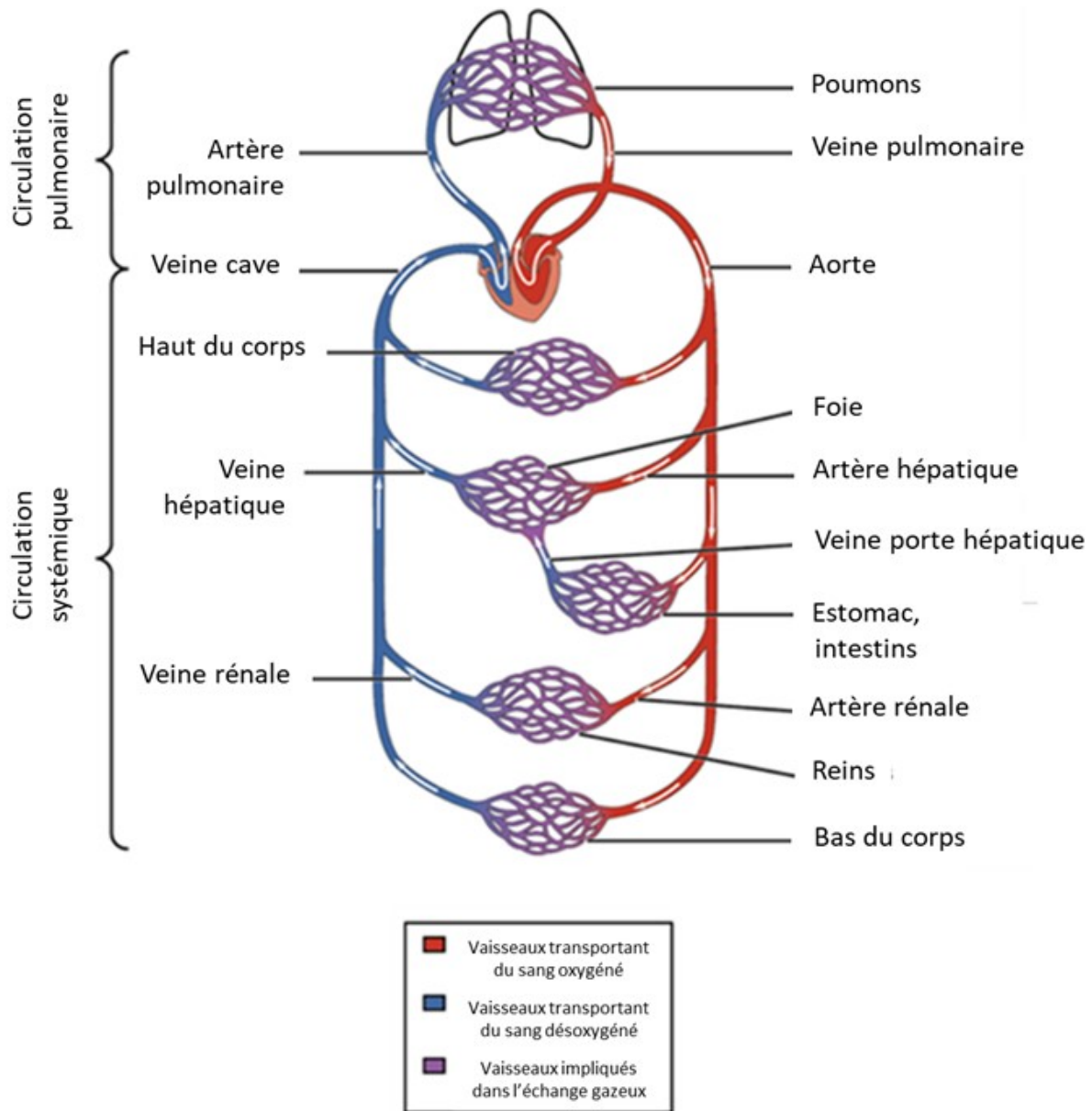


Figure 2. Circulation sanguine normale. Le sang oxygéné (rouge) est propulsé par le ventricule gauche dans la circulation sanguine systémique permettant l'oxygénation et l'apport en nutriments des différents tissus et organes (i.e. foie, muscles, intestins, cerveau). Par la suite, le sang désoxygéné (bleu) retourne vers le ventricule droit. Ce dernier propulse le sang vers la circulation pulmonaire permettant d'oxygéner à nouveau le sang (adapté de Wikimedia Commons).

1.1.4 La grossesse

La grossesse est une condition qui occasionne plusieurs changements physiologiques, à la fois hémodynamiques et cardiovasculaires, qui sont observés dès les premières semaines de gestation (4 à 5 semaines).³ Ces modifications sont, entre autres, causées par une plus grande demande physiologique, provenant principalement du placenta et du fœtus⁴, et s'accroissent tout au long des 40 semaines de grossesse.

1.1.5 Changements hémodynamiques

Pendant la grossesse, le placenta impose des demandes supplémentaires au système cardiovasculaire. En effet, il devient un organe supplémentaire à irriguer afin d'y apporter l'oxygène et tous les nutriments nécessaires au bon développement du fœtus. Ainsi, le volume sanguin augmente jusqu'à 50%⁵, le débit cardiaque accélère³ (figure 3A) et la résistance vasculaire diminue.⁶ De tels changements augmentent la demande cardiovasculaire⁴ et entraînent des modifications de la fonction cardiaque chez la mère.

1.1.6 Fonction cardiaque

Lors de la grossesse chez les femmes, la fréquence cardiaque au repos augmente en moyenne de 15%⁵ et peut s'élever jusqu'à 25% (figure 3A). Ceci permet, entre autres, de répondre à l'augmentation de la demande physiologique et aux différents changements hémodynamiques. De plus, pendant les 40 semaines de gestation, le cœur subit une hypertrophie due à une augmentation de la taille des cardiomyocytes ventriculaires (figure 4).⁶ Les chambres ventriculaires s'élargissent et un changement proportionnel de l'épaisseur de la paroi est observé.⁸ Contrairement à l'hypertrophie pathologique (excentrique ou concentrique), l'hypertrophie observée pendant la grossesse est de nature physiologique. En effet, aucun marqueur d'hypertrophie pathologique n'est augmenté pendant la grossesse.^{1, 7} De plus, elle est réversible en période post-partum, soit près de six mois suivant l'accouchement.

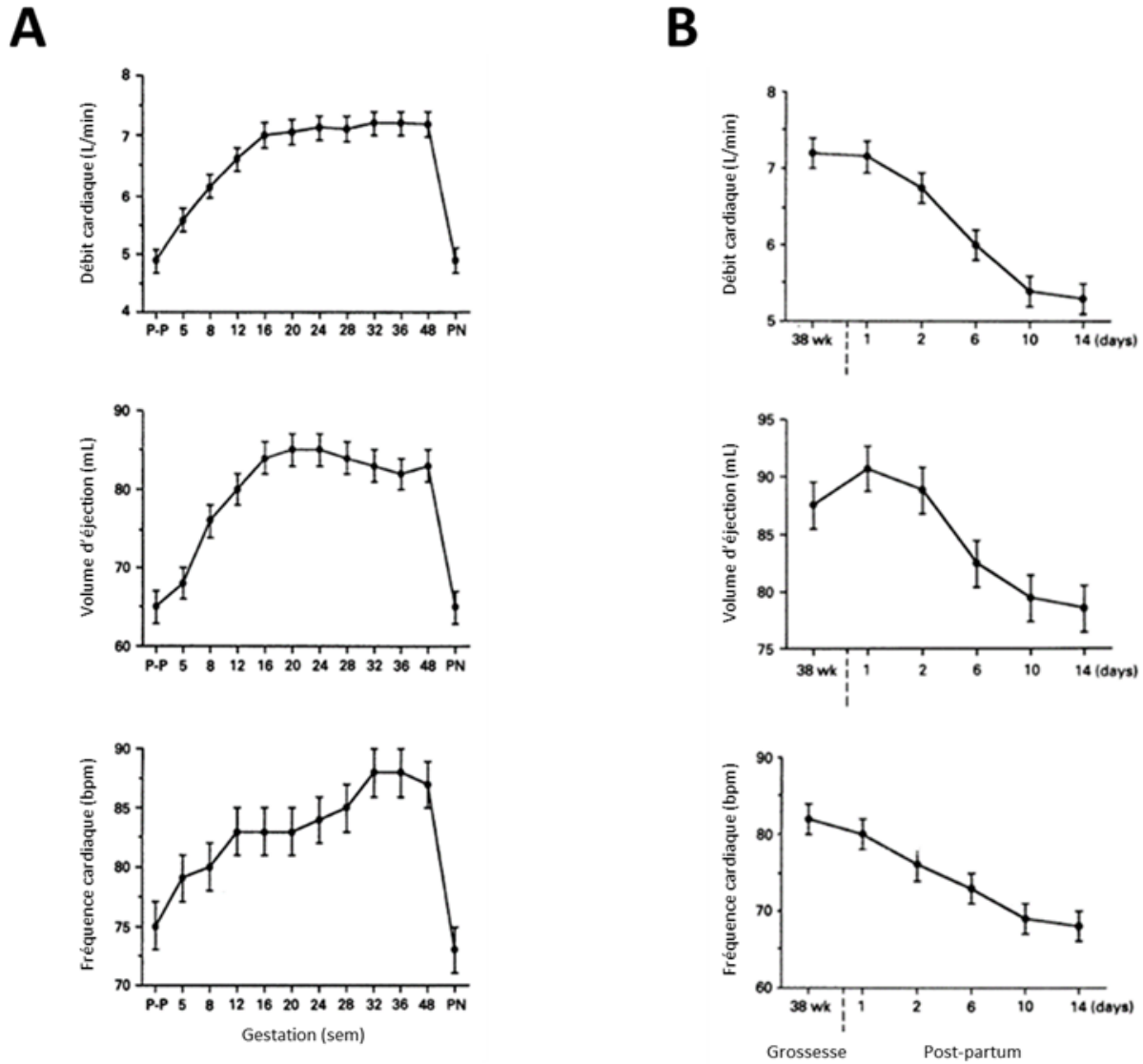


Figure 3. Changements hémodynamiques associés à la grossesse. (A) La grossesse est associée à une augmentation du débit cardiaque, du volume d'injection et de la fréquence cardiaque. De plus, ces changements s'accroissent en fonction des semaines de gestation. (B) Retour basal des paramètres hémodynamiques en post-partum. Normalement, ces changements retournent à des valeurs basales 14 jours suivant l'accouchement (adapté de Hunter *et al*³).

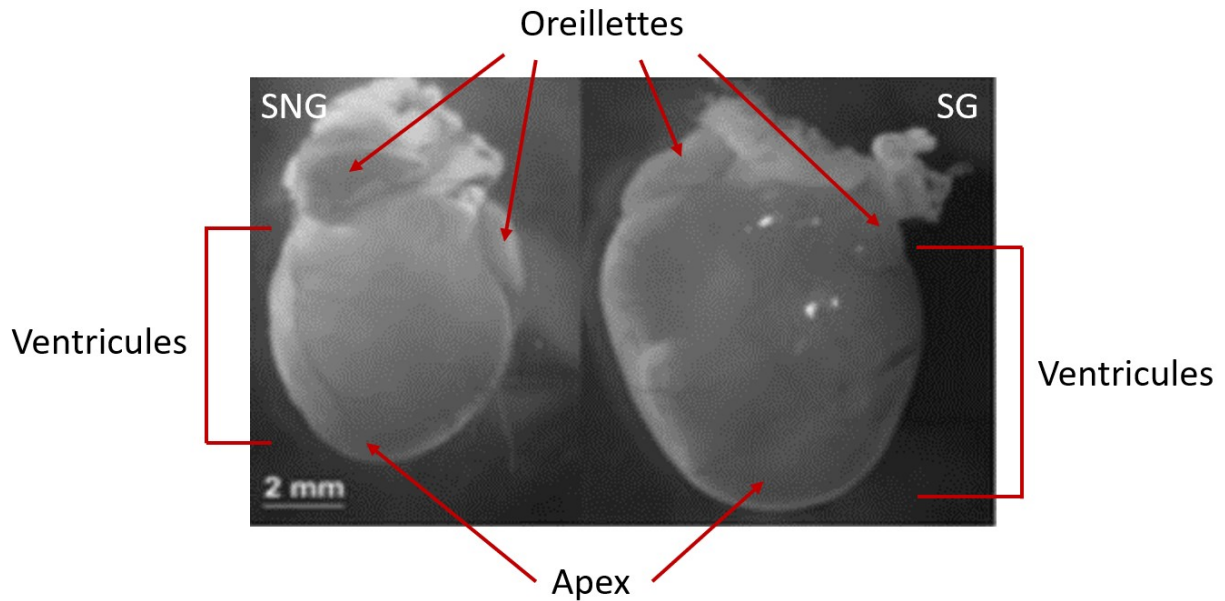


Figure 4. Hypertrophie cardiaque associée à la grossesse. Illustration d'un cœur de souris non-gestante (SNG) à gauche et d'une souris en fin de grossesse (SG) à droite. La portion des ventricules est grandement augmentée pendant la grossesse, due à un allongement des cardiomyocytes. Ce changement morphologique permet de combler la demande physiologique plus élevée. Cette hypertrophie est réversible en post-partum (adapté de Eghbali *et al*¹).

1.1.7 Arythmies

Une augmentation de la fréquence cardiaque au repos est un facteur de risque connu d'arythmies. En effet, ceci peut générer des arythmies cardiaques *de novo*, c'est-à-dire des nouvelles arythmies, ou même exacerber des arythmies préexistantes chez les femmes enceintes.

Les arythmies supraventriculaires sont le problème cardiaque le plus fréquent chez les femmes enceintes.⁵ En effet, dans plus de 50% des grossesses, les femmes développent des arythmies.⁴ Les arythmies supraventriculaires peuvent être néfastes pour la santé de la mère ainsi que pour le fœtus.⁹ En fait, elles entraînent une mauvaise contraction des oreillettes, ce qui affecte le passage du sang des oreillettes vers les ventricules. De ce fait, un plus petit

volume de sang est acheminé aux organes et tissus de la mère ainsi qu'au placenta. En conséquence, moins d'oxygène et de nutriments sont disponibles pour la mère et le fœtus. De plus, les arythmies chez les femmes enceintes peuvent provoquer, chez 20% des fœtus, un accouchement prématuré, un faible poids à la naissance, des problèmes respiratoires et cardiovasculaires ainsi qu'un décès intra-utérin ou néonatal.^{10, 11} Chez les femmes, les arythmies peuvent mener à un œdème pulmonaire, un accident vasculaire cérébrale ou à la nécessité d'un traitement pharmacologique (β -bloqueurs).

Parmi les différents types d'arythmies survenant chez les femmes enceintes, on retrouve, entre autres, de la tachycardie supraventriculaire (TSV), de la tachycardie nodale, des palpitations symptomatiques, des battements ectopiques et des arythmies de réentrée.^{4,9} La TSV est l'arythmie la plus fréquente pendant la grossesse. En effet, 34% des femmes développent cette arythmie et elle est exacerbée jusqu'à 50% chez les femmes ayant des épisodes de TSV préexistants.¹²⁻¹⁴ Finalement, très rarement, les femmes enceintes peuvent avoir de la tachycardie ventriculaire, de la fibrillation auriculaire, un flutter auriculaire, de la bradycardie et même un arrêt cardiaque ($< 0,01\%$).^{4,5}

1.1.7.1 Traitement des arythmies

Le traitement et la gestion des arythmies chez les femmes enceintes est complexe. En effet, la pharmacocinétique des médicaments est différente chez la femme enceinte en raison d'une modification de la biodisponibilité et l'élimination. Ceci peut être expliqué par (1) une augmentation du débit sanguin rénal, c'est-à-dire d'une filtration glomérulaire plus grande et d'une élimination possiblement plus rapide du médicament, (2) une augmentation du métabolisme hépatique, (3) des changements de la motilité gastrique et (4) un plus grand volume de distribution.⁴ La complexité thérapeutique des arythmies chez les femmes enceintes s'accroît en sachant que certains traitements pharmacologiques peuvent être néfastes pour le fœtus. En effet, la prise de médicament chez les femmes enceintes peut entraîner de la tératogénicité, un risque sur la croissance et le système cardiovasculaire du fœtus. Dans le cas où le traitement pharmacologique est dangereux pour le développement adéquat du fœtus, les femmes ayant un problème cardiovasculaire peuvent choisir de cesser leur médication. Par

contre, tel que décrit plus haut, des arythmies fréquentes chez la femme enceinte peuvent aussi affecter la santé du fœtus.

1.1.8 Période post-partum

Les changements cardiovasculaires observés chez la femme pendant la grossesse apparaissent rapidement. Certains d'entre eux, tels les changements hémodynamiques, sont réversibles une à deux semaines suivant l'accouchement (figure 3B).³ Toutefois, certaines modifications, telle l'hypertrophie cardiaque, peuvent persister plusieurs mois après l'accouchement.¹⁵ Par ailleurs, les changements hémodynamiques, tel le débit cardiaque, le volume d'éjection et la résistance vasculaire, observés chez les femmes enceintes sont généralement accentués lors des grossesses subséquentes.¹⁵

1.2 Hormones

1.2.1 Changements hormonaux pendant la grossesse

Plusieurs hormones fluctuent pendant la grossesse. On retrouve, entre autres, une augmentation des hormones sexuelles féminines (œstrogènes et progestérone), des hormones thyroïdiennes, de la relaxine, de l'ocytocine et de la prolactine. Tous ces changements ont un rôle important pendant la grossesse ou lors de l'accouchement.

Dès le début de la grossesse, les concentrations plasmatiques des œstrogènes (E_2) et de la progestérone (P_4), deux hormones impliquées dans le cycle menstruel, sont augmentées de manière significative (figure 5). À la 40^e semaine de grossesse, les concentrations d' E_2 et de P_4 atteignent respectivement 30 et 500 nM.¹⁶ Dès l'accouchement, les concentrations plasmatiques de ces hormones chutent à des niveaux retrouvés dans le cycle menstruel (E_2 : ~3 nM; P_4 : ~120 nM).¹⁶ Il est important de noter que ce sont des valeurs moyennes et qu'elles peuvent différer d'une femme à une autre. Ce mémoire sera focalisé sur les œstrogènes.

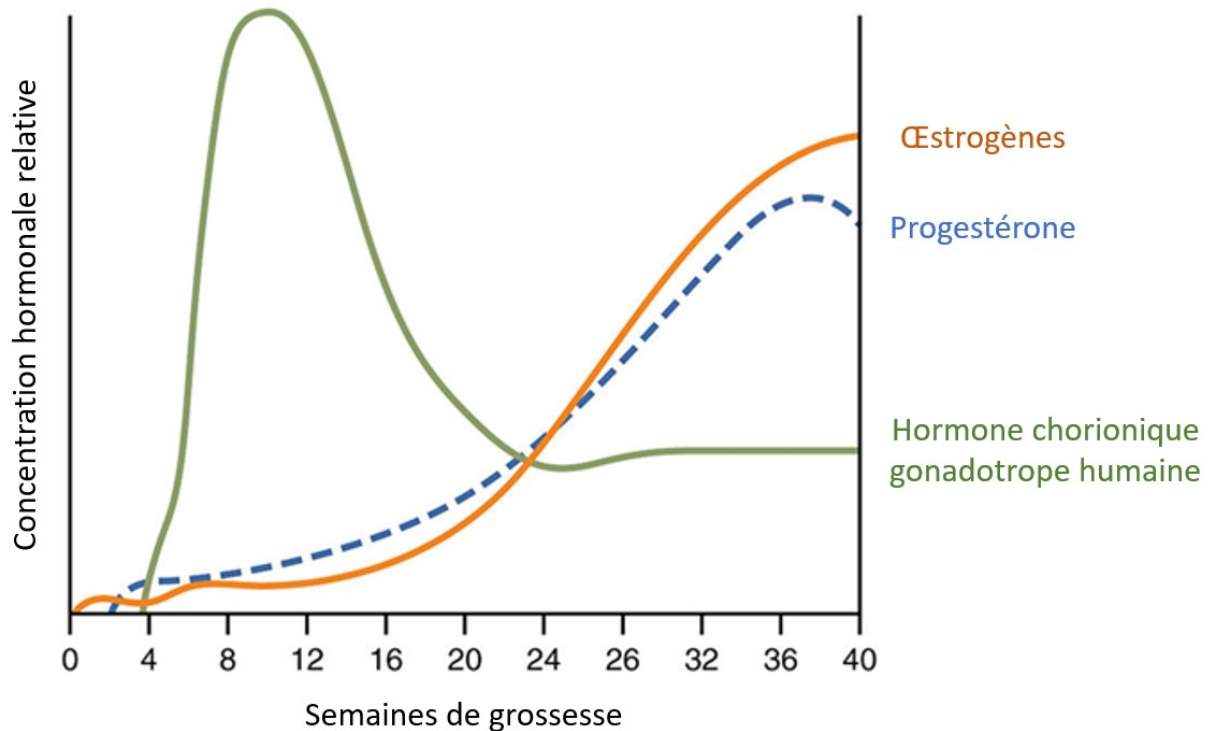


Figure 5. Hormones associées à la grossesse. Dès les premières semaines de grossesse, les concentrations d'œstrogènes et de progestérone augmentent proportionnellement en fonction des trimestres. En début de grossesse, l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) permet la production des hormones sexuelles par les ovaires, mais lorsque la hCG chute après le premier trimestre, la production d'œstrogènes et de progestérone provient principalement du placenta. En raison de sa concentration très élevée en début de grossesse, la hCG est l'hormone qui est mesurée dans les tests de grossesse (adapté de Wikimedia Commons).

1.2.2 Les œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol et elles sont de nature hydrophobique.^{17, 18} Les œstrogènes sont une famille d'hormones incluant principalement trois hormones naturelles circulantes. On retrouve l'œstrone (E_1), le 17 β -œstradiol (E_2) et l'œstriol (E_3).^{19, 20} C'est l' E_2 qui est l'œstrogène la plus abondante.^{21, 22}

Les œstrogènes sont principalement produites par les ovaires chez les femmes, et par les testicules chez les hommes. Toutefois, les concentrations plasmatiques retrouvées chez les hommes sont beaucoup plus faibles (0,1 à 0,7 nM)²³ comparativement à celles des femmes, et c'est pourquoi on dit des œstrogènes qu'elles font partie des hormones sexuelles féminines.²²

Chez les femmes ménopausées ou ayant subies une ovariectomie, c'est-à-dire une ablation des ovaires, les concentrations circulantes d'œstrogènes chutent drastiquement, mais leur production ne cesse pas complètement. En effet, les œstrogènes peuvent aussi être produites en plus faible quantité par les glandes surrénales, les seins, les os et le tissu adipeux.^{22, 24} Chez ces femmes, les concentrations plasmatiques en œstrogènes sont similaires à celles retrouvées chez les hommes.²³

Les œstrogènes ont d'importants rôles à jouer dans le développement, la croissance et la régulation des organes reproducteurs. Elles jouent aussi un rôle dans le système cardiovasculaire, les muscles squelettiques, les os, le métabolisme, le système immunitaire, le système nerveux central et même le comportement.^{19-21, 25-27}

1.2.3 Production d'œstrogènes pendant la grossesse

Pendant les deux premiers mois de grossesse, il y a une production forte et rapide de la hCG (figure 5). Celle-ci permet de maintenir le corps jaune dans l'ovaire, et par le fait même, de maintenir la production et la sécrétion d'œstrogènes.²⁴ Lorsque les concentrations de hCG diminuent vers la fin du premier trimestre, le placenta commence à sécréter des œstrogènes et en devient la principale source de production.

1.2.4 Effets cardiovasculaires des œstrogènes

Les œstrogènes sont les hormones sexuelles féminines qui sont associées à un effet cardioprotecteur pour certaines maladies cardiovasculaires, dont les maladies coronariennes. En effet, les femmes pré-ménopausées ayant une production normale d'œstrogènes ont un risque moins élevé de développer des maladies cardiovasculaires, comparées aux hommes du même âge.^{22, 28} De plus, suite à un infarctus du myocarde, elles ont moins de risque de développer une hypertrophie des ventricules ou un remodelage cardiaque.^{28, 29}

Dix ans suivant la ménopause, la prévalence des maladies cardiovasculaires chez les femmes s'élève et devient semblable à celle des hommes.^{28, 30} Toutefois, comparées aux hommes du même âge, les femmes ménopausées ont une plus faible tolérance à l'ischémie^{31, 32} et un plus grand risque de décéder d'un infarctus du myocarde.³³ Ces événements sont aussi observés chez les femmes étant ovariectomisées²⁸, c'est-à-dire, des femmes ayant subi une ablation chirurgicale des ovaires et ne produisant plus suffisamment d'œstrogènes.

Les effets cardioprotecteurs des œstrogènes sont, entre autres, médiés par les récepteurs aux œstrogènes. Des mutations de type SNP (polymorphisme nucléotidique) ont été observées sur les gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes. Ces SNP sont associés à certaines maladies cardiovasculaires, telles les maladies coronariennes ou l'infarctus du myocarde, chez les femmes pré-ménopausées.²² Ainsi, une mutation sur l'ADN qui code pour les récepteurs aux œstrogènes peut réduire l'effet cardioprotecteur des œstrogènes.

1.3 Récepteurs aux œstrogènes

1.3.1 Récepteurs aux œstrogènes alpha (ER α) et bêta (ER β)

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et de la famille des récepteurs des stéroïdes.³⁴ Il existe différents types de ER. Les principaux isoformes des ER sont le alpha (ER α) ainsi que le bêta (ER β), et leur affinité pour les œstrogènes est similaire.^{28, 35, 36}

Les deux isoformes des ER possèdent une homologie structurelle de 60%.³⁷ ER α et ER β sont encodés par différents gènes (*ESR1* et *ESR2*, respectivement) sur des chromosomes différents, soit les chromosomes 6 et 14, respectivement.³⁸⁻⁴⁰ Contrairement à l'humain, le gène *Esr1* de la souris est sur le chromosome 10.⁴¹ Le ER α a un poids moléculaire de 66 kDa,⁴² tandis que le ER β a un poids moléculaire de 60 kDa.^{25, 30, 35, 38, 39, 43} Le domaine de liaison au ligand (domaine E sur la figure 6) des ER α et ER β est hautement conservé entre les espèces. Le domaine E des ER α et ER β est identique à 89% et 88%, respectivement, à celui de l'humain.^{44, 45}

Les ER α et ER β sont tous les deux présents dans le système cardiovasculaire des humains, des souris et des rats.^{22, 30, 46} Dans les cardiomyocytes, on les retrouve dans le cytosol

et au niveau de la membrane nucléaire. Seuls les ER α sont retrouvés à la membrane plasmique des cardiomyocytes.³⁰ Les œstrogènes peuvent se lier à n'importe lequel de ces récepteurs, que ce soit ceux à la membrane plasmique, dans le cytosol ou sur la membrane nucléaire. En effet, grâce à la nature hydrophobique des œstrogènes, ils peuvent passer facilement la membrane cellulaire et pénétrer les cellules.^{17, 18, 21}

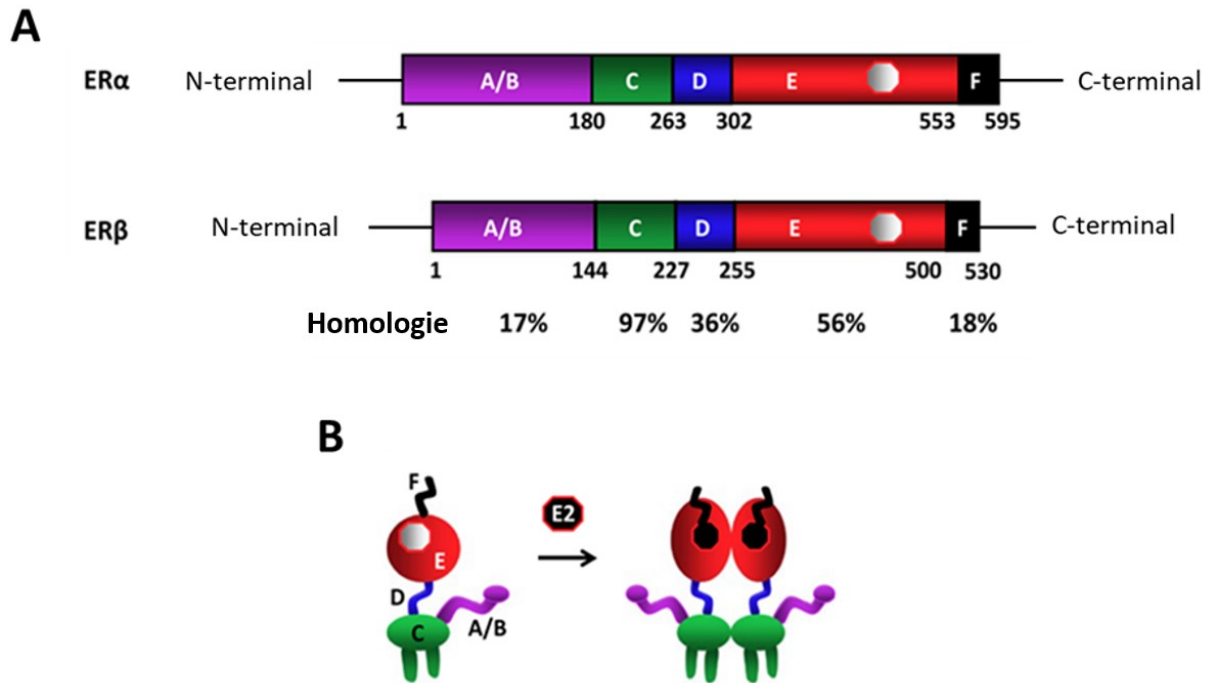


Figure 6. Structures des récepteurs aux œstrogènes alpha et bêta. (A) Les deux isoformes ER α et ER β possèdent une structure semblable. **(B)** La liaison de l'E₂ sur les ER engendre une dimérisation qui produit une réponse génomique ou non-génomique (adapté de Yasar *et al*²¹).

Les deux isoformes des ER sont présents dans le système cardiovasculaire et les vaisseaux sanguins. Les ER α se retrouvent aussi dans les ovaires, l'utérus, les seins, les testicules, l'épididyme, l'hypophyse, les muscles squelettiques, le tissu adipeux, les os et le foie. Pour leur part, les ER β sont présents dans les ovaires, la prostate, les testicules, les os, les poumons, le système nerveux central et le cerveau.^{21, 25, 47}

1.3.2 Structure de ER α et ER β

Les deux récepteurs aux œstrogènes possèdent une homologie structurale (figure 6A) et sont composés de domaines fonctionnels semblables.^{25, 34, 48, 49}

Domaine A/B : Le domaine A/B est le domaine le plus près du N-terminal (figure 6). Ce domaine encode le segment «*activation function 1*» (AF1). Ce dernier est responsable des interactions protéine-protéines (ex : co-régulateurs) et contribue à l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes. La fonction de AF1 est indépendante de la liaison entre les œstrogènes et leurs récepteurs.

Domaine C : Ce domaine est important dans la régulation de l'expression des gènes. En fait, il permet la liaison des ER à des séquences spécifiques d'ADN. On y retrouve aussi deux doigts de zinc importants dans la dimérisation des récepteurs aux œstrogènes.

Domaine D : Région de modifications post-traductionnelles.

Domaine E/F : Le domaine E/F est le domaine le plus près du C-terminal. Ce domaine encode le segment «*activation function 2*» (AF2). La structure et la fonction de AF2 dépend de la liaison des œstrogènes sur leurs récepteurs. Le domaine E/F est aussi responsable de la liaison du ligand à son récepteur, dans la dimérisation des récepteurs ainsi qu'à la translocation des ER vers le noyau.

1.3.3 Voies de signalisation des ER

Les ER α et ER β peuvent agir par au moins quatre voies de signalisation (figure 7).

Voie #1 : Cette voie de signalisation est indépendante des œstrogènes. Celle-ci est employée sans même qu'un ligand se lie sur le récepteur, mais plutôt suite à la phosphorylation des récepteurs aux œstrogènes.⁴⁸ Les ER peuvent être phosphorylés directement par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC), ou indirectement par une signalisation impliquant des agents extracellulaires, telles des cytokines, des facteurs de croissance et des neurotransmetteurs.⁵⁰⁻⁵⁴

Voie #2 : Cette voie de signalisation dépend de la liaison des œstrogènes ou d'un autre ligand (ex : modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, tel le tamoxifène) sur les récepteurs.

Les ligands se lient sur les récepteurs au niveau de la membrane cellulaire pour ensuite activer une cascade de signalisation. Des effets non-génomiques peuvent être observés, par exemple, la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Ces effets apparaissent normalement rapidement²⁸, soit en quelques minutes seulement.⁵⁵

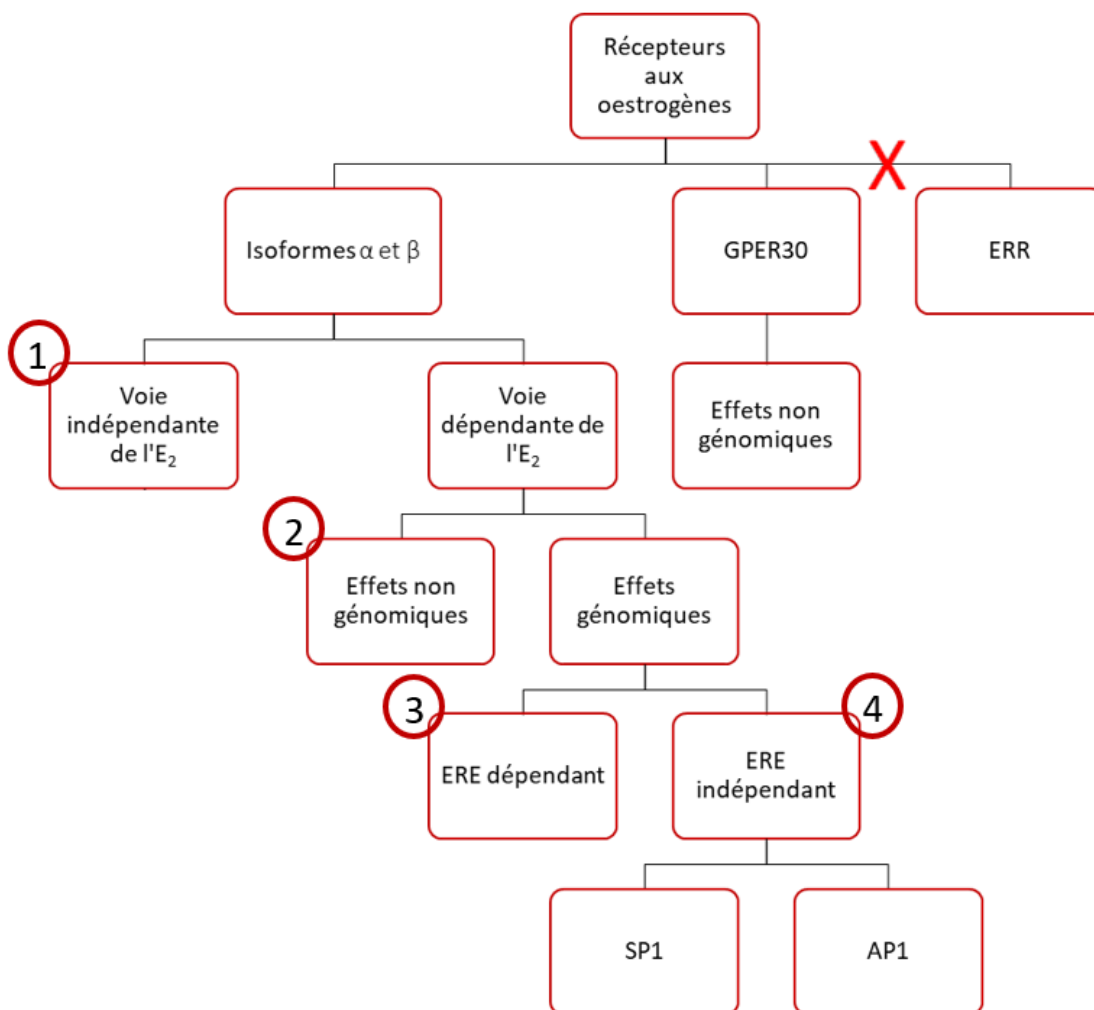


Figure 7. Récepteurs aux œstrogènes et leurs voies de signalisation. Les principaux ER sont les isoformes ER α et ER β . Ils peuvent engendrer plusieurs voies de signalisation. **(1)** Effets non-génomiques indépendants de l'E₂. **(2)** Effets non-génomiques dépendants de l'E₂. **(3)** Effets génomiques dépendants de l'E₂ et des ERE. **(4)** Effets génomiques dépendants de l'E₂ et indépendants des ERE. Les GPER30 représentent un autre type de récepteurs aux œstrogènes. Lorsque l'E₂ s'y lie, des effets non-génomiques sont observés. Les ERR ont une structure semblable aux ER α et ER β . Toutefois, les œstrogènes ne peuvent pas s'y lier.

Les voies de signalisation 3 et 4 sont toutes les deux dépendantes de la liaison des œstrogènes ou d'un autre ligand aux ER. Contrairement à la voie #2, les ligands se lient sur les ER situés dans le cytosol ou à la membrane du noyau. Les effets générés sont de nature génomiques (ex : régulation de l'expression des protéines).^{28, 56} Ces effets génomiques apparaissent plus lentement, soit en quelques heures ou jours.

Voie #3 : On dit que cette voie de signalisation est dépendante des éléments de réponses aux œstrogènes (ERE). Les ERE sont des séquences spécifiques de l'ADN qui précèdent le promoteur de certains gènes. Ils sont encodés par la séquence de nucléotides suivante : 5'-GGTCAnnnTGACC-3', où le *n* représente n'importe quel nucléotide.^{21, 34, 57} Lorsque les œstrogènes se lient aux ER, ces derniers se dimérisent (figure 6B) et transloquent au noyau.^{34, 46} Une fois dans le noyau, les ER se lient sur la séquence ERE, ce qui permet la transcription des gènes.

Voie #4 : La dernière voie de signalisation des ER α et ER β est indépendante des ERE, c'est-à-dire que la régulation des gènes ne se fait pas par la liaison ER-ERE. En fait, les ER peuvent interagir avec les protéines SP1 (*stimulatory protein 1*)⁵⁸ et AP1 (*activator protein 1*),⁵⁹ des facteurs de transcription qui ont leur propre séquence régulatrice sur l'ADN.²¹ En d'autres termes, lorsque les œstrogènes se lient aux ER, ces derniers régulent l'expression des gènes en se liant à SP1 ou AP1. Lorsque les ER sont liés à ces protéines régulatrices, les gènes peuvent être transcrits et ainsi être régulés à la hausse ou à la baisse.

1.3.4 Autres récepteurs aux œstrogènes

Les GPER30 (*G protein-coupled estrogen receptor 1*) font partis de la famille des récepteurs aux œstrogènes⁶⁰ et ont récemment été découverts. Ce sont des récepteurs couplés à une protéine G et ils possèdent sept passages transmembranaires.^{60, 61} Ces derniers sont retrouvés dans le système cardiovasculaire (oreillettes et ventricules)⁶² ainsi que dans les vaisseaux sanguins.²⁸ Ces récepteurs semblent être localisés à différents endroits dans la cellule et la liaison des œstrogènes à ceux-ci engendre une réponse rapide et non-génomique,⁶³ telle de la vasodilatation⁶⁰ et une stimulation de la production d'AMPc.^{22, 61}

On retrouve aussi les ERR (*Estrogen Related Receptor*), qui sont des récepteurs orphelins situés à la membrane nucléaire des cellules.⁶⁴ Pour l'instant, il existe trois différentes

isoformes, soient alpha, bêta et gamma.^{46, 48, 65} Les ERR présentent des similitudes dans leur structure par rapport aux ER α et ER β , surtout pour les domaines C, E et F.⁴⁸ Par contre, ni les œstrogènes, ni les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes peuvent s'y lier.⁴⁸

Bref, il existe plusieurs types de récepteurs aux œstrogènes et ils peuvent engendrer plusieurs effets via différentes voies de signalisation. Ce mémoire sera concentré sur les deux principaux ER, soient ER α et ER β .

1.4 Électrocardiogramme de surface

Un électrocardiogramme de surface (ECG) permet de mesurer l'activité électrique du cœur. En effet, les électrodes permettent d'enregistrer la dépolarisation et la repolarisation des oreillettes et des ventricules en percevant le passage de l'influx électrique à travers le cœur. Chaque battement cardiaque est représenté par un cycle sur l'ECG et leur analyse permet, entre autres, de mesurer la fréquence cardiaque (FC) et d'identifier des arythmies cardiaques.

Lorsque le nœud sinusal envoie un influx électrique, celui-ci passe en premier lieu dans les oreillettes. Sur l'ECG, ce passage se traduit par l'onde P (figure 8), représentant la dépolarisation des oreillettes. Par la suite, il y a un retour à la ligne isoélectrique, ce qui représente en fait le passage de l'influx électrique dans le NAV. L'intervalle PR représente le temps de conduction auriculo-ventriculaire (i.e. le temps requis à l'influx pour passer des oreillettes aux ventricules). Le segment PR représente, quant à lui, l'influx électrique traversant le NAV. La durée de l'onde P peut aussi être mesurée par la soustraction des deux paramètres suivants : intervalle PR - segment PR. L'amplitude de repolarisation des oreillettes est trop faible pour être mesurée sur l'ECG. Le passage de l'influx électrique dans les faisceaux de His et les fibres de Purkinje est représenté par le complexe QRS sur l'ECG. Le QRS est composé de trois ondes et représente la dépolarisation des ventricules. La dernière onde du cycle est l'onde T et représente la repolarisation des ventricules. Le temps de repolarisation ventriculaire est représenté par l'intervalle QT. Cet intervalle est mesuré à partir du début de l'onde Q jusqu'à la fin de l'onde T.

Sur l'ECG, les ondes peuvent être perçues différemment, dépendamment de l'emplacement des électrodes et de la dérivation utilisée lors de l'enregistrement. Il existe

plusieurs dérivations permettant la lecture de l'activité électrique cardiaque entre deux électrodes. L'activité électrique peut ainsi être enregistrée dans des angles différents selon la dérivation utilisée.

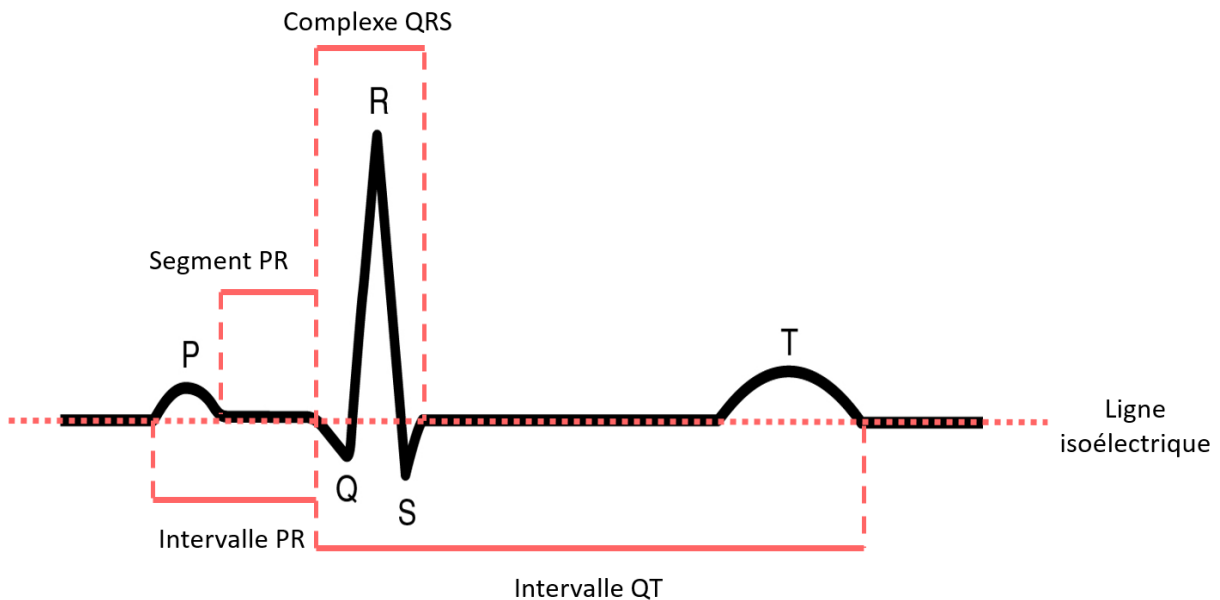


Figure 8. Paramètres de l'électrocardiogramme (ECG) de surface. Exemple d'ECG sur lequel sont présentés l'onde P (dépolariation des oreillettes), l'intervalle PR (temps de propagation de l'influx entre les oreillettes et le NAV), le segment PR (temps requis pour traverser le NAV), le complexe QRS (dépolariation des ventricules) et l'intervalle QT (repolarisation des ventricules). La ligne isoélectrique (ligne pointillée rouge) permet de déterminer si les ondes sont positives ou négatives (adapté de Wikimedia Commons).

1.5 Électrophysiologie du nœud sinusal

Le nœud sinusal (NS) est le pacemaker naturel du cœur. En fait, les cellules du NS sont dotées d'une activité électrique spontanée, c'est-à-dire que les cellules peuvent battre par elles-mêmes sans aucune stimulation externe. Les cellules du NS ont le rôle d'envoyer des influx électriques dans le cœur et chacun de ceux-ci permet d'initier un battement cardiaque.⁶⁶ Ainsi, en condition physiologique, le NS est responsable de l'automatisme cardiaque et par le fait même de la fréquence cardiaque. Par exemple, une automaticité plus rapide du NS signifie un plus grand nombre d'influx électriques envoyés dans les cellules cardiaques et ainsi, un plus grand nombre de battements par minute.

1.5.1 Morphologie des cellules du nœud sinusal

Physiologiquement, le NS est situé dans l'oreillette droite, près de la veine cave supérieure et à la jonction de la crista terminalis.⁶⁷ Les cellules du NS diffèrent des cardiomyocytes composant les oreillettes et les ventricules.⁶⁸ En effet, contrairement aux cellules ventriculaires et auriculaires qui sont plutôt en forme de bâtonnets, les cellules de NS ont une forme courbée et irrégulière (figure 9). Les canaux et les courants ioniques ainsi que les protéines contribuant à l'automaticité des cellules du NS diffèrent des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires (voir sections 1.5.2 à 1.5.5)

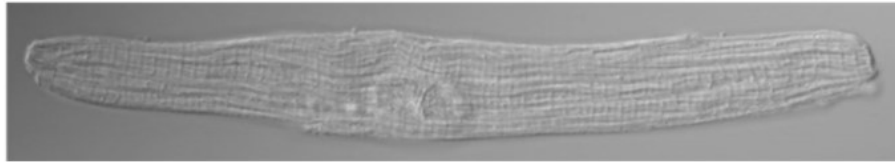
À la figure 9, il est possible d'observer des stries sur les cellules de ventricule et d'oreillette. Celles-ci représentent en fait les myofilaments d'actine et de myosine permettant la contraction de ces cellules. Les cellules du NS n'ont généralement pas ces stries puisqu'elles ne se contractent pas. Elles envoient plutôt un influx électrique de manière spontanée et synchronisée.⁶⁹

À la membrane cellulaire, on retrouve des protéines appelées connexines (Cx). Les Cx permettent l'échange des petites molécules et des ions entre les cellules et elles contribuent à la propagation de l'influx électrique. Dans le NS, on retrouve principalement la Cx45,⁶⁹ tandis que dans les ventricules ce sont les Cx43 et dans les oreillettes, principalement la Cx40.⁶⁹

Cellules du
nœud sinusal



Cellule
d'oreillette



Cellule de
ventricule

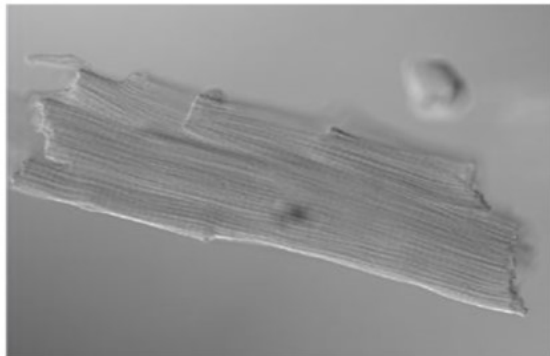


Figure 9. Différents types cellulaires cardiaques. Il existe trois principaux types de cardiomyocytes. Leur morphologie, leur taille ainsi que leurs propriétés électrophysiologiques diffèrent. Les cellules du NS possèdent une activité électrique spontanée. Ce sont de petites cellules ayant une forme courbée et chaque cellule a une morphologie plutôt irrégulière. Les cellules des oreillettes et des ventricules sont en forme de bâtonnet. Ces cellules sont formées de stries permettant leur contraction.

1.5.2 Potentiel d'action

Chaque influx électrique envoyé par les cellules du NS se traduit par un potentiel d'action (PA). Le PA des cellules du NS diffère de celui des cardiomyocytes contractiles. Tout d'abord, entre chaque PA, les cardiomyocytes contractiles ont ce que l'on appelle un potentiel de repos (potentiel stable entre -80 et -90 mV). Les cellules de NS n'ont pas ce potentiel de

repos puisqu'elles battent spontanément. De plus, la phase plateau normalement retrouvée dans les ventricules et les oreillettes n'est pas présente dans le NS.⁶⁹ En conséquence, les courants ioniques permettant les PA du NS sont différents de ceux retrouvés dans les ventricules et les oreillettes.

Différents paramètres déterminent l'automaticité du NS. On retrouve premièrement le potentiel diastolique maximale (MDP : *Maximal Diastolic Potential*), la phase de dépolarisation diastolique (DD) ainsi que le potentiel seuil (Eth : *Action Potential Threshold*)⁶⁶ (figure 10).

1) MDP : Le MDP est le voltage le plus négatif atteint lors du PA des cellules du NS. À ces voltages, il y a activation d'un courant ionique important dans l'automaticité cardiaque, soit le courant pacemaker (I_f) (section 1.5.3.1). Lorsque le MDP est à des potentiels trop positifs ou négatifs, ceci réduit ou supprime l'automaticité des cellules du NS puisque I_f ne peut pas s'activer.

2) Phase DD : La phase de dépolarisation diastolique est importante dans l'automaticité du NS et plusieurs courants ioniques y contribuent (voir prochaine section). Une DD plus rapide résulte en une automaticité cardiaque plus rapide et vice-versa.

3) Eth : Lorsque le voltage atteint la valeur du potentiel seuil, la dépolarisation principale du PA est déclenchée (phase 0 du PA).

L'activité pacemaker du NS est due à deux principaux mécanismes.⁶⁶ En fait, l'automaticité du NS est à la fois généré par des courants ioniques (*voltage clock*) et l'homéostasie calcique (*calcium clock*).

1.5.3 Voltage Clock

1.5.3.1 Courant pacemaker (I_f)

Le courant pacemaker (I_f ou *funny current*) est dépendant du voltage et est activé par une hyperpolarisation, soit à un voltage de -55 mV.⁶⁹ Le courant I_f est généré par le passage des ions K^+ et Na^+ de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.⁶⁶ Cet influx intracellulaire d'ions

chargés positivement permet le début de la phase DD du potentiel d'action du NS, et ce, jusqu'à ce que le courant calcique de type T (I_{CaT}) soit activé (figure 11).^{66, 70}

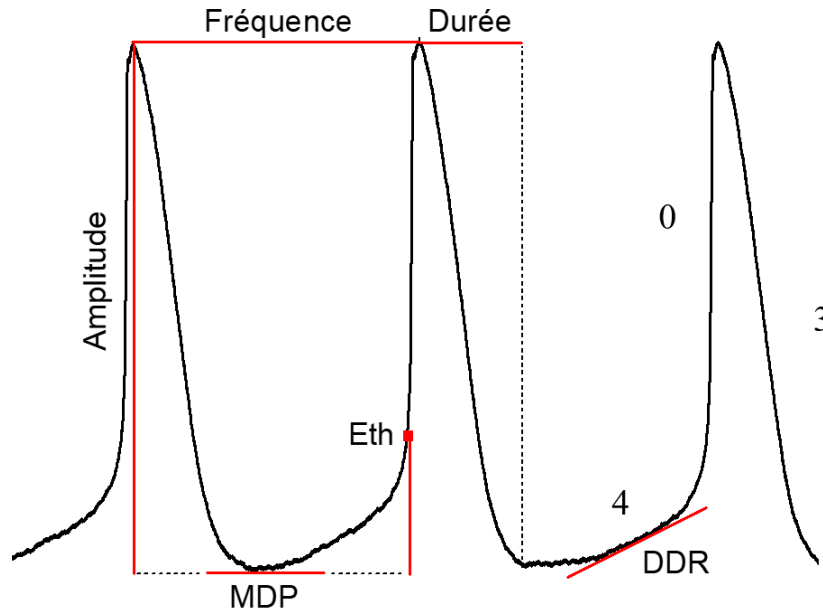


Figure 10. Paramètres du potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal.

Les principaux paramètres du potentiel d'action (PA) des cellules du NS sont la fréquence, la pente de dépolarisation diastolique (DDR), le potentiel diastolique maximal (MDP), la durée du PA, l'amplitude et le potentiel seuil (Eth). La DD, la MDP ainsi que l'Eth sont les trois paramètres permettant l'automatisme des cellules du NS. Les phases 0, 3 et 4 représentent respectivement, la dépolarisation, la repolarisation et la phase DD.

Les protéines responsables de I_f sont les canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides (HCN : *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*). Les HCN sont des homo- ou hétérotétramères. Chacun des monomères possède six passages transmembranaires et le quatrième est composé de résidus positifs (responsable de la dépendance au voltage).^{68, 70} Sur ce canal, on retrouve aussi un site de liaison à l'AMPc (CNBD : *cyclic nucleotide binding domain*), très important dans la régulation de la fréquence cardiaque.^{66, 68} En fait, plus les concentrations d'AMPc sont élevées, plus les HCN s'ouvrent

et génèrent du courant, ce qui entraîne une augmentation de l'automaticité cardiaque. Le contraire est observé dans le cas d'une diminution des concentrations intracellulaires d'AMPc. Dans le NS, on retrouve trois isoformes différentes, soit le HCN1, 2 et 4;^{69, 71} l'isoforme HCN3 n'étant pas présent au niveau cardiaque.^{72, 73} Chacune des isoformes a une expression, une cinétique, ainsi qu'une sensibilité à l'AMPc différente.⁶⁹ HCN4 est l'isoforme prédominante dans les cellules du nœud sinusal.⁶⁸ De plus, c'est HCN4 qui a la plus lente cinétique d'activation ainsi que la plus grande sensibilité à l'AMPc. HCN1, quant à lui, est le moins exprimé dans les cellules du NS, il a la cinétique d'activation la plus rapide et il est moins sensible à l'AMPc. Les paramètres d'HCN2 se retrouvent entre ceux de HCN1 et 4. De plus, l'abondance d'HCN2 est plus élevée que HCN1, mais plus faible que celle de HCN4.

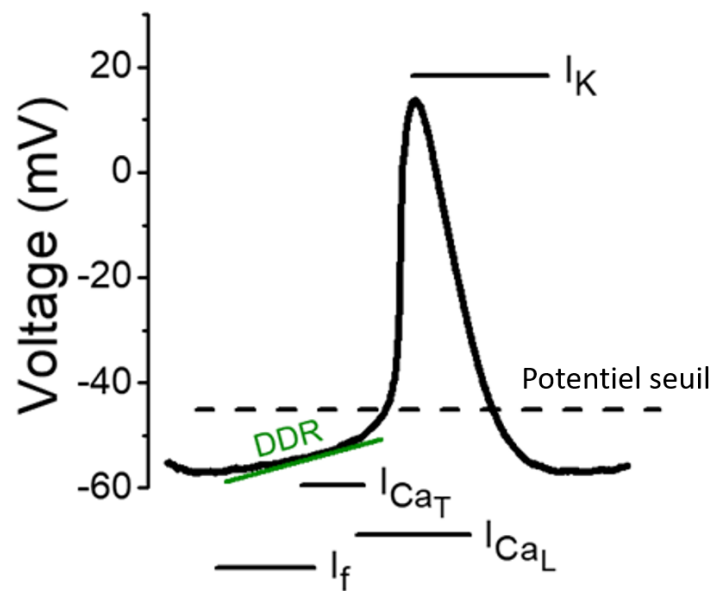


Figure 11. Paramètres du *voltage clock* impliqués dans le potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal. La phase DD est principalement déterminée par (1) le courant pacemaker (I_f), (2) le courant calcique de type T (I_{CaT}) et (3) le courant calcique de type L (I_{CaL}). La dépolarisation principale ainsi que la repolarisation sont respectivement déterminées par I_{CaL} et par la composante rapide du courant potassique à rectification retardée (I_{Kr}). Il est important de noter que les courants ioniques responsables du PA du NS peuvent changer en fonction de l'espèce.

Le courant pacemaker est d'une grande importance dans l'automaticité cardiaque. En fait, un bloqueur spécifique des canaux HCN (i.e. ivabradine)^{69, 74} ainsi qu'une suppression du gène HCN4⁷⁵ chez la souris diminue considérablement la FC et l'automaticité des cellules du NS (diminution de la fréquence des potentiels d'action).

Notre laboratoire a démontré que pendant la grossesse, la densité de I_f est significativement augmentée chez les souris gestantes, comparée aux souris non-gestantes.⁷⁶ Il est important de noter que cette augmentation n'était pas causée par une augmentation intracellulaire de l'AMPc, mais plutôt par une plus grande expression des HCN2 dans le NS.

1.5.3.2 Courant calcique de type T (I_{CaT})

Ce courant est activé à des voltages d'environ -60 mV⁷⁴ et permet le passage des ions Ca^{2+} de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Une entrée de charges positives permet à la phase DD d'atteindre des potentiels plus positifs⁶⁹ permettant ainsi d'activer les canaux calciques de types L (figure 11).

Le canal calcique voltage dépendant 3.1 ($Ca_v3.1$) est la protéine responsable de ce courant au niveau du NS. Une réduction de I_{CaT} (ex : avec le nickel) sur des cellules isolées ou une suppression de $Ca_v3.1$ chez la souris ($Ca_v3.1^{-/-}$) réduit la vitesse de la pente DD et l'automaticité cardiaque.⁶⁹

1.5.3.3 Courant calcique de type L (I_{CaL})

Le courant calcique de type L est dépendant du voltage et du temps et il s'active à des voltages d'environ -50 mV.^{69, 74} Le courant I_{CaL} est généré par l'influx des ions Ca^{2+} . Les sous-unités alpha des canaux calciques voltages dépendants 1.2 ($Ca_v1.2$) et 1.3 ($Ca_v1.3$) sont deux isoformes présentes dans le NS permettant de générer I_{CaL} .^{69, 77} L'activation de $Ca_v1.3$ se produit à des voltages légèrement plus négatifs que celle de $Ca_v1.2$. Ainsi, le I_{CaL} présent dans la phase DD est principalement produit par $Ca_v1.3$ (70%)⁷⁸ (figure 11), tandis que $Ca_v1.2$ est impliqué dans la phase ascendante du potentiel d'action (dépolarisation principale).

L'activité de I_{CaL} peut être modulée par la phosphorylation. Brièvement, l'AMPc peut activer la protéine kinase A (PKA), un enzyme présent dans la cellule et ayant la capacité de phosphoryler les Ca_v .^{69, 77, 79} Lorsqu'il y a une augmentation des concentrations d'AMPc,

PKA est plus active, les Cav1.x peuvent être phosphorylés et les canaux peuvent laisser passer plus d'ions, résultant en un courant I_{CaL} plus important. L'inverse est observé lorsqu'on retrouve une faible quantité d'AMPc intracellulaire.

Tout comme les autres courants décrits plus haut, I_{CaL} contribue à la phase DD, un paramètre important dans l'automatisme cardiaque. Un blocage de I_{CaL} par une dihydropyridine (bloqueur des canaux calciques de type L) ou la suppression du gène Cav1.3 chez la souris (Cav1.3^{-/-}), réduit considérablement l'automatisme du NS et la fréquence cardiaque.^{69, 77}

Notre laboratoire a démontré que la densité du courant I_{CaL} était plus grande lors de la grossesse.⁷⁴ De plus, cette augmentation est régulée par une augmentation de l'ARNm de Cav1.3. Toutefois, l'ARNm de Cav1.2 est inchangé. Pendant la grossesse, la quantité d'AMPc n'est pas modifiée, suggérant que l'augmentation de I_{CaL} n'est pas expliquée par une phosphorylation dépendante de la liaison PKA-AMPc.

1.5.3.4 Composante rapide du courant potassique à rectification retardée (I_{Kr})

La protéine sous-jacente au courant I_{Kr} est le canal potassique dépendant du voltage 11.1 (Kv11.1) ou ERG. I_{Kr} a comme rôle principal de ramener les cellules du NS à des potentiels négatifs (repolarisation du potentiel d'action) équivalent à la MDP (figure 11), dans le but de générer un autre PA.⁶⁹ L'inhibition de I_{Kr} par un bloqueur spécifique (ex : E-4031 ou dofétilide) prolonge la durée du PA, ralentit la repolarisation⁶⁹ et réduit l'automatisme du NS en dépolarisant le potentiel diastolique maximal (MDP).⁸⁰

1.5.3.5 Autres courants ioniques du nœud sinusal

D'autres courants ioniques contribuent à l'automatisme du nœud sinusal. On retrouve, entre autres, des canaux potassiques activés par le calcium (SK : *Small-conductance calcium-activated potassium channels*). Dans le nœud sinusal, on retrouve les quatre isoformes, soient SK1, 2, 3 et 4, produisant le courant I_{KCa} .^{81, 82} Les SK participent à l'automatisme cardiaque. En effet, le blocage de SK1, SK2 et SK3 par l'apamine prolonge la durée des PA et réduit la vitesse de la DD.

On retrouve aussi le canal potassique couplé à une protéine G (Girk/Kir), produisant le courant $I_{K_{ACh}}$.⁸³ Lorsque l'acétylcholine se lie sur les récepteurs muscariniques (M2), les canaux responsables de produire le courant $I_{K_{ACh}}$ s'ouvrent. Ce courant est important dans l'automatisme du NS puisqu'il a le rôle de repolariser les cellules.⁸⁴ Ce courant régule l'automatisme du NS en ramenant la fréquence cardiaque à des valeurs basales, suivant une stimulation du système nerveux sympathique (accélération de la FC). Une suppression du gène Girk4, responsable de $I_{K_{ACh}}$ chez la souris (Girk4^{-/-}), diminue la régulation cholinergique du nœud sinusal.⁸³ En fait, la vitesse pour retourner à une fréquence cardiaque au repos suivant une stimulation du système nerveux sympathique est réduite.

Contrairement aux cardiomyocytes contractiles, le courant potassique à rectification entrante (I_{K1}) et le courant sodique (I_{Na}) sont moins présents dans le nœud sinusal et ils n'ont pas un rôle essentiel dans l'automatisme. I_{Na} est normalement responsable de la dépolarisation rapide du potentiel d'action des oreillettes et des ventricules. Par contre, dans le NS, cette phase est régulée par I_{CaL} . L'absence ou la très faible expression de I_{K1} contribue à l'automatisme du NS.⁶⁹ Ce courant permet en fait de maintenir un potentiel de repos des cardiomyocytes contractiles. Par contre, dans le NS, il n'y a pas de potentiel de repos stable puisque les cellules du NS battent de manière spontanée.⁶⁶

1.5.4 Calcium Clock

Le *Calcium Clock* permet de maintenir l'homéostasie calcique intracellulaire des cellules du NS et ce phénomène est important dans l'automatisme cardiaque. Les différentes composantes responsables du *Calcium Clock* sont décrites ci-dessous (figure 12) :

Réticulum sarcoplasmique (RS) : Dans les cardiomyocytes, la majorité de la réserve intracellulaire de Ca^{2+} se retrouve dans le RS. Une très faible concentration de Ca^{2+} est retrouvée dans le cytosol. Le Ca^{2+} sort du RS par les récepteurs à la ryanodine 2 et il entre dans le RS par la pompe Ca^{2+} ATPase du RS.

Récepteur à la ryanodine 2 (RyR2) : Les RyR2 sont des récepteurs présents à la membrane du RS. Dans le NS, les RyR2 sont co-localisés avec les Cav1.3.⁸⁵ Les RyR2 s'ouvrent lorsqu'il y a liaison avec un ion calcique. Une fois ouvert, RyR2 permet la sortie du Ca^{2+} du RS vers le cytosol de la cellule.⁸⁶

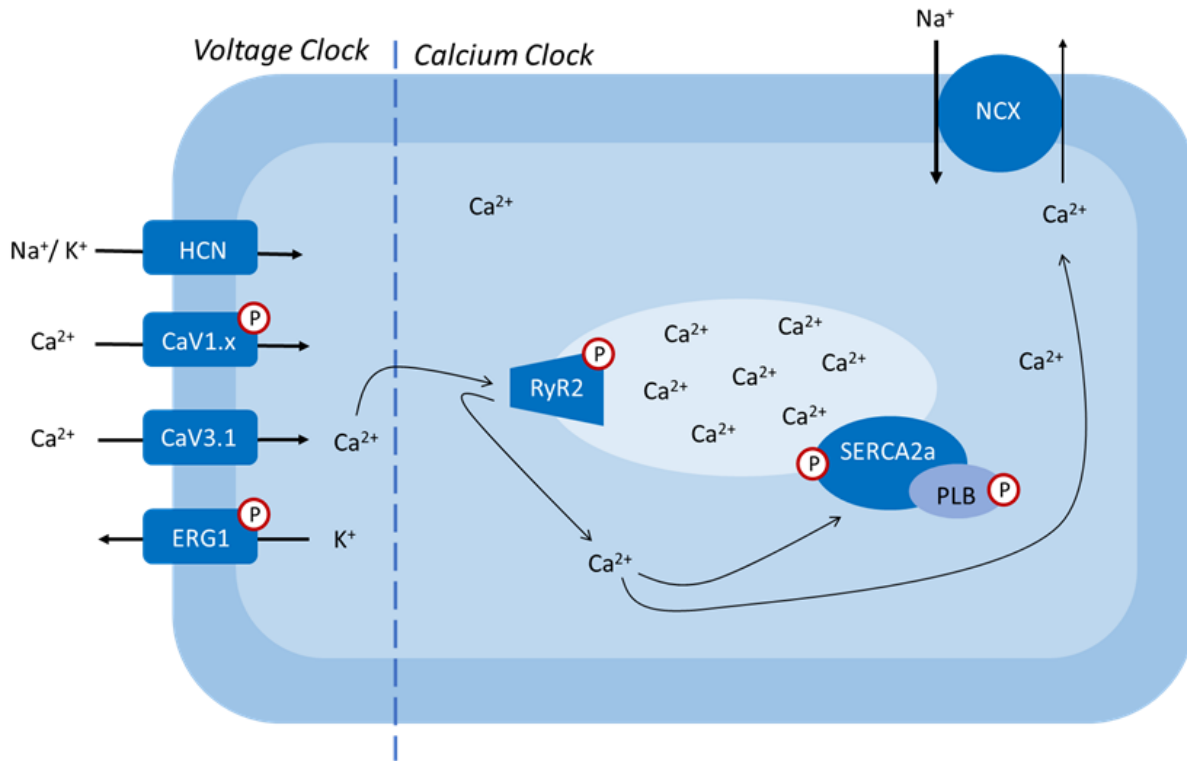


Figure 12. Paramètres du *coupled clock* impliqués dans le potentiel d'action spontané et l'homéostasie calcique des cellules du nœud sinusal. Le *voltage clock* et le *calcium clock* sont deux phénomènes importants pour l'automaticité cellulaire et ils doivent fonctionner de manière synchronisée. Le *voltage clock* comprend tous les courants ioniques (i.e. I_f , I_{CaT} , I_{CaL} , I_{Kr} , I_{NCX}) et le *calcium clock* comprend les protéines contribuant à l'homéostasie calcique (i.e. RyR2, SERCA2a, PLB et NCX). Sur la figure, les sites de phosphorylation potentiels de la PKA sont présentés par un *P*.

Pompe Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2a) : La pompe SERCA2a se retrouve aussi à la membrane du RS.⁸⁷ Dans son état fermé, SERCA2a est lié au phospholamban (PLB). Suite à la phosphorylation de PLB, SERCA2a est séparé de PLB.⁸⁷ Ainsi, cette pompe devient active et permet la réentrée de Ca^{2+} dans le RS.

Phospholamban (PLB) : PLB est la protéine associée au SERCA2a et contient un site de phosphorylation. Lorsque PLB est phosphorylé, par exemple par la PKA, cette protéine se

détache de SERCA2a et permet l'entrée de Ca^{2+} dans le RS.⁸⁷ Lorsque PLB se fait déphosphoryler, il se lie à SERCA2a, ce qui l'inactive.

Échangeur sodium-calcium (NCX1) : NCX1 permet le transport d'un ion Ca^{2+} en échange de trois ions Na^+ de part et d'autre de la membrane cellulaire en fonction du gradient électrochimique.^{77, 86} En plus de faire partie du *calcium clock*, NCX1 fait aussi partie du *voltage clock*. En fait, le passage d'ions permet de générer un courant que l'on appelle I_{NCX} et il est seulement voltage-dépendant⁷⁹, contrairement aux autres courants ioniques du *voltage clock* qui dépendent aussi du temps. I_{NCX} contribue à la phase de dépolarisation diastolique. En effet, l'entrée de charges positives permet à la phase DD d'atteindre des potentiels plus positifs et ainsi activer les autres courants ioniques de la DD (ex : I_{CaT} , I_{CaL}).

Le *calcium clock* est déclenché par des fluctuations des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} . À chaque cycle, la quantité de calcium cytosolique augmente, permettant une libération rythmique du calcium intracellulaire. Ce mécanisme travaille de concert avec le *voltage clock*. C'est ce que l'on appelle le *coupled clock*.

1.5.5 Coupled Clock

L'interaction entre le *voltage clock* et le *calcium clock* permet une automaticité normale des cellules du nœud sinusal. Voici toutes les étapes permettant un potentiel d'action^{66, 69, 79} :

(1) Les canaux sous-jacents au courant I_{Kr} ($\text{K}_{\text{v}}11.1$) permettent la repolarisation (phase descendante du potentiel d'action) des cellules du NS grâce à la sortie des ions K^+ . Ceci permet de ramener le potentiel à des valeurs équivalentes à la MDP (-55 mV).

(2) Les canaux HCN sous-jacents au courant pacemaker (I_{f}) sont activés grâce à l'hyperpolarisation générée par I_{Kr} et permettent l'influx d'ions K^+ et Na^+ . Cette entrée de charges positives représente le début de la pente DD.

(3) Grâce à un potentiel membranaire plus positif,⁷⁰ les canaux $\text{Ca}_{\text{v}}3.1$ responsables du courant I_{CaT} s'activent afin de laisser entrer des ions Ca^{2+} . Cette étape représente le milieu de la phase DD.

(4) Les ions Ca^{2+} entrant se lient au RyR2, ce qui permet la sortie d'ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. Ceci crée ce que l'on appelle des étincelles calciques ou des relâches locales de Ca^{2+} .

(5) En réponse à une augmentation de la concentration Ca^{2+} intracellulaire, NCX1 s'active, laissant sortir un ion Ca^{2+} contre trois ions Na^+ entrant. Il y a ainsi une accumulation de charges positives à l'intérieur de la cellule.

(6) L'influx net de charges positives active I_{CaL} . L'entrée additionnelle de Ca^{2+} est nécessaire pour activer RyR2, laissant ainsi sortir une grande quantité de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. Cette étape représente la fin de la pente DD ($\text{Ca}_v1.3$) ainsi que la pente ascendante du PA ($\text{Ca}_v1.2$), soit la dépolarisation principale.

(7) La dernière étape du potentiel d'action est la repolarisation (pente descendante du potentiel d'action). Pour la repolarisation membranaire, les ions Ca^{2+} doivent être éliminés du cytosol afin de ramener la cellule à des potentiels plus négatifs. Deux principaux mécanismes peuvent être responsables : 1) le retour du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique via SERCA2a ou 2) l'activation de NCX1 permettant le passage des ions Ca^{2+} du cytosol vers le milieu extracellulaire.

1.5.6 Système nerveux autonome

Le système nerveux autonome a la capacité de modifier l'automaticité du NS, et ainsi, la fréquence cardiaque.⁸⁸ En fait, le NS possède des récepteurs spécifiques au système nerveux sympathique et parasympathique, soit les récepteurs β_1 -adrénergiques (β_1 -AR) et les récepteurs muscariniques (M2), respectivement. Ceux-ci sont des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés à une protéine G (figure 13).

1.5.6.1 Système nerveux sympathique

Le système nerveux autonome sympathique a comme principal neurotransmetteur la noradrénaline. Lorsque celle-ci se lie sur β_1 -AR, la protéine Gas stimule l'adénylate cyclase (AC), ce qui augmente la production d'AMPc à partir de l'ATP (figure 13A). Une augmentation de l'AMPc favorise l'ouverture du canal HCN,^{69, 70, 89, 90} responsable du courant I_f . Par ailleurs, ceci augmente l'activité de PKA, ce qui permet la phosphorylation de

différentes protéines, telles que Cav1.x (ouverture des canaux), Kv11.1 (ERG), RyR2, SERCA2a et PLB (voir sites de phosphorylation sur figure 12). Par conséquent, une augmentation des courants ioniques I_f et I_{CaL} ainsi qu'une phosphorylation de RyR2, SERCA2a et PLB permet une accélération de la phase de dépolarisation diastolique des potentiels d'action et de l'automatisme cardiaque (figure 13B).

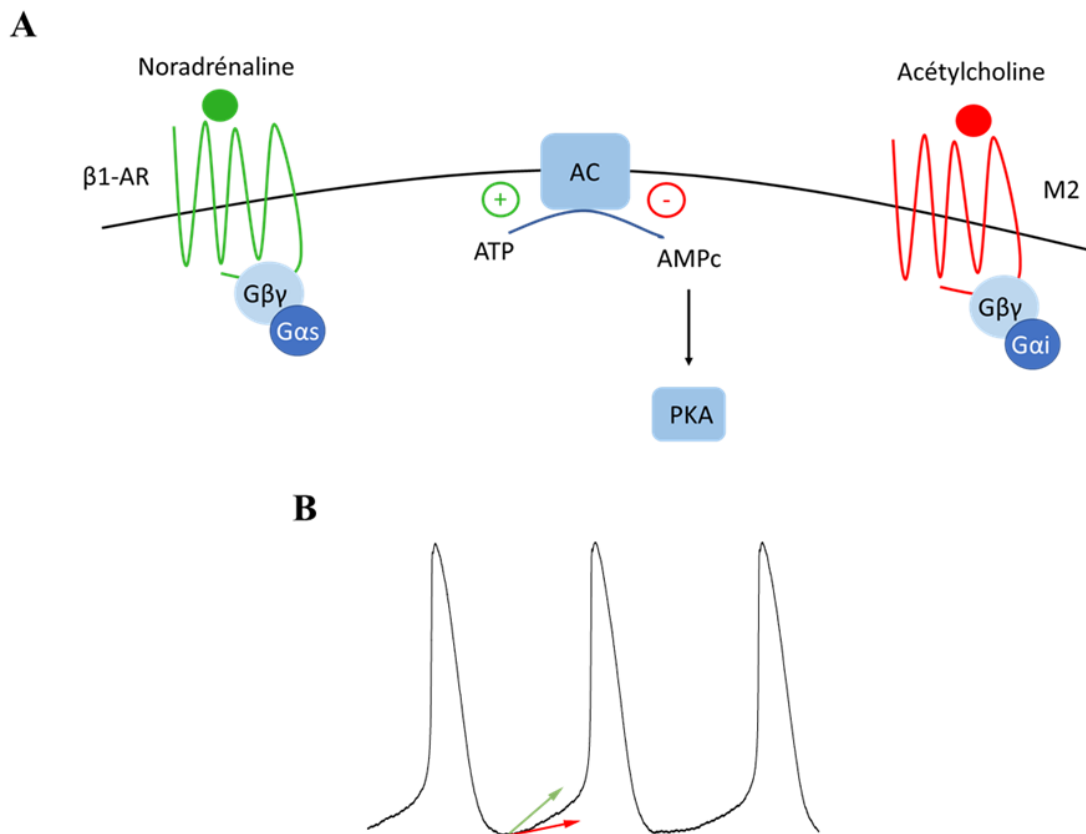


Figure 13. Rôles du système nerveux autonome dans l'automatisme du nœud sinusal.

(A) Une stimulation du système nerveux sympathique via les récepteurs β1-adrénergiques active la protéine G α s, ce qui active la production d'AMPc et l'activité de la protéine kinase A (PKA). Inversement, la stimulation du système nerveux parasympathique par les récepteurs muscariniques active la protéine G α i, ce qui réduit la production d'AMPc et l'activité de la PKA. (B) L'activation du système nerveux sympathique (vert) augmente la pente de dépolarisation diastolique, ce qui accélère l'automatisme cardiaque. À l'inverse, une stimulation du système nerveux parasympathique (rouge) diminue la vitesse de la dépolarisation diastolique et de l'automatisme cardiaque.

1.5.6.2 Système nerveux parasympathique

Le système nerveux autonome parasympathique a comme principal neurotransmetteur l'acétylcholine. Lorsque celle-ci se lie sur les récepteurs M2 (figure 13A), la protéine G α i inhibe l'activité de l'AC, ce qui diminue la production d'AMPc et l'activité de la PKA.⁹¹ Ainsi, l'automatisme du NS est réduite, due à une diminution de vitesse de la pente DD (figure 13B).

1.5.7 Différences entre l'humain et la souris

- Au repos, la fréquence cardiaque est en moyenne de 72 battements par minutes (bpm) chez l'humain et de 700 bpm chez la souris. En conséquence, la durée des PA est beaucoup plus courte chez la souris que chez l'humain.
- Les composantes (canaux ioniques et protéines) du nœud sinusal des humains et des souris sont semblables (tableau I). Toutefois, quelques différences sont observées. Par exemple, aucune étude n'a encore prouvé la présence du courant I_{CaT} chez l'humain.

Tableau I. Comparaison des courants ioniques et des connexines présents dans les cellules du nœud sinusal entre l'homme et la souris

	Humain	Souris
I_f	HCN 1, 2, 4	HCN 1, 2, 4
I_{CaT}	Potentiellement Cav3.1 et Cav3.2	Cav3.1, Cav3.2
I_{CaL}	Cav1.2, Cav1.3	Cav1.2, Cav1.3
I_{Kr}	hERG ou K _V 11.1	mERG ou K _V 11.1
Cx30.2		GJC3
Cx31.9	GJD3	
Cx40	GJA5	GJA5
Cx45	GJC1	GJC1

1.6 La souris comme modèle animal

Les souris transgéniques dites ERKO sont déficientes en récepteurs aux œstrogènes. Celles-ci peuvent être déficientes en récepteur alpha (ERKO α) ou bêta (ERKO β). L'absence des récepteurs aux œstrogènes est totale et ne se limite pas seulement au système cardiovasculaire. Ces souris ont été produites sur la lignée génétique C57BL/6.

Afin de générer des souris ERKO α et ERKO β , une séquence de 1,8 Kb est insérée sur le gène codant pour le ER α ou le ER β .^{92, 93} Plus précisément, cette séquence cible l'exon 2 pour le gène de ER α et l'exon 3 pour le gène de ER β . Cette méthode ne supprime pas les gènes, mais empêche plutôt leur transcription et l'expression des ER α ou ER β dans les différents tissus et organes des souris.^{92, 93}

1.6.1 Différences entre les femmes et les souris femelles

- Contrairement au cycle menstruel de 28 jours chez la femme, les souris femelles ont un cycle œstrus de quatre à cinq jours qui comporte quatre phases, soit le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le dioœstrus.⁹⁴
- Chez la souris, la grossesse est d'une durée de seulement 21 jours, contrairement à 40 semaines chez la femme.
- En moyenne, une souris femelle peut avoir une dizaine de bébés par portée.
- Chez la femme, la période post-partum est observée en général pendant les six à huit semaines suivant l'accouchement. Chez les souris femelles, la période post-partum dure de 24 à 48 heures après avoir mis bas.
- Les femmes ont normalement une fréquence cardiaque plus élevée que les hommes. Par contre, les électrocardiogrammes de surface ne démontrent aucune différence dans la fréquence cardiaque entre les souris mâles et femelles (données non publiées du laboratoire de Dre Céline Fiset).

1.7 Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC-CM)

Les cellules de type hiPSC (hiPSC : *human-induced pluripotent stem cell*) sont des cellules souches pluripotentes induites à partir de tissus humains, plus précisément de cellules de peau, de fibroblastes ou des cellules sanguines. Il est important de noter que les globules rouges ne peuvent être utilisées afin de produire des hiPSC en raison d'une absence de noyau. En fait, les cellules doivent absolument avoir un noyau afin qu'elles puissent garder leur bagage génétique. Ces cellules humaines prélevées sont par la suite reprogrammées en cellules embryonnaires grâce aux quatre facteurs de transcription de Yamanaka, soient KLF4, SOX2, c-Myc et Oct-3/4⁹⁵ (figure 14). Ces cellules de type embryonnaires peuvent être différenciées en n'importe quel type cellulaire, comme par exemple, les cardiomyocytes (hiPSC-CM : *human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*). À l'aide de cellules hiPSC-CM, il est possible de retrouver trois types cellulaires, soient les cellules ventriculaires, auriculaires et de type nodal.

Les cellules hiPSC permettent d'obtenir des cellules humaines de différents tissus et organes. Ce modèle cellulaire humain peut permettre de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de certaines conditions physiologiques et/ou pathologiques, déterminer les effets d'une suppression ou d'une suractivation d'un gène et de déterminer les effets d'une drogue au niveau cellulaire.⁹⁶ Il est aussi possible d'étudier les effets physiologiques d'une mutation d'un gène qui code pour un canal ionique sur sa fonction, soit le courant ionique généré, ainsi que les répercussions de la mutation du gène sur la configuration du potentiel d'action.⁹⁷

1.7.1 Limites des hiPSC-CM

L'utilisation des hiPSC-CM comme modèle cellulaire comporte certaines limites. Tout d'abord, les cellules hiPSC-CM sont immatures. Cette limite peut être remédiée en stimulant électriquement les cellules.⁹⁷ Ceci leur permettra de se développer en cellules matures de type nodal, auriculaire ou ventriculaire. En fait, les cellules contractiles développeront le courant I_{K1} , permettant le maintien d'un potentiel de repos membranaire plus hyperpolarisé, tandis que

les cellules de type nodal ne développeront pas de I_{K1} et conserveront leur automaticité spontanée. Une autre limite est la présence des trois types cellulaires (i.e. cellules ventriculaires, auriculaires et de type nodal). Toutefois, il est possible de distinguer les cellules nodales des cellules contractiles suivant une stimulation électrique ainsi qu'en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et de leurs constituants électrophysiologiques. En fait, comparativement aux cardiomyocytes contractiles, les cellules hiPSC-CM de type nodal sont plus petites et rondes, elles ont une activité électrique spontanée, la phase de dépolarisation diastolique est présente, la forme du potentiel d'action est semblable à celle des cellules de NS, elles ont un MDP à des valeurs près de -55 mV, elles n'ont pas de potentiel membranaire de repos, et finalement, les courants ioniques ne sont pas les mêmes (ex : courant I_f).

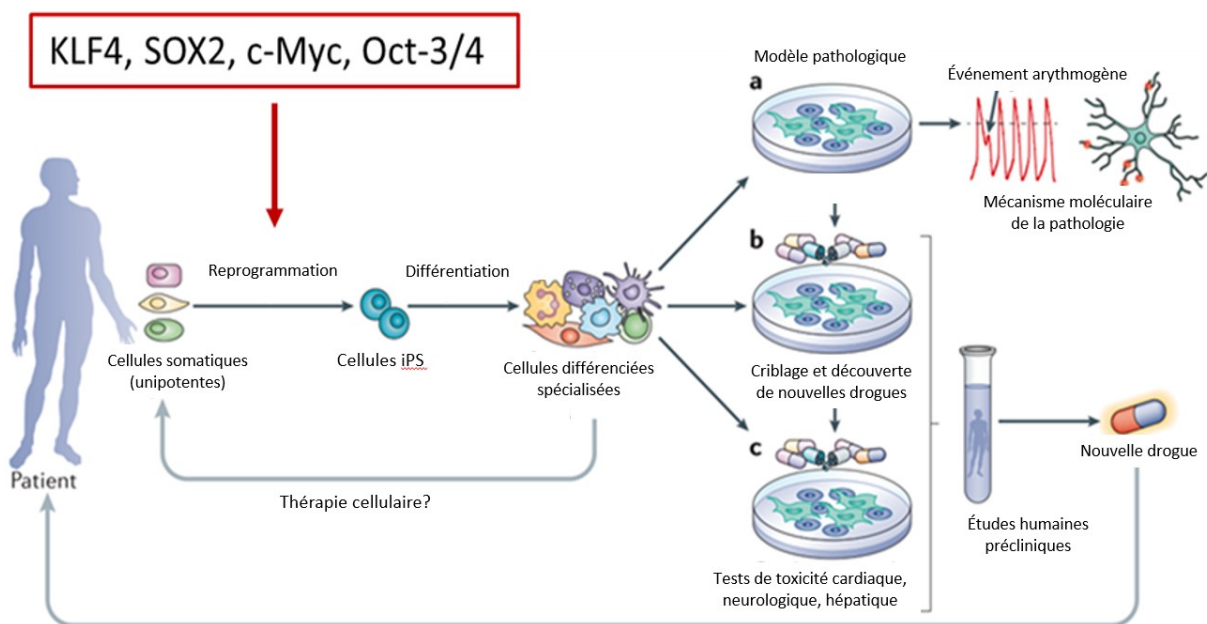


Figure 14. Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Les hiPSC-CM proviennent de cellules humaines reprogrammées en cellules embryonnaires (cellules souches) et différenciées en un type cellulaire désiré. Pour cette étude, les cellules souches ont été différenciées en cardiomyocytes, soient des cellules du muscle cardiaque. Les hiPSC-CM sont un modèle cellulaire humain adéquat puisque ces cellules possèdent les mêmes propriétés électrophysiologiques que de vrais cardiomyocytes humains (adapté de Bellin *et al*⁹⁶).

1.8 Mise en contexte

Tout comme chez les femmes enceintes, une accélération de la fréquence cardiaque (FC) est observée chez les souris gestantes.⁷⁶ Plus précisément, la FC augmente de près de 13% pendant la gestation. De plus, la FC des souris non-gestantes et des souris post-partum est similaire.⁷⁶ Suite à un programme de stimulations électriques, l'incidence des arythmies supraventriculaires est plus élevée chez les souris gestantes comparativement aux souris non-gestantes et post-partum.⁷⁴ Ces phénomènes sont aussi observables chez la femmes enceintes, confirmant ainsi la validité du modèle animal pour ce projet de recherche.

Une augmentation de la fréquence cardiaque peut être expliquée par des modifications hémodynamiques, par des changements au niveau du système nerveux autonome, plus précisément du système nerveux sympathique, ainsi que par des changements intrinsèques au cœur. Dans le but d'évaluer les paramètres hémodynamiques pendant la grossesse, la pression artérielle a été mesurée. Toutefois, aucun changement n'a été observé entre les souris gestantes et non-gestantes.⁷⁶ Le rôle du système nerveux sympathique a été étudié en mesurant les concentrations plasmatiques de catécholamines.⁷⁶ Aucun changement significatif n'a été observé. Ensuite, le cœur de souris gestantes a été isolé en Langendorff et la FC a été mesurée. La méthode du Langendorff permet d'isoler le cœur des stimulations externes, tels les changements hémodynamiques et ceux du système nerveux autonome. La FC des cœurs en Langendorff des souris gestantes était plus rapide que celle des souris non-gestantes.⁷⁶ Ceci suggère donc que l'augmentation de la fréquence cardiaque induite par la grossesse est médiée par un changement intrinsèque au cœur. Finalement, les potentiels d'action des cellules du nœud sinusal ont été enregistrés à l'aide de la méthode de patch-clamp en mode courant-imposé. La fréquence des potentiels d'action spontanés des cellules du nœud sinusal des souris gestantes est plus rapide, comparativement à celle des souris non gestantes⁷⁶, et ceci se traduit par une accélération de la phase de dépolarisation diastolique. Ces résultats suggèrent que la grossesse cause des changements intracardiaques, et ce, jusqu'au niveau cellulaire.

Finalement, il a été démontré que les propriétés électrophysiologiques ainsi que l'homéostasie calcique du nœud sinusal étaient modifiées lors de la grossesse. En effet, la densité des courants I_f et I_{CaL} est augmentée.^{74, 76} Ceci est expliqué par une augmentation de

l'expression protéique de HCN2 sous-jacent au courant I_f et l'expression d'ARNm de Cav1.3 qui contribue à I_{CaL} .^{74, 76} Aussi, la fréquence et la vitesse des transitoires calciques sont deux paramètres qui sont accélérés pendant la grossesse.⁷⁴ Ceci est expliqué par une augmentation de l'expression d'ARNm de RyR2.

1.9 Hypothèses

En se basant sur les connaissances antérieures et les études déjà réalisées, nous savons que l'accélération de la fréquence cardiaque coïncide avec une importante augmentation des niveaux d'œstrogènes. De plus, ces hormones sexuelles féminines sont connues pour avoir des effets sur la fonction cardiaque pendant la grossesse (ex : l'hypertrophie cardiaque, vasodilatation des vaisseaux sanguins).^{7, 28} Ensuite, les œstrogènes peuvent modifier l'expression de certains canaux ioniques du cœur (ex : $K_{V4.3}$) ainsi que les courants ioniques sous-jacents ces canaux.^{1, 98}

Pour ce projet de maîtrise, l'hypothèse de recherche était que les changements électrophysiologiques observés pendant la grossesse étaient expliqués par les œstrogènes. En d'autres termes, nous supposons que les concentrations élevées en œstrogènes observées pendant la grossesse augmentent la fréquence cardiaque, et ce, en modifiant les courants ioniques (ex : I_f et I_{CaL}), l'expression des canaux sous-jacents ces courants (ex : HCN et Cav) ainsi que l'expression des protéines sous-jacentes l'homéostasie calcique (ex : RyR2) du nœud sinusal.

1.10 Objectifs

Ce projet de maîtrise comporte plusieurs objectifs. Tout d'abord, nous voulions déterminer le rôle des œstrogènes dans l'accélération de la fréquence cardiaque induite par la grossesse. Suivant un traitement aux œstrogènes, des électrocardiogrammes de surface ont été enregistrés sur des souris déficientes en récepteurs aux œstrogènes alpha (ERKO α) ou bêta (ERKO β). À l'aide de ce modèle animal transgénique, nous pouvions établir l'implication des isoformes des récepteurs aux œstrogènes dans l'augmentation de la fréquence cardiaque. Finalement, nous avons comme objectif de déterminer les mécanismes cellulaires par lesquels les œstrogènes régulent l'automatisme cardiaque. Dans un premier temps, des études

d'électrophysiologie cellulaire ont été réalisées sur des cellules de nœud sinusal des souris ERKO et sur des cellules humaines de type nodal dérivées de cellules souches pluripotentes induites (N-hiPSC-CM). Les souris ERKO permettent de déterminer laquelle des isoformes des récepteurs aux œstrogènes pourrait être responsable des changements observés. L'utilisation des N-hiPSC-CM permet de déterminer si les changements observés dans un modèle murin seraient applicables à l'humain. À l'aide de la méthode du patch-clamp, le courant pacemaker (I_f), les potentiels d'action spontanés ainsi que le courant calcique de type L (I_{CaL}) ont été enregistré sur les cellules de nœud sinusal et/ou sur les N-hiPSC-CM. Par la suite, la méthode des transitoires calciques a été réalisée sur les cellules de nœud sinusal des souris de la lignée ERKO dans le but de déterminer le rôle des œstrogènes dans l'homéostasie calcique intracellulaire.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Animaux

Les souris transgéniques déficientes en récepteurs aux œstrogènes alpha (ERKO α) ou bêta (ERKO β) ont été utilisées pour ce projet de recherche et proviennent de la lignée génétique C57BL/6. Ces lignées sont en reproduction continue à l'animalerie du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) afin de maintenir les colonies. Des souris de type CD-1 provenant des Laboratoires Charles River (QC, Canada) ont aussi été utilisées. Toutes les souris sont des femelles non-gestantes et nullipares (i.e. qui n'ont pas eu de grossesse antérieure) âgées entre 2 et 4 mois. Les expériences ont été réalisées en accord avec le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ont toutes été approuvées par le comité de déontologie animal (CDA) du Centre de Recherche de l'ICM (numéros de référence : 2015-80-05 et 2018-80-06).

2.2 Génotypage

Le génotype des souris est déterminé par la technique d'amplification de l'ADN par une réaction en chaîne par polymérase (PCR), une migration sur gel d'agarose (2%) et une révélation des bandes par lumière ultraviolette. L'ADN est amplifié par PCR à l'aide d'un mélange contenant (1) les amorces sens en antisens (voir tableau II), (2) du KCl, (3) du MgCl₂, (4) des désoxyribonucléotides (dNTP), (5) l'enzyme Taq Polymérase et (5) l'ADN. Les souris *+/+* représentent les souris de type sauvage (*wild-type*), tandis que les souris *-/-* représentent les souris déficientes en récepteurs aux œstrogènes (ERKO α ou ERKO β). **ERKO α** . Les échantillons de tissus d'oreilles sont digérés dans 100 μ L de tampon de digestion (en mM : 25 NaOH, 0,2 EDTA) pendant une heure à 95°C afin d'en extraire l'ADN. L'amplification de l'ADN se fait pendant 40 cycles. On retrouve une bande à 239 pb et ~700 pb pour le gène *wild-type* et *knock-out*, respectivement. **ERKO β** . Les échantillons de tissus d'oreilles sont digérés dans 300 μ L de tampon de digestion contenant 30 mM d'EDTA, 50 mM de Tris, 0,25% de SDS ainsi que 0,3 mg de protéine K (30 U/mg, no. catalogue 39450-01-

6, BioShop) pendant deux heures à 55°C. L'amplification de l'ADN se fait pendant 50 cycles. On retrouve une bande à 600 pb et 650 pb pour le gène *wild-type* et *knock-out*, respectivement.

Tableau II. Amorces utilisées pour le génotypage des souris C57BL/6 ERKO α et ERKO β

	Gènes	Sens/Antisens	Séquences
ERKOα	<i>Wild-type</i>	Sens Antisens	CGG TCT ACG GCC AGT CGG GCA CC GTA GAA GGC GGG AGG GCC GGT GTC
	<i>Knock-out</i>	Sens Antisens	GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC GTA GAA GGC GGG AGG GCC GGT GTC
ERKOβ	<i>Wild-type</i>	Sens Antisens	GGT TGT GGC TGA AGA CAA GTG CAT CCT TCA CAG GAC CAG ACA C
	<i>Knock-out</i>	Sens Antisens	GGT TGT GGC TGA AGA CAA GTG GCA GCC TCT GTT CCA CAT ACA C

2.3 Reproduction animale

Les souris, âgées entre 2 et 6 mois, sont utilisées pour la reproduction et le maintien des colonies à l'ICM. **ERKO α** . Les souris mâles +/- et femelles +/- sont utilisées pour la reproduction, car les souris -/- provenant des deux sexes sont infertiles. L'infertilité des souris mâles est due à une absence des ER α dans les testicules. Ceci diminue la quantité et la qualité des spermatozoïdes.²⁵ L'infertilité des souris femelles est expliquée par une absence des ER α dans l'utérus et les ovaires. Ainsi, il n'y a pas d'effet oestrogénique dans l'utérus. De plus, les souris ERKO α femelles n'ont pas d'ovulation, due à une dysfonction ovarienne.²⁵ **ERKO β** . Les souris mâles -/- et femelles +/- sont utilisées pour la reproduction de cette lignée. Contrairement aux souris ERKO α , les souris femelles ERKO β -/- ont seulement une réduction de leur fertilité en raison de la déficience des ER β au niveau des ovaires.²⁵ En fait, le nombre de grossesses ainsi que le nombre de bébés par portée est réduit.⁹³

2.4 Traitement hormonal au 17 β -œstradiol

Le 17 β -œstradiol (E₂) (No. catalogue : 50282; Sigma-Aldrich) est préalablement dissout dans du propylène glycol. Par la suite, cette solution est mélangée au Nutella[®] 74, 99, permettant une administration orale du traitement hormonal et moins invasive, comparée à des injections sous-cutanées. Les souris reçoivent un traitement chronique de 30 μ g deux fois par jour (matin et soir) pendant quatre jours, pour un total de huit doses. La dose d'E₂ a été établie dans le but d'atteindre les concentrations d'E₂ retrouvées en fin de gestation. Les souris contrôles reçoivent seulement le véhicule, soit le propylène glycol dans du Nutella[®]. Il est important de noter que les souris sont préalablement conditionnées au Nutella[®] pendant trois jours.

2.5 Prélèvement sanguin intracardiaque

Les souris sont maintenues sous anesthésie par l'inhalation de 2% d'isoflurane. L'abdomen des souris est ouvert, de telle sorte que le diaphragme reste intact. Cette technique permet une meilleure circulation sanguine et un meilleur rendement lors de la prise de sang. Par la suite, à l'aide d'une seringue de 1 mL, le diaphragme est transpercé afin d'atteindre les ventricules avec l'aiguille. Pour les souris des lignées CD-1 et C57BL/6, il est possible de retirer jusqu'à 1 mL et 600 μ L de sang, respectivement. Les souris C57BL/6 ont moins de sang que les souris CD-1 en raison de leur plus petite taille. Le sang recueilli est centrifugé à 2000 rpm pendant 20 minutes afin d'obtenir le plasma (entre 300 et 500 μ L).

2.6 Concentrations plasmatiques de 17 β -œstradiol

Le plasma (100 μ L) recueilli des souris est soumis à une extraction à l'éther (Ethyl Ether Anhydrous; no. catalogue : 60297; Fisher Scientific) permettant d'y isoler l'E₂. Une double extraction est réalisée dans le but de maximiser l'extraction d'E₂. Le résidu obtenu suivant l'extraction à l'éther est dilué dans une solution tampon, permettant la conservation des échantillons à -80°C. À partir de ceux-ci, les concentrations plasmatiques d'E₂ sont mesurées à l'aide du kit d'ELISA pour le 17 β -œstradiol (No. catalogue : 402110; Neogen) suivant les instructions du fabricant. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.

2.7 Électrocardiogramme de surface

Des électrocardiogrammes (ECG) de surface ont été obtenus sur des souris anesthésiées par inhalation d'isoflurane (2%). Des électrodes de platine sont placées de manière sous-cutanée à des endroits précis permettant la lecture de l'ECG en dérivation I. Ces mêmes électrodes sont connectées au système Biopac System MP100 (EMKA Technologies). La température corporelle de chacune des souris est maintenue à 37°C à l'aide d'un coussin chauffant. L'enregistrement continu est réalisé pour une période de cinq minutes. Le signal est filtré à 100 Hz (*low-pass filter*) ainsi qu'à 60 kHz (*notch filter*). L'analyse des résultats comprend la totalité de l'enregistrement, soit l'équivalent de 3000 à 6000 battements cardiaques, et elle est réalisée à l'aide du logiciel ECGauto v2.8.1.18 (EMKA Technologies). Les paramètres d'analyse sont présentés à la figure 15 et dans le tableau III.

Exceptions d'analyse :

- Dans le cas où l'onde Q n'est pas visible sur l'ECG, l'onde <Q doit être placée sur la ligne isoélectrique juste avant la montée du R.
- Sur certains ECG, l'onde R n'est pas toujours le pic le plus élevé. En fait, le R est parfois négatif, c'est-à-dire sous la ligne isoélectrique.
- Parfois, l'onde T n'est pas identifiable sur l'ECG. Dans ce cas, le T> ne doit pas être placé sur l'ECG et il ne sera pas possible de mesurer l'intervalle QT.

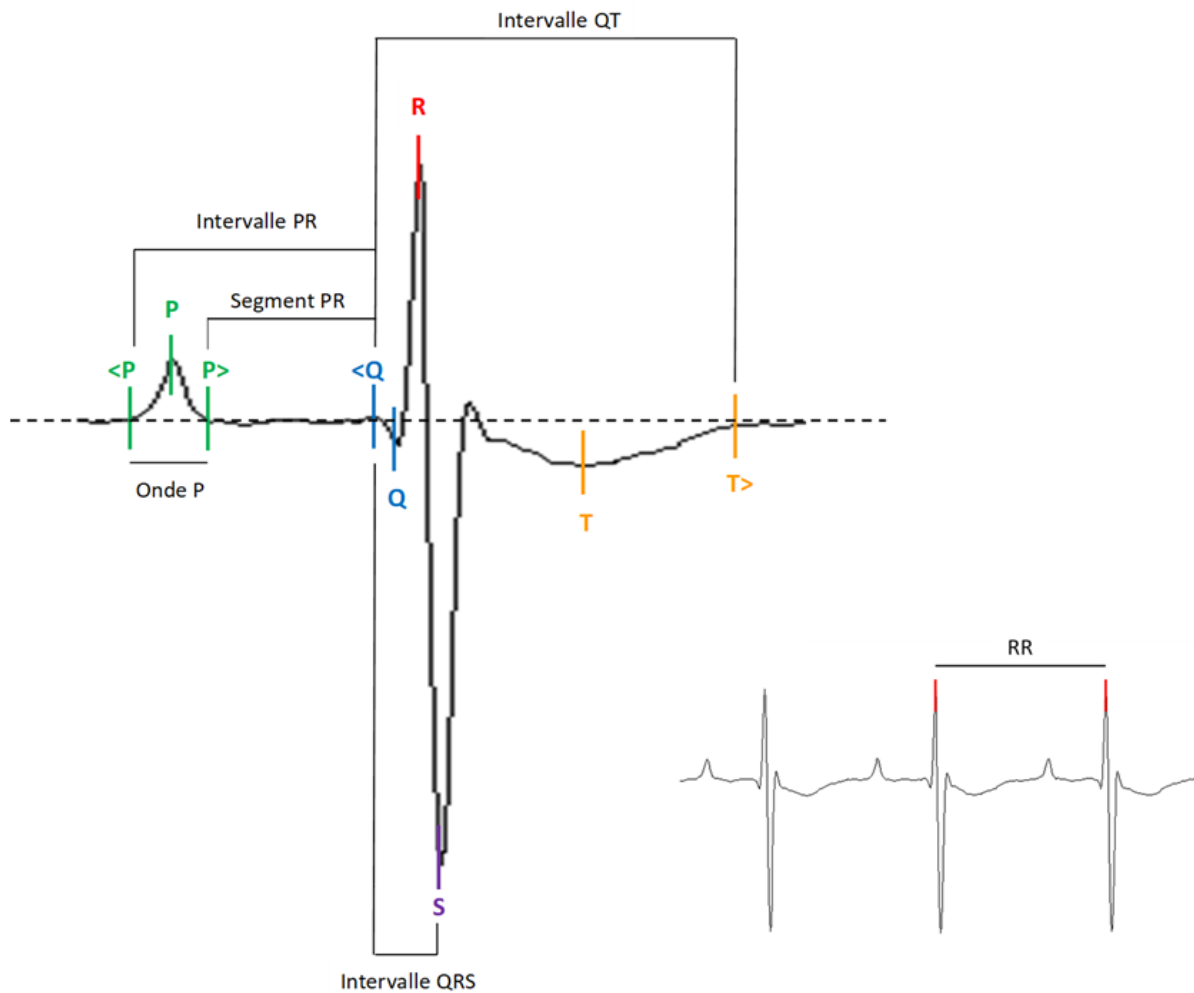


Figure 18. Paramètres d'analyse des électrocardiogrammes de surface. Exemple d'électrocardiogramme où sont présentés l'onde P, l'intervalle PR, le segment PR, le complexe QRS, l'intervalle QT et l'intervalle RR. La ligne isoélectrique est représentée par la ligne pointillée. Légende : **<P** : début de l'onde P; **P** : fin de l'onde P; **P** : amplitude maximale de l'onde P; **<Q** : début de l'onde Q; **R** : point le plus élevé de l'ECG; **S** : point le plus bas de l'ECG; **T** : fin de l'onde T.

Tableau III. Paramètres d'analyse de l'électrocardiogramme de surface

Paramètres de l'ECG	Formules
Fréquence cardiaque (battements par minute ou bpm)	$60\ 000 / \text{Intervalle RR}$ (Pour 1 minute, il y a 60 000 ms)
Intervalle RR (ms)	R1 à R2
Intervalle PR (ms)	<P à <Q
Segment PR (ms)	P> à <Q
Onde P (ms)	(Intervalle PR – Segment PR) ou <P à P>
Intervalle QRS (ms)	<Q à S
Intervalle QT (ms)	<Q à T>
Intervalle QTc (ms) ¹⁰⁰	$QT / (RR / 100)^{1/2}$

*Intervalle QTc : Intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque

2.8 Isolation des cellules du nœud sinusal

Les cellules de NS de souris ont été obtenues selon un protocole publié et adapté par le laboratoire.⁷⁶ Tout d'abord, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (2%) et sacrifiées à l'aide d'une dislocation cervicale. Le cœur est rapidement retiré de la souris, transféré et disséqué dans une solution physiologique, soit une solution oxygénée de Tyrode tamponnée à l'HEPES (en mM : 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 5,5 glucose, 1 CaCl₂, pH 7,4 avec NaOH 1 M). Brièvement, la partie supérieure du cœur (i.e. oreillettes et base des ventricules) est isolée. Le septum restant entre les ventricules est coupé, et ce, jusqu'aux oreillettes. Le nœud sinusal est ensuite isolé du reste du tissu et coupé en quatre à cinq morceaux. Ceux-ci sont par la suite rincés à deux reprises pendant quatre minutes dans une solution Tyrode-HEPES sans calcium (en mM : 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, 50 taurine, 1,2 KH₂PO₄, pH 6,9 avec NaOH 1 M (à 35 ± 1 °C)) contenant 0,1% d'albumine de sérum bovin et 5,5 mM de glucose. Les tissus du NS sont par la suite placés dans la même solution Tyrode-HEPES, supplémentée de collagénase de type II (236,8 U/mL, no. catalogue : LS004174, Worthington Biochemical Corporation), d'élastase (1,9 U/mL, no. catalogue : 32K13687, Worthington Biochemical Corporation), de protéase (1,4 U/mL, no. catalogue 9036060, Sigma-Aldrich) et de CaCl₂ (100 µM). Le maintien de la température à 35°C et du

pH à 6,9 sont deux paramètres permettant une activité enzymatique optimale de la collagénase de type II. Après 29 à 30 minutes de digestion, les morceaux de tissus sont rincés trois fois et transférés pendant quatre minutes dans une solution de Kraft-Brühe (KB) (en mM: 100 K⁺ glutamate, 10 K⁺ aspartate, 25 KCl, 10 KH₂PO₄, 4 MgSO₄, 20 taurine, 4,5 créatine, 20 glucose, 5 HEPES, 0,1% albumine de sérum bovin). La solution de KB permet d'arrêter la digestion du tissu. Par la suite, les tissus sont triturés avec une pipette pasteur pendant deux minutes dans le but d'obtenir les cellules du nœud sinusal. Ces cellules ont une morphologie différente de celles des cardiomyocytes contractiles (voir figure 9) et battent spontanément dans une solution de Tyrode-HEPES. Avant de réaliser les expériences, les cellules sont exposées à une réadaptation calcique : 27 et 57 μM de CaCl₂ sont ajoutés pendant quatre minutes. Finalement, 75 μM de CaCl₂ provenant d'une solution Tyrode-HEPES supplémentée de 0,1% d'albumine de sérum bovin sont ajoutés.

2.9 Électrophysiologie cellulaire

La technique de patch-clamp en mode voltage-imposé permet de mesurer les courants ioniques d'une cellule, par exemple les courants K⁺, Na⁺ et Ca²⁺ provenant de différents canaux ioniques. Les cellules isolées se retrouvent dans une solution extracellulaire. Une pipette en verre contenant une électrode et remplie d'une solution intracellulaire est déposée sur ces cellules (figure 16A). L'électrode a comme rôle d'imposer un voltage à la cellule. Ainsi, le courant d'une cellule à un voltage donné (figure 17) peut par la suite être enregistré en configuration cellule entière ou en configuration perforée (figure 16B).

La technique de patch-clamp est réalisée sur des cellules du nœud sinusal isolées. La solution de KB contenant les cellules doit préalablement être déposée sur la lamelle pendant 25 minutes, permettant ainsi aux cellules d'adhérer à la lamelle. Les cellules de type hiPSC-CM sont déjà sur une lamelle et peuvent être immédiatement utilisées. Les pipettes sont tirées à partir de capillaires de verre de borosilicate (World Precision Instruments, diamètre interne de 0,75 mm) et ont une résistance de 3-5 MΩ une fois remplies avec la solution intracellulaire. Les données acquises sont filtrées à 1 kHz (*low-pass filter*). L'enregistrement des données est obtenu à l'aide du système Axopatch 200B patch-clamp amplifieur et du logiciel Clampex 10.3,

tandis que l'analyse des résultats se fait à l'aide du logiciel Clampfit 10.3. Les protocoles de patch-clamp utilisés ont été adaptés des publications précédentes du laboratoire.^{74, 76}

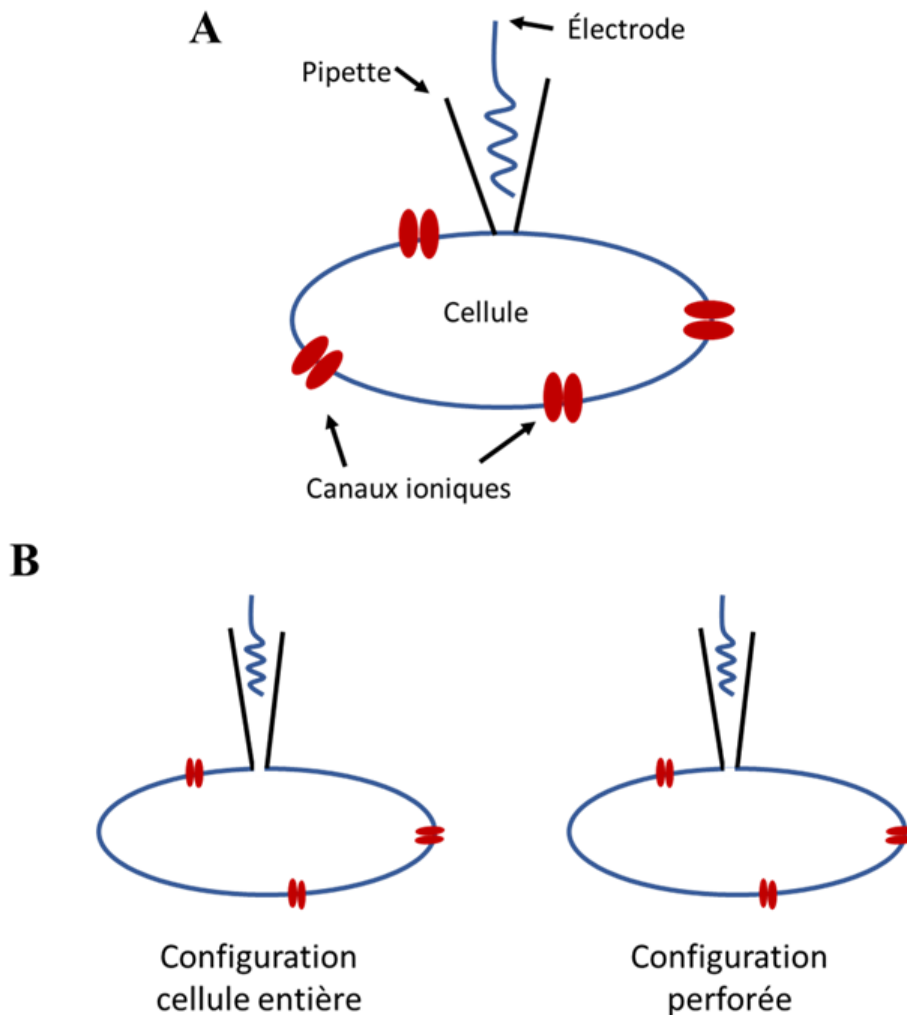


Figure 19. Configurations possibles pour la technique de patch-clamp. (A) Une pipette en verre contenant une électrode et une solution intracellulaire est déposée sur la membrane cellulaire. **(B)** La configuration cellule entière est obtenue lorsqu'une succion est appliquée sur la cellule. Ceci permet la rupture de la membrane cellulaire. La configuration perforée est obtenue sans succion grâce à l'ajout d'une solution de nystatine à la solution intracellulaire. La nystatine est un agent antifongique ayant la capacité de créer des pores dans les membranes cellulaires. Lorsque la nystatine perce les membranes des cellules isolées, seuls les ions monovalents peuvent passer les pores. Il est important de noter que l'accès à la cellule en configuration perforée est plus faible que celle en configuration cellule entière.

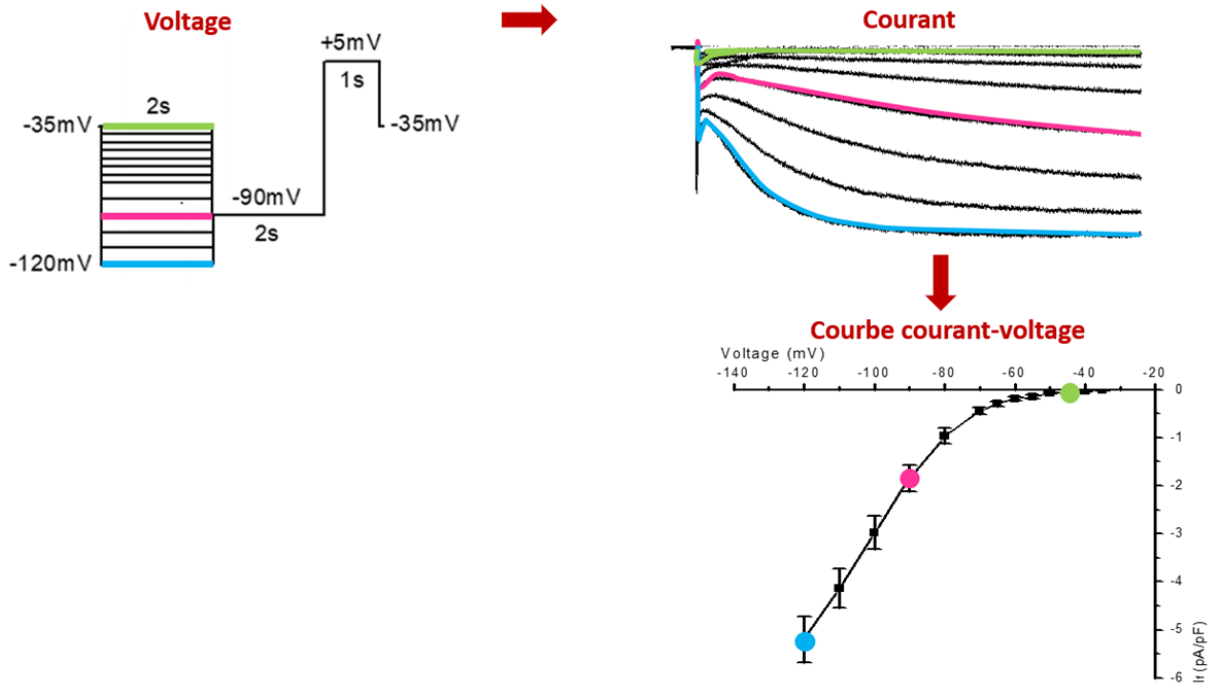


Figure 20. Patch-clamp en mode voltage-imposé. Cette technique de patch-clamp permet d'imposer un voltage à la cellule et le courant généré est enregistré. Une courbe courant-voltage peut par la suite être réalisée, où l'axe des X représente le voltage et l'axe des Y le courant. Vert : courant généré à un voltage imposé de -35 mV, Rose : courant généré à un voltage imposé de -90 mV, Bleu : courant généré à un voltage imposé de -120 mV.

Courant pacemaker (I_f): Les cellules isolées sont déposées dans une chambre d'enregistrement (volume total de 200 μ L) perfusée par une solution de Tyrode-HEPES continuellement oxygénée (en mM : 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 5,5 glucose, 1 CaCl₂, pH 7,4 avec NaOH 1 M) et maintenue à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Les pipettes sont remplies avec la solution intracellulaire suivante : (en mM) 6 NaCl, 5 HEPES, 140 K⁺-aspartate, pH 7,2 avec KOH 1 M, contenant 350 ng/mL de nystatine (No. catalogue : 1400619; Sigma-Aldrich) préalablement dissoute dans du DMSO (concentration finale : 0,5%) (No. catalogue : 67685; Sigma-Aldrich). La solution de nystatine peut être conservée à température pièce pour une période maximale d'une heure et demie. La perforation de la membrane cellulaire par la nystatine peut prendre entre une et quatre minutes. L'enregistrement est réalisé en mode voltage-imposé en utilisant la technique de patch-clamp en configuration perforée. Les

données ont été acquises à une fréquence de 20 kHz. Le courant pacemaker est mesuré à l'aide d'une série de tests de potentiel d'une durée de deux secondes chacun, allant de -35 mV à -120 mV, par augmentation de 5-10 mV chaque dix secondes. Chaque potentiel est précédé par un potentiel de maintien de -35 mV et suivi d'un potentiel à -90 mV pendant deux secondes et de +5 mV pendant une seconde. Ce protocole d'enregistrement du courant pacemaker I_f permet d'analyser la courbe d'activation du courant.

La solution intracellulaire contient des ions aspartates (Asp^-). Contrairement aux petits ions (i.e. Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), les Asp^- sont trop gros pour se rendre de la pipette vers l'intérieur de la cellule. Ainsi, ils génèrent une accumulation de charge négative à l'intérieur de la pipette. Ce phénomène est ce que l'on appelle le potentiel de jonction. Lors des enregistrements, le potentiel de jonction a été pris en compte et les valeurs obtenues ont été corrigées (-10 mV).

Potentiel d'action (PA) : Les solutions extra et intracellulaires sont les mêmes que pour l'enregistrement du courant I_f . La solution extracellulaire est maintenue à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, ce qui permet aux cellules de conserver leur activité électrique spontanée. L'enregistrement des potentiels d'action est réalisé en mode courant-imposé en utilisant la technique de patch-clamp perforée (nystatine). L'analyse des différents paramètres (i.e. fréquence, amplitude, MDP, Eth, DDR, capacitance) est réalisée sur une portion de l'enregistrement où les PA enregistrés sont stables pour un minimum de dix secondes. Les cellules de type nodal (NS ou N-hiPSC-CM) sont distinguables des cellules cardiaques contractiles par leur morphologie, leur taille, leur MDP ainsi que leur activité spontanée. Les valeurs des paramètres ont été corrigées en raison de la présence d'un potentiel de jonction (-10 mV).

Courants calciques (I_{Ca}) : Pour l'enregistrement des courants calciques, la chambre d'enregistrement est perfusée par la solution extracellulaire suivante : (en mM) 145 TEACl, 10 CsCl, 2 CaCl_2 , 0,5 MgCl_2 , 5 HEPES, 5,5 glucose, pH 7,4 avec CsOH 1 M, et est maintenue à température pièce ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Les pipettes sont remplies avec la solution intracellulaire suivante : (en mM) 100 Aspartate, 70 CsOH, 40 CsCl, 2 MgCl_2 , 4 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7,2 CsOH 1 M. Les ions présents dans cette solution ne génèrent pas de potentiel de jonction. L'enregistrement des courants calciques est réalisé en mode voltage-imposé en utilisant la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (figure 16B). (I_{CaL}) Le courant calcique de type L (I_{CaL}) est mesuré suite à une série de tests de potentiel d'une durée

de 250 ms chacun, allant de -40 mV à +70 mV, par augmentation de 5-10 mV chaque dix secondes. Le potentiel de maintien est de -40 mV afin que seul I_{CaL} soit enregistré. Les données ont été acquises à une fréquence de 20 kHz. (I_{CaT}) Le courant calcique de type T (I_{CaT}) résulte de la soustraction du courant I_{CaL} au courant calcique total a un voltage donné. ($I_{CaTotal}$) Le courant calcique total est enregistré suite à une série de tests de potentiel d'une durée de 250 ms chacun, allant de -80 mV à +60 mV, par augmentation de 5-10 mV chaque dix secondes. Le potentiel de maintien est de -80 mV. Les données ont été acquises à une fréquence de 4 kHz.

2.10 Transitoires calciques

La méthode des transitoires calciques permet de quantifier par fluorescence les fluctuations intracellulaires de calcium à chaque cycle cardiaque (transitoire calcique spontané) (figure 18). Chaque transitoire calcique spontané des cellules du NS est synchronisé avec son potentiel d'action. Cette méthode permet aussi de déterminer la quantité totale de calcium intracellulaire se retrouvant dans le réticulum sarcoplasmique. En fait, la caféine est un composé qui permet de maintenir les RyR2 ouverts, laissant ainsi sortir la totalité du Ca^{2+} vers le cytosol (transitoire calcique induit par la caféine).

Les transitoires calciques ont été enregistrés suivant l'adaptation d'un protocole précédemment publié par le laboratoire.⁷⁴ La méthode des transitoires calciques est réalisée sur des cellules isolées de NS de souris. La solution de KB contenant les cellules du nœud sinusal est mise en contact avec 5 μ M de fluo 4-AM (No. catalogue : F14201; Molecular Probes), préalablement dissout dans du DMSO (concentration finale : 0,2%). Les cellules sont par la suite déposées dans une chambre d'enregistrement pour une vingtaine de minutes, afin que l'agent fluorescent pénètre les cellules et que celles-ci adhèrent à la lamelle. La molécule AM-ester permet à l'agent fluorescent de pénétrer les membranes cellulaires. Les estérases présentes dans les cellules permettent au fluo 4 de se détacher du composé AM. Ceci empêche le fluo 4 de sortir de la cellule et ainsi de lier les ions Ca^{2+} intracellulaires. Les cellules sont par la suite perfusées pendant cinq minutes par une solution de Tyrode tamponnée à l'HEPES contenant 10 nM d'isoprotérénol (No. catalogue : 5984952, Sigma-Aldrich) maintenue à $37 \pm$

1°C. Après la perfusion d'une solution normale de Tyrode-HEPES, l'activité spontanée des cellules du nœud sinusal est observée grâce à la fluorescence enregistrée par un microscope

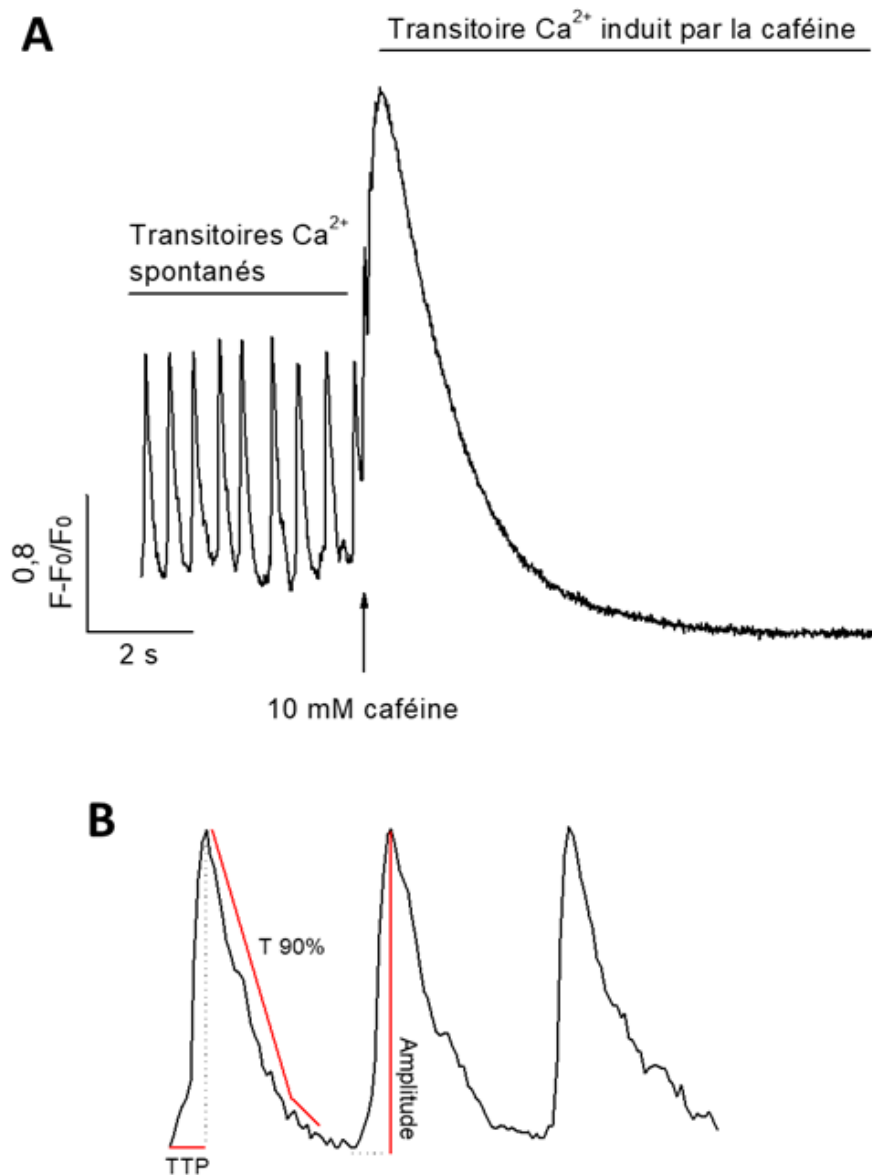


Figure 21. Représentation d'un enregistrement de transitoires calciques. (A) Enregistrement complet des transitoires calciques spontanés, suivis d'un transitoire calcique induit par l'application de 10 mM de caféine. **(B)** Représentation de transitoires calciques spontanés et des paramètres TTP (temps pour atteindre l'amplitude du transitoire calcique), T90% (temps pour atteindre 90% de déclinaison calcique) et l'amplitude du transitoire calcique.

d'imagerie confocale Zeiss LSM 710. Les transitoires calciques spontanés sont enregistrés sur une période de dix secondes. Par la suite, la quantité totale de calcium intracellulaire (transitoire calcique induit par la caféine) est mesurée suivant la perfusion de 10 mM de caféine (No. catalogue : Asc-240, Ascent Scientific) à l'aide d'un stylet (application locale de caféine). À cette concentration, l'application de caféine permet de maintenir les RyR2 ouverts, engendrant ainsi la déplétion de Ca^{2+} du le RS. L'analyse des résultats se faisait à partir du logiciel Clampfit 10.3. La signification des paramètres analysés sont présentés au tableau IV.

Tableau IV. Signification des différents paramètres des transitoires calciques

Paramètres des transitoires calciques	Signification
Fréquence (transitoires/minute)	Le nombre de transitoires calciques spontanés par minute
TTP (ms)	Le temps pour atteindre l'amplitude maximale du transitoire calcique
Amplitude $((F-F_0)/F_0)$	L'amplitude du transitoire calcique
T 90% (ms)	Le temps pour atteindre 90% de déclinaison calcique
<i>Fractional release</i> (%)	Ratio entre l'amplitude des transitoires calciques spontanés et de l'amplitude du transitoire calcique induit par la caféine

2.11 Culture cellulaire des cellules N-hiPSC-CM

Cette expérience a été réalisée en utilisant une adaptation du protocole décrit précédemment.⁷⁴ Les cellules hiPSC-CM (iCell[®] Cardiomyocytes²) ainsi que les solutions (milieu d'adhésion et milieu de maintien) proviennent de *Cellular Dynamics International* (Wisconsin). Les cellules utilisées pour les expériences proviennent d'une femme caucasienne âgée entre 35 et 39 ans. Afin de procéder à la décongélation, la fiole contenant les cellules doit tremper dans un bain-marie à 37°C pour une période précise de trois minutes. Par la suite, les cellules sont mises en contact avec le milieu d'adhésion et le nombre de cellules viables est déterminé par hématocytomètre. Les cellules sont finalement déposées dans plusieurs puits

contenant des lamelles, précédemment stérilisées et traitées à la fibronectine (permet l'adhérence des cellules). Les cellules sont finalement incubées à 37°C. Le milieu de culture (milieu de maintien) est rafraîchi aux deux jours.

Sept jours suivant la décongélation, les cellules de type nodal (N-hiPSC-CM) commencent à battre spontanément dans les pétris. Les cellules peuvent être utilisées pour les expériences à partir de la 14^e journée suivant la décongélation. Les hiPSC-CM sont traitées avec 100 nM d'E₂ (une fois par jour pour deux jours) ou avec le véhicule (éthanol 100%, concentration finale dans le milieu : 0,01%). Lors du traitement, le milieu de maintien est rafraîchi à chaque jour. Les cellules N-hiPSC-CM sont facilement identifiables par leur morphologie (taille, forme) et leur paramètres électrophysiologiques (morphologie du potentiel d'action, potentiel diastolique maximal, amplitude du potentiel d'action) différents des cardiomyocytes contractiles.

2.12 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés selon la moyenne \pm SEM (*Standard Error of the Mean*), où le n représente le nombre de cellules et N le nombre de souris. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée statistiquement différente. Le test statistique est spécifié dans chacune des descriptions de figure.

3 RÉSULTATS

3.1 Concentrations plasmatiques en 17 β -œstradiol (E₂)

À l'aide de la méthode d'ELISA, les concentrations plasmatiques basales de 17 β -œstradiol ont été mesurées dans les deux lignées de souris utilisées (CD-1 et C57BL/6). Pour les souris de la lignée CD-1 (figure 19A), l'E₂ a été mesurée chez les souris non-gestantes (SNG : 2,7 \pm 0,7 nM), les souris gestantes (SG : 23,3 \pm 5,0 nM) ainsi que les souris post-partum (PP : 2,2 \pm 0,3 nM). Tout comme chez les femmes enceintes¹⁶, les concentrations plasmatiques en E₂ des SG sont significativement augmentées (~10 fois) par rapport aux SNG (figure 19A). De plus, les concentrations plasmatiques en E₂ des souris PP retournent à des valeurs basales semblables à celles mesurées chez les SNG. Pour les souris de la lignée C57BL/6 (figure 19B), les niveaux basaux d'E₂ ont été mesurés chez les souris de type *wild-type* (WT : 0,8 \pm 0,1 nM), les souris ERKO α (1,5 \pm 0,1 nM) et ERKO β (1,1 \pm 0,1 nM). Les souris ERKO α ont un taux basal en E₂ plus élevé que les souris WT et ERKO β (figure 19B).

Par la suite, nous devons nous assurer que le traitement de 17 β -œstradiol administré aux souris atteignait des concentrations plasmatiques en E₂ similaires à celles retrouvées pendant la grossesse. Les concentrations plasmatiques en E₂ ont été mesurées chez les souris traitées à l'E₂ comparativement aux SG. Tel que présenté sur la figure 20, suite à un traitement à l'E₂, les souris femelles non-gestantes de type CD-1 (SNG : 17,0 \pm 3,9 nM), C57BL/6 *wild-type* (WT : 28,5 \pm 20,0 nM) et ERKO β (37,0 \pm 10,5 nM) atteignent des concentrations plasmatiques similaires à celles qui sont retrouvées chez les souris gestantes (SG : ligne pointillée rouge). Ces résultats valident à la fois le traitement hormonal et la voie d'administration orale de ce traitement. Toutefois, les concentrations plasmatiques des souris ERKO α (234,5 \pm 92,8 nM) sont beaucoup plus élevées, représentant près de dix fois les niveaux d'E₂ retrouvés pendant la grossesse. Ce résultat peut être expliqué par une concentration plasmatique de base plus élevée chez les souris ERKO α comparativement aux souris WT et ERKO β ainsi qu'au mode d'administration du traitement. En fait, l'E₂ est incorporé au Nutella[®] et les souris doivent le manger. Au moment de l'administration, j'ai observé que les souris ERKO α prenaient la totalité de leur traitement, tandis que les souris WT et

ERKO β en prenaient seulement la moitié. Ainsi, il y a plus d'E₂ qui se retrouve dans la circulation sanguine des souris ERKO α , comparativement aux souris WT et ERKO β .

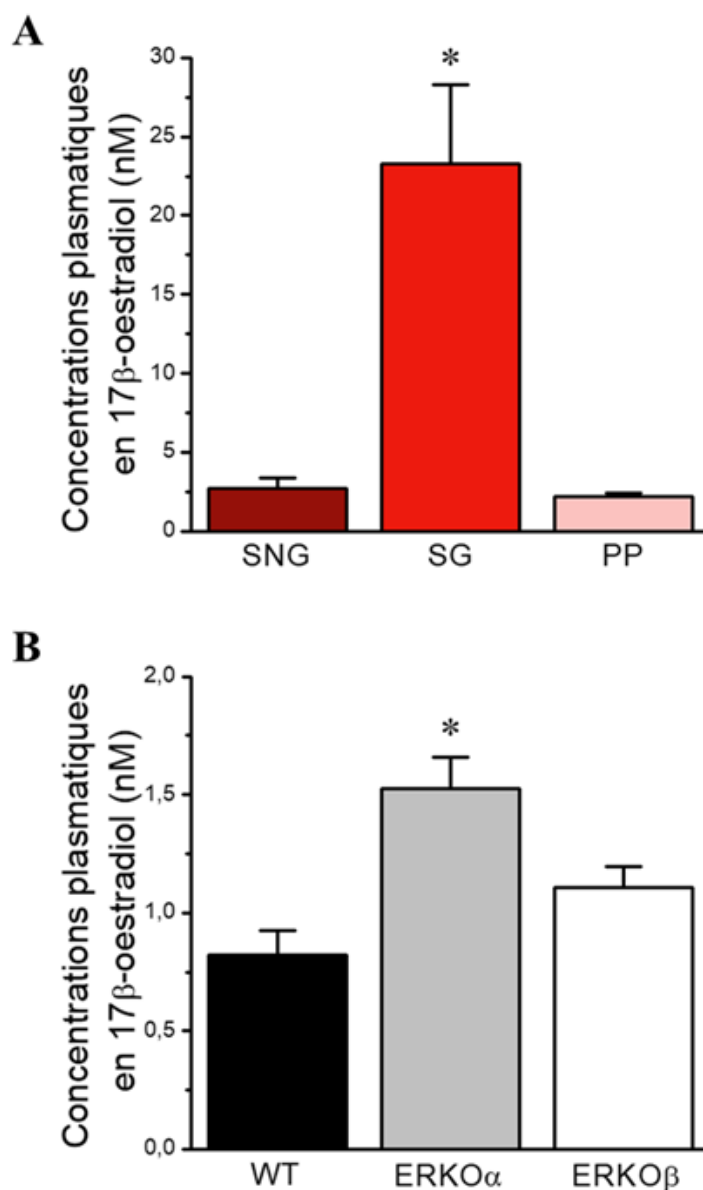


Figure 22. Concentrations plasmatiques basales en 17 β -œstradiol des souris des lignées CD-1 et C57BL/6. (A) Concentrations plasmatiques en E₂ des souris CD-1 SNG (N=4), SG (N=5) et PP (N=5). Test statistique : ANOVA à un facteur, où * p<0,001 par rapport à SNG et PP. **(B)** Concentrations plasmatiques en E₂ des souris C57BL/6 WT (N=6), ERKO α (N=8) et ERKO β (N=6). Test statistique : ANOVA à un facteur, où * p<0,05 par rapport à WT et ERKO β .

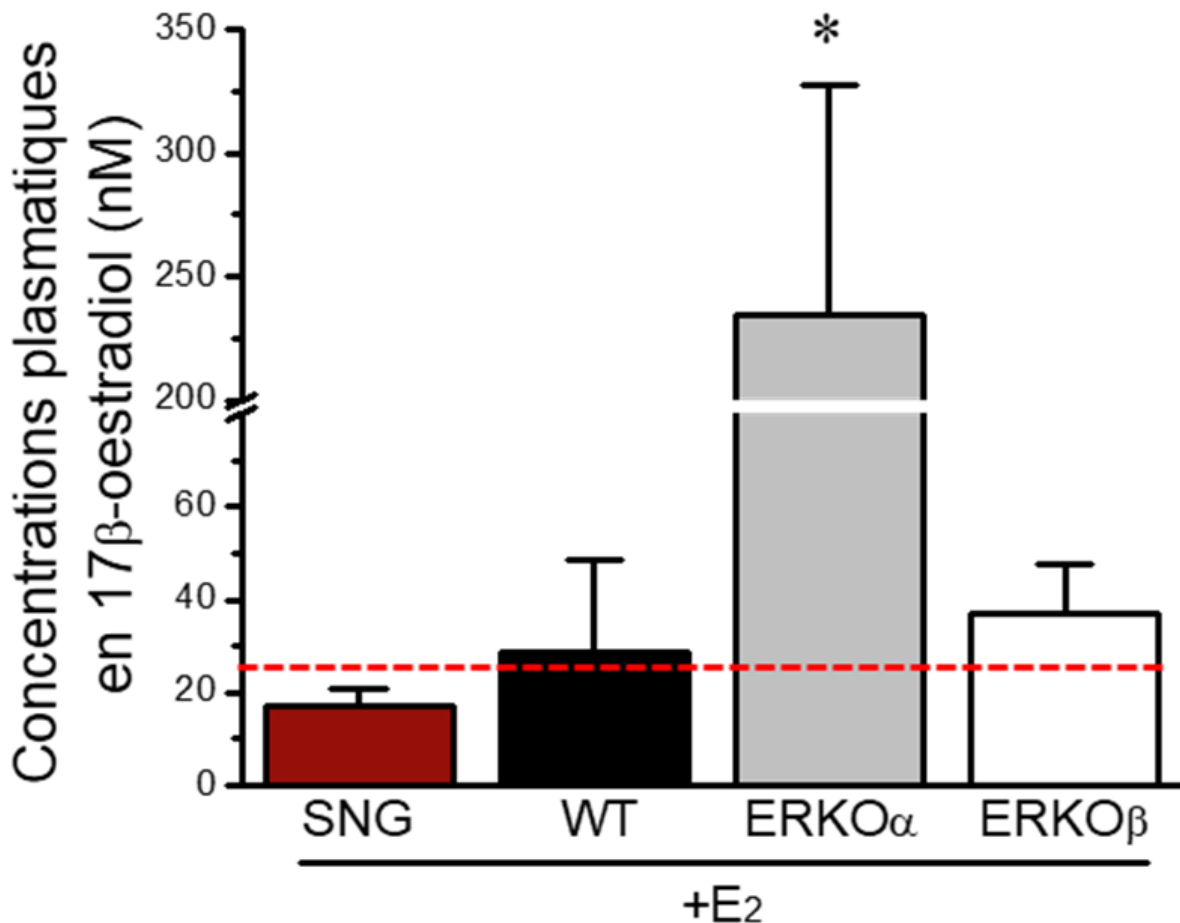


Figure 23. Concentrations plasmatiques en 17 β -œstradiol mesurées chez les souris CD-1 SNG et les souris C57BL/6 (WT, ERKO α , ERKO β) traitées à l'E₂. Ce graphique montre les concentrations plasmatiques des souris CD-1 SNG (N=9), C57BL/6 WT (N=4), ERKO α (N=5) et ERKO β (N=8) ayant reçu le traitement hormonal d'E₂. La concentration plasmatique moyenne retrouvée chez les souris CD-1 gestantes (N=5) est représentée par la ligne pointillée rouge sur le graphique à barres. Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été utilisée pour cette expérience, où * p<0,01.

3.2 Fréquence cardiaque des souris traitées au 17 β -œstradiol

Sachant que le traitement hormonal au 17 β -œstradiol était efficace et atteignait les concentrations plasmatiques d'E₂ similaires à celles attendues pendant la grossesse, nous avons réalisé des électrocardiogrammes de surface (ECG) sur les souris anesthésiées. Les ECG ont été effectués avant le traitement hormonal afin de déterminer la fréquence cardiaque basale des souris non gestantes (514 \pm 15 bpm), WT (518 \pm 15 bpm), ERKO α (520 \pm 16 bpm) et ERKO β (511 \pm 15 bpm) (figure 21C). L'analyse des résultats démontre que la FC de base des quatre groupes de souris est similaire. Ainsi, il est possible de comparer directement les deux lignées de souris.

Suivant un traitement chronique en 17 β -œstradiol, la fréquence cardiaque augmente chez les souris SNG (583 \pm 21 bpm), WT (571 \pm 12 bpm) et ERKO β (580 \pm 10 bpm) (figure 21A). Tel qu'illustré sur la figure 21B, ce changement de fréquence cardiaque équivaut à une augmentation moyenne de 69 bpm chez les SNG, 52 bpm chez les souris WT et 70 bpm chez les souris ERKO β . Malgré des concentrations plasmatiques considérablement élevées en E₂ chez les souris ERKO α suivant le traitement, leur FC (530 \pm 20 bpm) demeure inchangée (figure 21A et 21B). L'accélération de la FC chez les souris SNG, WT et ERKO β suivant un traitement à l'E₂ représente une augmentation de la FC entre 11 et 13%, soit le même pourcentage d'augmentation observé chez les souris gestantes.^{74, 76} Le traitement à l'E₂ récapitule à la fois les concentrations plasmatiques retrouvées pendant la grossesse ainsi que l'augmentation de la FC. Ces résultats prouvent que les niveaux élevés en œstrogènes retrouvés pendant la grossesse peuvent expliquer l'accélération de la FC. Les résultats obtenus à l'aide des souris déficientes en récepteurs aux œstrogènes alpha (ER α) prouvent que l'élévation de la FC est médiée par les ER α . Sachant que les œstrogènes peuvent se lier avec une affinité similaire sur les ER α et/ou ER β ^{28, 36}, il est possible d'affirmer que, contrairement aux ER α , les ER β ne sont pas impliqués dans l'augmentation de la FC associée à la grossesse. Suite à l'enregistrement des ECG de surface, différents paramètres ont été analysés pour les quatre groupes de souris (WT, ERKO α , ERKO β et SNG CD-1) : la durée de l'intervalle PR, du complexe QRS et de l'intervalle QT (figure 22). Malgré une augmentation de la fréquence cardiaque, tous ces paramètres restent inchangés suivant le traitement à l'E₂.

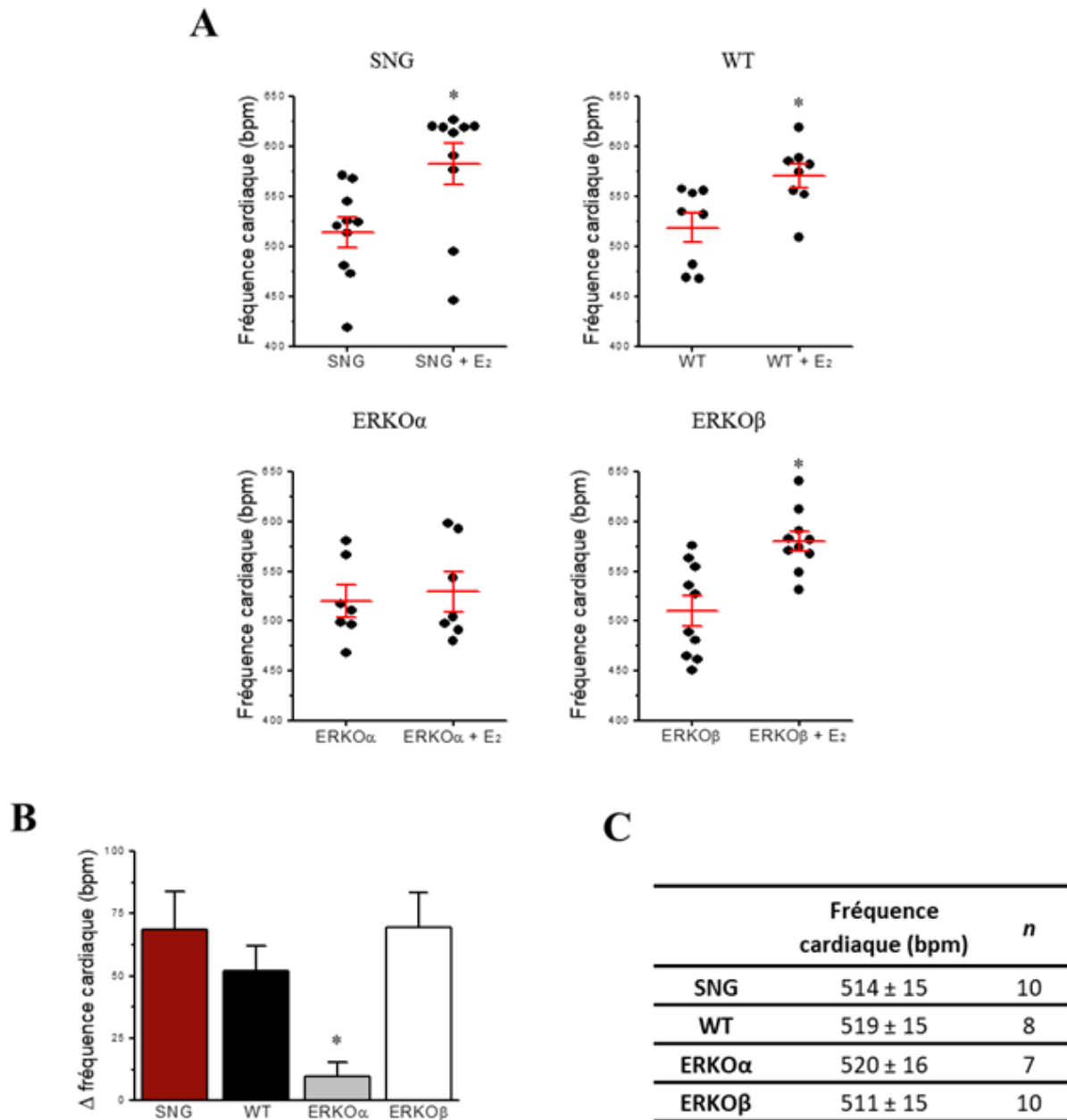


Figure 24. Fréquence cardiaque avant et après le traitement à l'E₂ dans les quatre groupes de souris. (A) Les nuages de points représentent la fréquence cardiaque des souris SNG, WT, ERKO α et ERKO β avant et après le traitement aux œstrogènes. Analyse statistique : Test T de Student pairé, où * $p \leq 0,001$. (B) Ce graphique illustre la différence de fréquence cardiaque après le traitement. Test statistique : ANOVA à un facteur, où * $p < 0,01$ par rapport à SNG, WT et ERKO β . (C) Fréquence cardiaque basale des quatre groupes de souris.

A	FC (bpm)	Intervalle PR (ms)	QRSc (ms)	QTc (ms)
WT	520 ± 15	35,5 ± 0,8	8,2 ± 0,6	37,2 ± 6,7
WT + E ₂	571 ± 16	34,7 ± 0,7	8,5 ± 0,3	40,3 ± 1,2
p-value	0,001	0,430	0,592	0,584
N = 8 (QT : N = 2)				

B	FC (bpm)	Intervalle PR (ms)	QRSc (ms)	QTc (ms)
ERKO α	520 ± 16	34,3 ± 0,5	8,1 ± 0,3	38,2 ± 3,7
ERKO α + E ₂	530 ± 21	34,2 ± 0,7	8,4 ± 0,3	36,7 ± 2,2
p-value	0,115	0,684	0,442	0,696
N = 7 (QT : N = 3)				

C	FC (bpm)	Intervalle PR (ms)	QRSc (ms)	QTc (ms)
ERKO β	511 ± 15	35,6 ± 0,5	8,3 ± 0,2	42,1 ± 1,0
ERKO β + E ₂	580 ± 10	34,8 ± 0,4	8,0 ± 0,3	39,6 ± 0,9
p-value	< 0,001	0,195	0,543	0,130
N = 10 (QT : N = 8-9)				

D	FC (bpm)	Intervalle PR (ms)	QRSc (ms)	QTc (ms)
CD1	514 ± 15	35,7 ± 0,6	7,7 ± 0,4	36,2 ± 2,5
CD1 + E ₂	583 ± 21	32,9 ± 0,9	8,5 ± 0,5	36,4 ± 4,0
p-value	0,001	0,057	0,251	0,954
N = 9-10 (QT : N = 2)				

Figure 25. Mesure des paramètres des ECG. La fréquence cardiaque (FC), l'intervalle PR, le complexe QRS corrigé (QRSc) ainsi que l'intervalle QT corrigée (QTc) sont les paramètres qui ont été mesurés suivant l'enregistrement de l'électrocardiogramme de surface des souris WT (A), ERKO α (B), ERKO β (C) et SNG CD-1 (D) avant et après le traitement à l'E₂. Seule la fréquence cardiaque est statistiquement différente entre les groupes non-traités et traités à l'E₂. L'analyse statistique utilisée est le test T de Student pairé.

3.3 Potentiels d'action spontanés des cellules de NS et de type nodal

Sachant que le traitement hormonal atteint les concentrations plasmatiques en E_2 retrouvées pendant la grossesse et accélère la fréquence cardiaque des souris, nous voulions étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'augmentation de la FC régulés par les œstrogènes. Puisque l'accélération de la FC est observée chez les souris ERKO β et non chez les ERKO α , les potentiels d'action spontanés des cellules du nœud sinusal de ces souris ont été mesurés à l'aide de la méthode du patch-clamp en mode courant-imposé. Dans le but de déterminer si ces mécanismes peuvent être applicables à l'humain, nous avons aussi mesuré les PA spontanés des cellules hiPSC-CM de type nodal. Les PA n'ont pas été mesurés sur les cellules de NS des souris ERKO α puisque la FC est inchangée suivant un traitement à l' E_2 . Suite à l'enregistrement des PA spontanés des cellules de type nodal, la fréquence des PA, la pente de dépolarisation diastolique (DDR), le potentiel seuil (Eth), le potentiel diastolique maximal (MDP), l'amplitude (APA) et la capacitance cellulaire ont été analysés.

3.3.1 Souris ERKO β

À la figure 23A, il est possible de voir un tracé typique de l'enregistrement des potentiels d'action spontanés des cellules de nœud sinusal des souris ERKO β traitées ou non à l' E_2 . L'analyse des résultats démontrent une accélération significative de la fréquence des PA des cellules de NS chez les souris ERKO β traitées à l' E_2 (354 ± 23 bpm) comparativement aux souris ERKO β recevant seulement le véhicule (284 ± 24 bpm) (figure 23B). Ces résultats montrent que le traitement à l' E_2 accélère la fréquence cardiaque par une augmentation de l'automaticité des cellules du nœud sinusal. Ces résultats sont similaires à ceux qui ont été observés chez les souris CD-1 gestantes.⁷⁶ De plus, la DDR des PA, un paramètre important dans l'automaticité cellulaire du NS, est plus rapide lorsque les souris sont traitées à l' E_2 (ERKO β : 82 ± 12 mV/s; ERKO β + E_2 : 140 ± 14 mV/s), ce qui concorde avec l'augmentation de la fréquence des PA. L'accélération de la fréquence des PA et de la DDR observée chez les souris ERKO β démontre que l' E_2 modifie l'automaticité cardiaque.

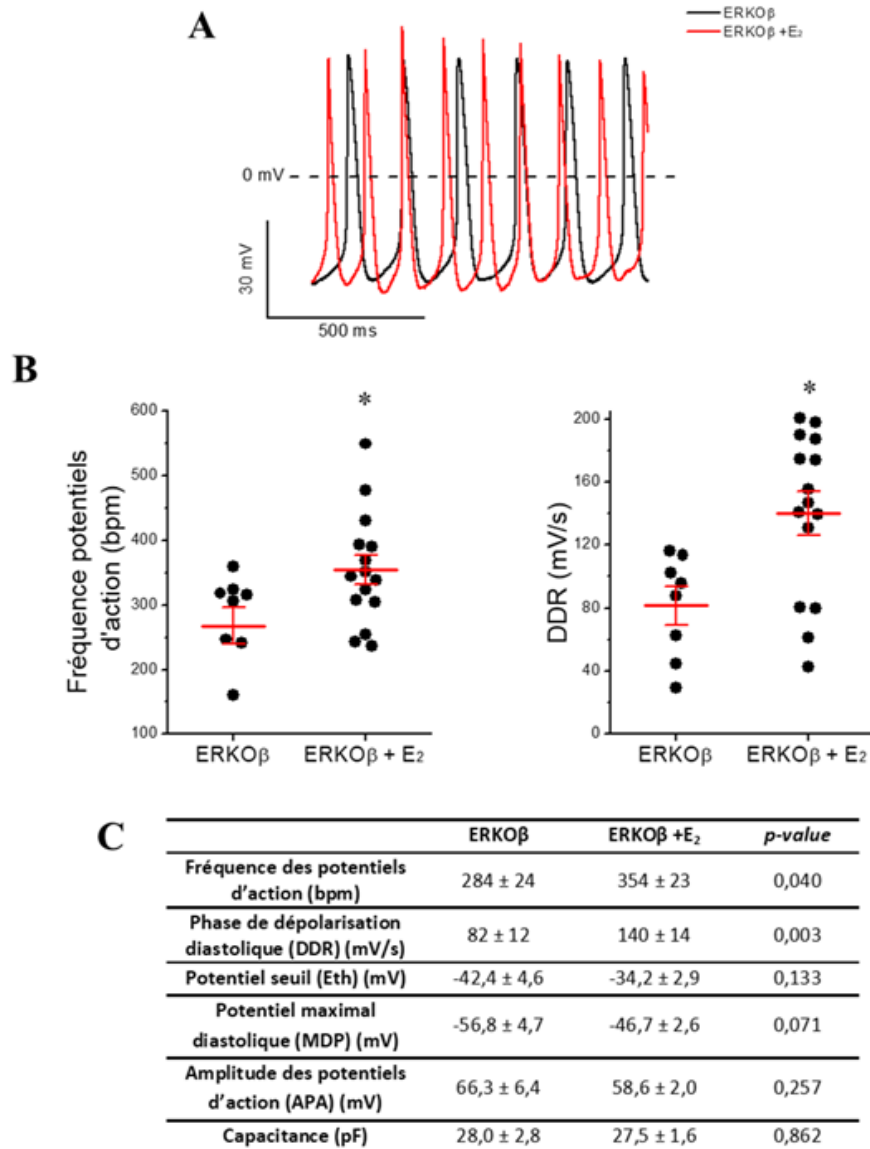


Figure 26. Potentiels d'action spontanés des cellules de nœud sinusal des souris ERKO β traitées à l'E₂. Différents paramètres des potentiels d'action spontanés des cellules de nœud sinusal des souris ERKO β (n = 7-8; N = 6) et ERKO β +E₂ (n = 12-15; N = 7). L'analyse statistique utilisée est le test T de Student non païré (* p < 0,05). **(A)** Tracés typiques des PA des cellules de NS des souris ERKO β traitées (en rouge) ou non (en noir) à l'E₂. **(B)** Les nuages de points représentent la fréquence des potentiels d'action et la pente de dépolarisation diastolique (DDR). **(C)** Valeurs des différents paramètres du potentiel d'action (Eth : potentiel seuil; MDP : potentiel maximal diastolique; APA : amplitude du PA) et de la capacitance cellulaire.

La fréquence des potentiels d'action des cellules de NS (284 bpm) ne coïncide pas avec la valeur de la FC (511 bpm). En fait, chez les souris, le système nerveux sympathique et parasympathique sont présents. Toutefois, c'est le système nerveux sympathique qui domine la FC. Ainsi, lorsque le NS est isolé de la souris, le système nerveux sympathique n'est plus présent et c'est pourquoi la fréquence des PA spontanés est plus faible que la fréquence cardiaque.

Suivant l'enregistrement des PA spontanés, le potentiel seuil (Eth), le potentiel diastolique maximal (MDP) ainsi que l'amplitude du PA ont été mesurés. Aucune différence statistiquement significative n'est observée suivant le traitement à l'E₂ (figure 23C). Finalement, la capacitance des cellules est similaire entre le groupe ERKOβ (28,0 ± 2,8 pF) et ERKOβ +E₂ (27,5 ± 1,6 pF). Ceci nous indique que le traitement à l'E₂ n'affecte pas la taille des cellules. Les résultats sont similaires à ce qui a été observé chez les SNG et SG de la lignée CD-1.⁷⁶ En effet, aucun de ces paramètres (Eth, MDP, amplitude, capacitance) n'étaient modifiés pendant la grossesse.

3.3.2 Cellules N-hiPSC-CM

La figure 24A illustre les tracés typiques des PA spontanés d'une cellule N-hiPSC-CM traitée ou non à l'E₂. La fréquence des potentiels d'action ainsi que la DDR des PA des cellules N-hiPSC-CM sont présentées à la figure 24B. Une accélération de la fréquence des PA est observée dans les cellules traitées à l'E₂ (99 ± 6 bpm) comparativement aux cellules traitées avec le véhicule (69 ± 5 bpm). En lien avec ces résultats, la DDR est aussi significativement plus rapide (CTL : 34 ± 5 mV/s; +E₂ : 55 ± 5 mV/s). Une augmentation de la fréquence des PA et de la DDR observée dans les N-hiPSC-CM suivant un traitement à l'E₂ démontre l'applicabilité humaine de nos résultats. En d'autres termes, les mécanismes par lesquels l'E₂ régule l'automaticité cardiaque chez la souris sont semblables à ce qui est observé dans un modèle cellulaire humain. Les paramètres des PA spontanés (Eth, MDP, amplitude) présentés à la figure 24C ne sont pas statistiquement différents suite à un traitement à l'E₂. La capacitance des cellules N-hiPSC-CM est similaire entre le groupe CTL (70,3 ± 10,4 pF) et +E₂ (65,7 ± 5,4 pF), c'est-à-dire que l'E₂ ne modifie pas la taille des cellules hiPSC-CM, tout comme dans les cellules du NS des souris ERKOβ.

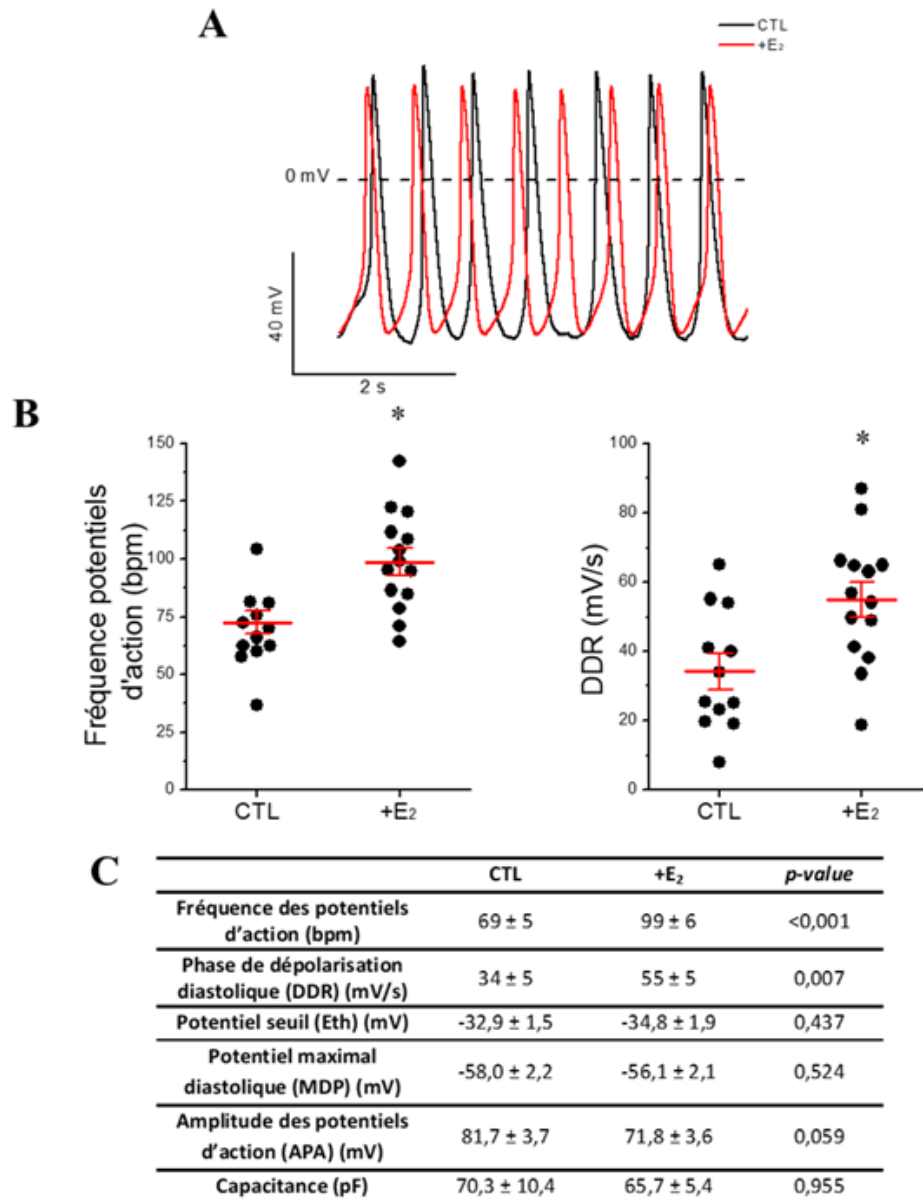


Figure 27. Potentiels d'action spontanés des hiPSC-CM de type nodal traitées à l'E₂. Différents paramètres des potentiels d'action spontanés des cellules CTL (n = 11-12) et +E₂ (n = 13-14). L'analyse statistique employée est le test T de Student non païré (* p < 0,05). **(A)** Tracés typiques des PA des cellules N-hiPSC-CM traitées (en rouge) ou non (en noir) à l'E₂. **(B)** Les nuages de points représentent la fréquence des potentiels d'action et la pente de dépolarisation diastolique (DDR). **(C)** Valeurs des différents paramètres du potentiel d'action (Eth : potentiel seuil; MDP : potentiel maximal diastolique; APA : amplitude du PA) et de la capacitance cellulaire.

Les valeurs de la fréquence des PA spontanés et de la DDR des N-hiPSC-CM sont moins élevées que celles des cellules de nœud sinusal des souris ERKO β . Il est normal que ces valeurs ne soient pas similaires. En effet, la fréquence cardiaque d'une souris est d'environ 700 bpm, tandis que la FC de l'humain est en moyenne de 72 bpm. La fréquence des PA spontanés diffère aussi entre les espèces.

3.4 Courant pacemaker I_f des cellules de NS et des hiPSC-CM de type nodal

Puisque la fréquence des potentiels d'action est accélérée, nous voulions déterminer par quels mécanismes cette augmentation était régulée. Nous avons tout d'abord enregistré le courant I_f , un important courant ionique dans l'automaticité des cellules du nœud sinusal. Ce courant a été mesuré dans les cellules de NS des souris ERKO β et ERKO α ainsi que dans les cellules N-hiPSC-CM.

3.4.1 Souris ERKO β

La figure 25B illustre la courbe courant-voltage (IV) du courant I_f des cellules du nœud sinusal des souris ERKO β suivant le traitement à l'E₂. À -90 mV, la densité du courant I_f est plus élevée chez les souris traitées à l'E₂ ($-11,0 \pm 1,3$ pA/pF), comparativement aux souris ayant seulement reçu le véhicule ($-6,6 \pm 0,7$ pA/pF). Les courbes typiques du courant I_f des cellules de NS des souris ERKO β et ERKO β +E₂ sont illustrées à la figure 25A. Tout comme il a été observé chez les souris gestantes⁷⁶, ces résultats démontrent que l'augmentation de la fréquence cardiaque est expliquée par une augmentation de la densité du courant I_f . De plus, l'augmentation du courant I_f est médiée par le récepteur aux œstrogènes alpha.

3.4.2 Souris ERKO α

La courbe IV illustrée à la figure 26B montre que le courant pacemaker I_f des cellules de NS des souris ERKO α n'est pas affecté par le traitement à l'E₂. En effet, à -90mV, la densité du courant est de $-6,2 \pm 1,0$ pA/pF pour le groupe contrôle et $-6,4 \pm 1,1$ pA/pF pour le groupe traité à l'E₂ (figure 7B). Les résultats obtenus chez les souris ERKO α concordent avec le fait que la fréquence cardiaque de ces souris reste la même suite à l'administration d'E₂.

Nous pouvons aussi confirmer que les récepteurs aux œstrogènes bêta n'ont pas de rôle à jouer dans l'augmentation de la FC induite par les œstrogènes.

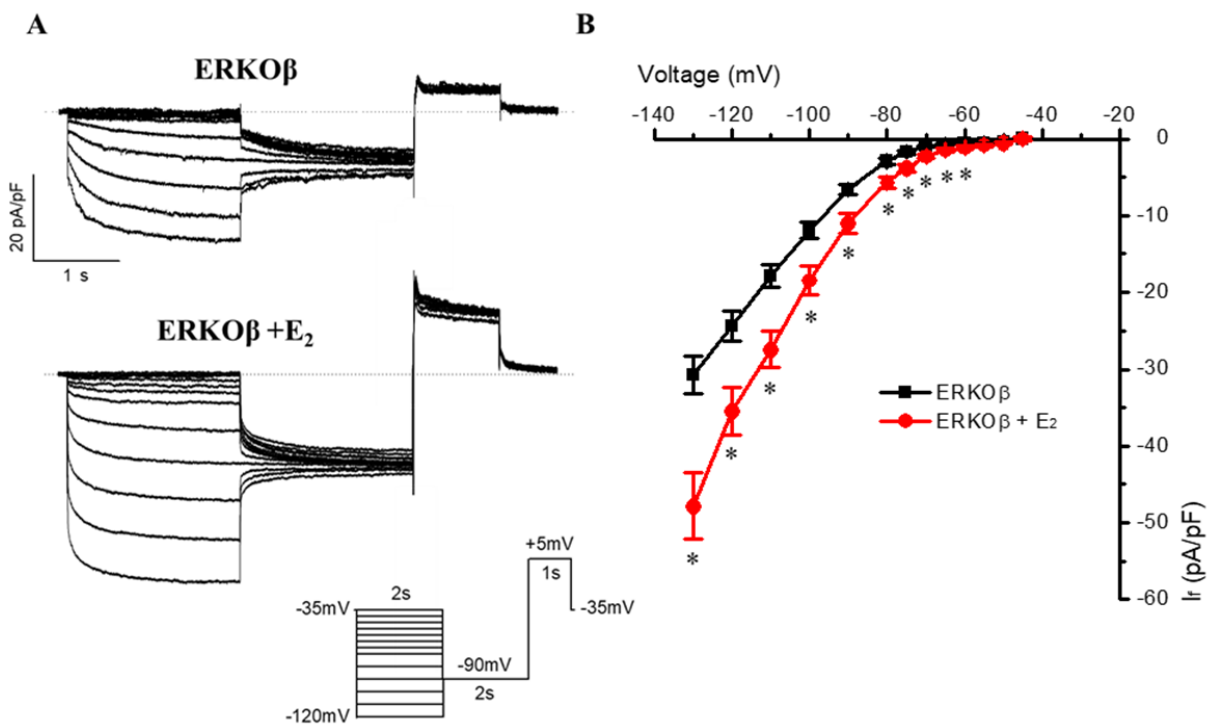


Figure 28. Courant pacemaker (I_f) des cellules de nœud sinusal des souris ERKO β traitées à l'E $_2$. (A) Tracés typiques du courant I_f enregistré sur des cellules de NS de souris ERKO β traitées ou non à l'E $_2$. Le protocole d'enregistrement est aussi présenté. (B) Courbe IV montrant que le courant est augmenté lorsque les souris sont traitées avec de l'E $_2$ (ERKO β + E $_2$: n=9-11, N=4), comparativement aux souris non-traitées (ERKO β : n=12-15, N=4). L'analyse statistique employée est le test T de Student non païré (* $p < 0,05$).

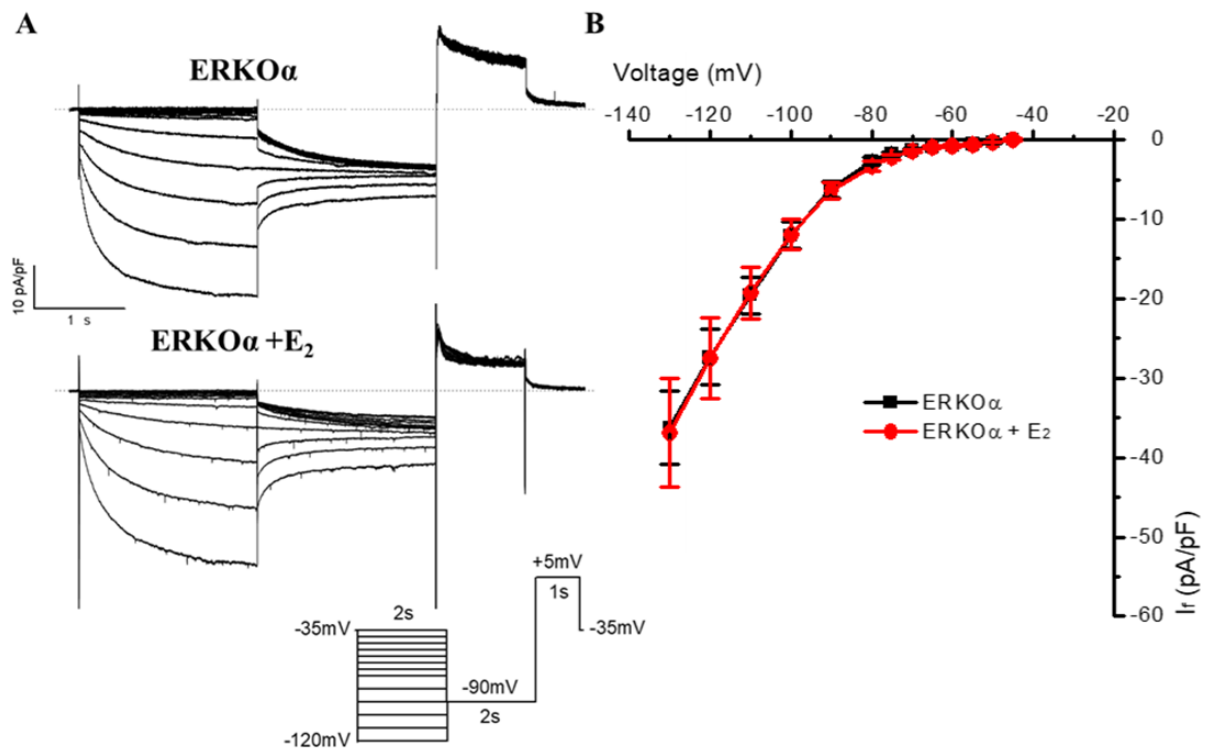


Figure 29. Courant pacemaker (I_f) des cellules de nœud sinusal des souris ERKO α traitées à l' E_2 . (A) Tracés typiques du courant I_f enregistré sur des cellules de NS de souris ERKO α traitées ou non à l' E_2 . Le protocole d'enregistrement est présenté. (B) Courbe IV montrant que le courant est similaire, peu importe si les souris sont traitées (ERKO α + E_2 : n=6, N=2) ou non (ERKO α : n=4, N=1) à l' E_2 . L'analyse statistique employée est le test T de Student non pairé.

3.4.3 Cellules N-hiPSC-CM

Tout comme les cellules de NS de souris, les cellules N-hiPSC-CM sont caractérisées par leurs PA spontanés, un potentiel diastolique maximal de -55 mV, une phase de dépolarisation diastolique ainsi qu'un courant pacemaker I_f . Dans les N-hiPSC-CM, la densité de I_f est plus grande suivant l'administration d' E_2 (à -90 mV : CTL : $-0,95 \pm 0,14$ pA/pF; + E_2 : $-1,62 \pm 0,17$ pA/pF) (figure 27B). La courbe typique du courant I_f est beaucoup plus grande pour le groupe traité à l' E_2 , comparativement au groupe contrôle (figure 27A). Ces résultats sont les mêmes que ceux observés dans des cellules de NS des souris ERKO β et des souris gestantes.

Les résultats obtenus sur le courant pacemaker dans un modèle cellulaire murin et humain démontrent que l'augmentation de la FC associée à la grossesse est expliquée par une augmentation de la densité de I_f et que celui-ci est régulé par des concentrations d'œstrogènes retrouvées pendant la grossesse.

Généralement, plus la fréquence cardiaque est élevée, plus la fréquence des potentiels d'action spontanés est rapide et plus la densité de I_f est grande, et vice-versa. Selon les résultats, la densité du courant pacemaker I_f est plus faible dans les cellules N-hiPSC-CM (modèle humain) que dans les cellules de NS des souris. Ceci est expliqué par le fait que les souris ont une FC au repos beaucoup plus rapide que les humains (700 bpm vs 72 bpm). Cette FC plus grande chez la souris est, entre autres, compensée par une densité de I_f plus élevée.

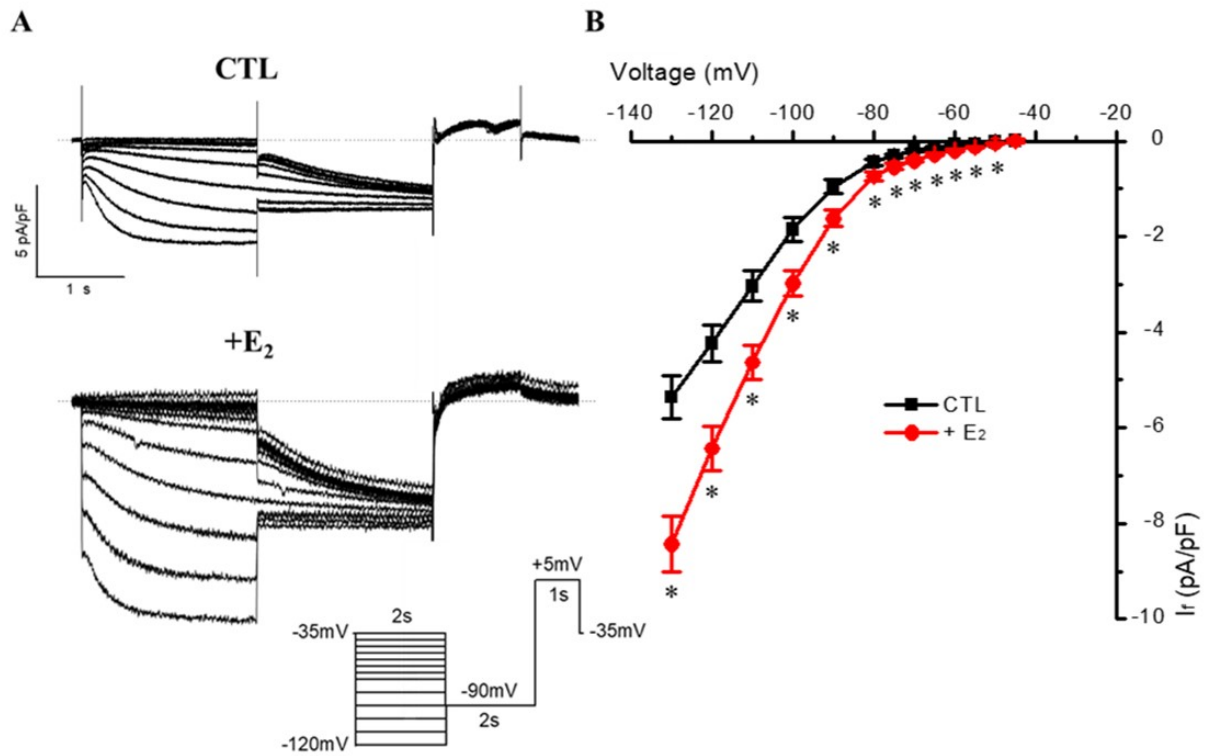


Figure 30. Courant pacemaker (I_f) des cellules N-hiPSC-CM traitées ou non à l'E₂. (A) Tracés typiques du courant I_f enregistré sur des cellules hiPSC-CM de type nodal traitées avec ou sans E₂. (B) Courbe courant voltage (IV) montrant que le courant est augmenté lorsque les cellules sont traitées avec de l'E₂ (+E₂ : n=13-14), comparativement aux cellules non traitées (CTL : n=7-10). L'analyse statistique employée est le test T de Student non païré (* $p < 0,05$).

3.5 Homéostasie calcique

L'automaticité cardiaque est régulée par différents courants ioniques (*voltage clock*) ainsi que par des fluctuations intracellulaires de calcium (*calcium clock*). Le laboratoire a précédemment démontré que la fréquence des transitoires calciques et que le courant calcique de type L était modifié pendant la grossesse.⁷⁴ Dans la prochaine série d'expériences, les transitoires calciques et le courant I_{CaL} ont respectivement été étudiés dans des cellules de nœud sinusal de souris et des cellules hiPSC-CM de type nodal suivant un traitement à l' E_2 , dans le but de déterminer si les changements observés pendant la grossesse sont médiés par les œstrogènes.

3.5.1 Transitoires calciques

La méthode des transitoires calciques a été réalisée sur les cellules de NS de souris WT, ERKO α et ERKO β suite à l'administration d' E_2 . Suivant l'acquisition des données, plusieurs paramètres ont été analysés.

3.5.1.1 Transitoires calciques spontanés

Les paramètres analysés des transitoires calciques spontanés sont présentés à la figure 28. La fréquence des transitoires calciques, le temps pour atteindre l'amplitude maximale (TTP), l'amplitude des transitoires Ca^{2+} $((F-F_0)/F_0)$ ainsi que le temps pour atteindre 90% de déclinaison calcique (T 90%) sont quatre paramètres qui ont été analysés pour les cellules de NS des souris WT (figure 28B), ERKO α (figure 28C) et ERKO β (figure 28D). Suivant l'administration d' E_2 , aucune différence n'a été observée dans la fréquence des transitoires calciques (transients/minutes) pour les groupes WT (147 ± 12 ; + E_2 : 154 ± 10), ERKO α (139 ± 15 ; + E_2 : 142 ± 14) et ERKO β (142 ± 11 ; + E_2 : 147 ± 13). La fréquence des transitoires calciques est la même entre les groupes de souris non traitées et traitées. Ceci suggère que l'augmentation de la fréquence des transitoires calciques observée pendant la grossesse n'est pas expliquée par les concentrations élevées en E_2 .

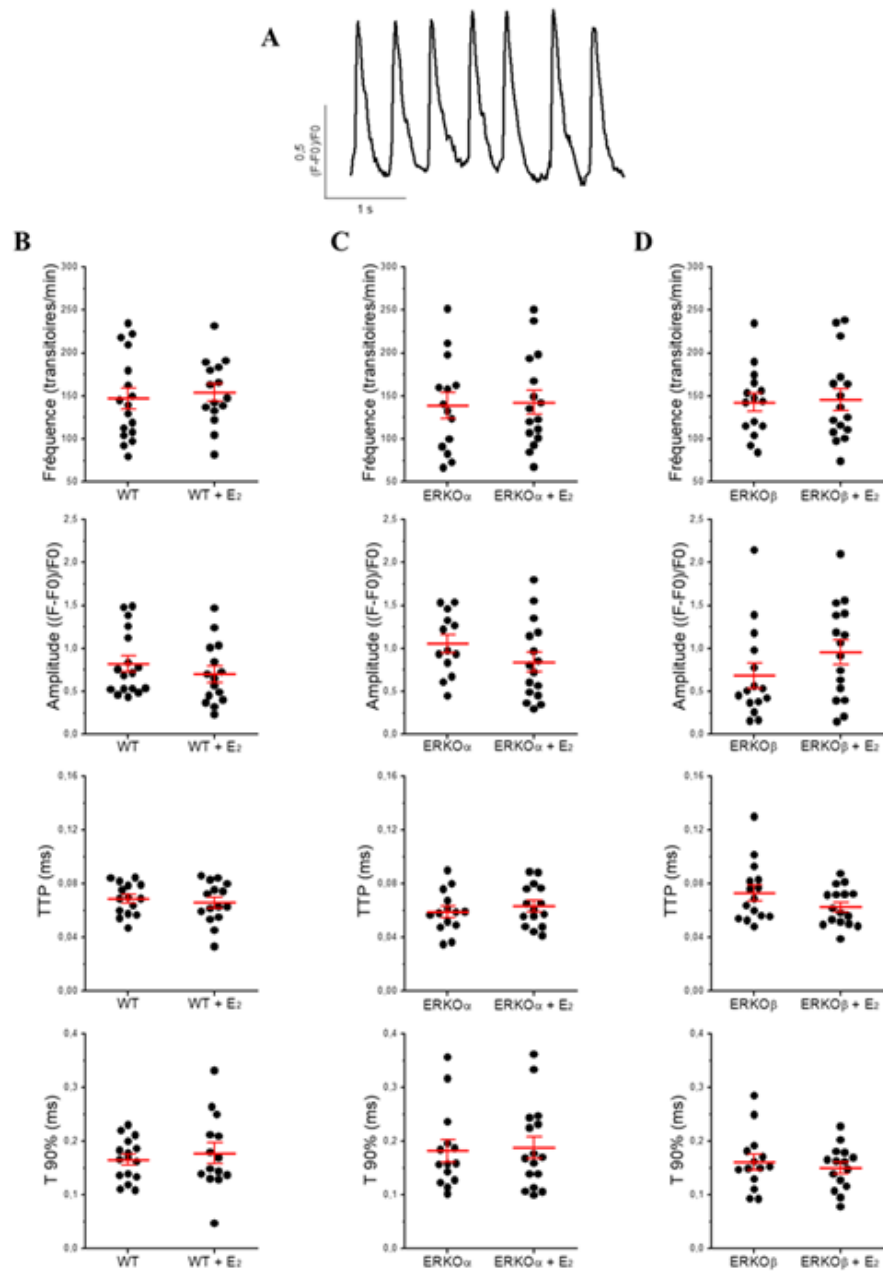


Figure 31. Paramètres des transitoires calciques spontanés des souris WT, ERK α et ERK β traitées à l'E₂. (A) Tracé typique de transitoires calciques spontanés. De haut en bas : fréquence, amplitude, temps pour atteindre l'amplitude maximale (TTP), temps pour atteindre 90% de déclinaison calcique (T 90%) des transitoires calciques des cellules de NS des souris (B) WT (n = 15-17; N = 6) et WT +E₂ (n = 14-15, N=4), (C) ERK α (n = 13-14; N = 3) et ERK α +E₂ (n = 15-16; N = 3), (D) ERK β (n = 14-15; N = 3) et ERK β +E₂ (n = 15-16; N = 4). L'analyse statistique utilisée est le test T de Student non pairé.

Généralement, la fréquence cardiaque et la fréquence des transitoires calciques sont proportionnelles. En d'autres termes, plus la fréquence cardiaque est rapide, plus la fréquence des transitoires calciques l'est aussi, et vice-versa. Toutefois, ces résultats démontrent que malgré une accélération de la FC, la fréquence des transitoires Ca^{2+} n'est pas modifiée par l'E₂. Ceci suggère qu'un autre mécanisme est responsable de la régulation de la fréquence des transitoires calciques pendant la grossesse.

Suivant un traitement à l'E₂, aucune différence n'est observée pour le TTP (temps pour atteindre l'amplitude maximale), l'amplitude et le T 90% (temps pour atteindre 90% de déclinaison calcique) pour chaque groupe de souris (WT, ERKO α et ERKO β). Ces résultats démontrent que (1) le temps pour atteindre le pic du transitoire calcique, (2) la quantité de calcium sortant à chaque transitoire calcique et (3) que le temps pour revenir à 90% de déclinaison calcique sont des paramètres non modifiés par les œstrogènes.

3.5.1.2 Transitoires calciques induits par la caféine

Suite à l'enregistrement des transitoires calciques spontanés, il y a application de caféine sur les cellules de NS. La caféine est un composé qui se lie au RyR2 et qui active ce récepteur. Ainsi, la totalité du Ca^{2+} présent dans le réticulum sarcoplasmique sort vers le cytosol de la cellule et peut être mesuré par fluorescence. Les paramètres analysés pour les transitoires calciques induits par la caféine sont illustrés à la figure 29. On y retrouve l'amplitude du transitoire calcique induit par la caféine ainsi que le *fractional release*, un ratio entre la quantité de calcium des transitoires calciques spontanés par rapport à la quantité de calcium du transitoire calcique induit par la caféine. L'amplitude des transitoires calciques induits par la caféine sont similaires pour chacun des groupes, ce qui signifie que la quantité totale de calcium retrouvée dans le réticulum sarcoplasmique des cellules de NS est la même pour chacun des groupes et n'est pas affectée par le 17 β -œstradiol. Seul le *fractional release* (%) des souris ERKO α traitées diminue comparativement au groupe non traité à l'E₂ (52 \pm 4%; +E₂ : 30 \pm 6%) (figure 29B). Aucune différence n'est observée dans le *fractional release* pour les groupes WT (34 \pm 4%; +E₂ : 38 \pm 4%) et ERKO β (35 \pm 5%; +E₂ : 45 \pm 5%). Ces résultats suggèrent que, à chaque transitoire calcique, les souris ERKO α ont plus de Ca^{2+}

sortant du réticulum sarcoplasmique comparativement aux souris WT et ERKO β et que cette différence est renversée suivant le traitement à l'E₂.

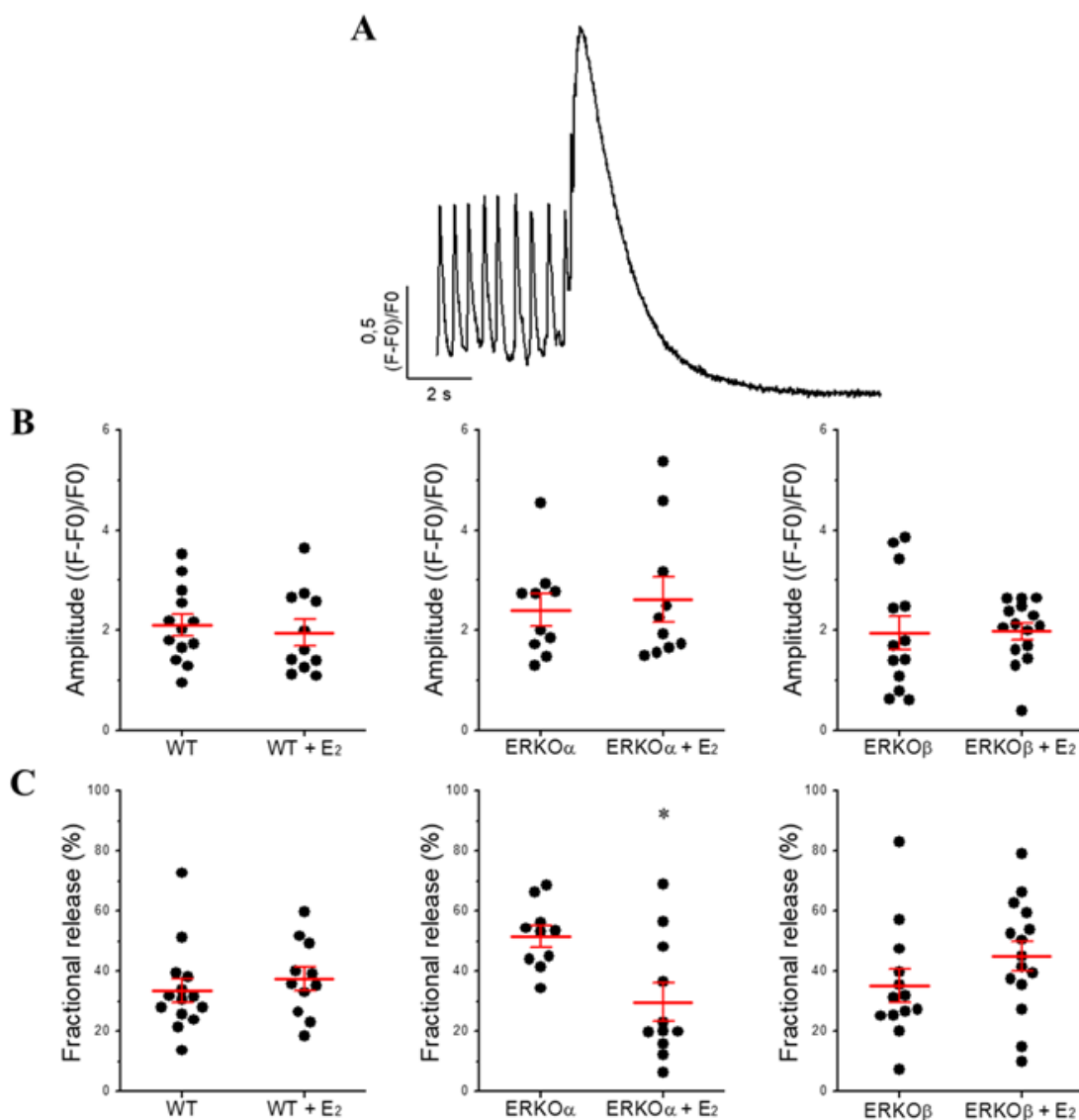


Figure 32. Paramètres des transitoires calciques induits par la caféine des souris WT, ERKO α et ERKO β traitées à l'E₂. Les paramètres suivants ont été analysés pour les groupes de souris WT (n = 13-14; N = 6), WT +E₂ (n = 11, N=4), ERKO α (n = 10; N = 3), ERKO α +E₂ (n = 10-11; N = 3), ERKO β (n = 13; N = 3) et ERKO β +E₂ (n = 15; N = 4). **(A)** Tracé typique de transitoires calciques spontanés suivis d'un transitoire Ca²⁺ induit par la caféine (10 mM). **(B)** Amplitude des transitoires calciques induits par la caféine et **(C)** *fractional release*. L'analyse statistique utilisée est le test T de Student non païré (* p = 0,006).

3.5.2 Courant calcique de type L (I_{CaL})

Nous avons démontré que la grossesse augmente la densité du courant calcique de type L.⁷⁴ Afin de déterminer si les œstrogènes sont responsables de cette augmentation et si ces changements sont applicables à l'humain, nous avons enregistré les courants calciques dans des cellules N-hiPSC-CM à l'aide de la méthode de patch-clamp en mode voltage-imposé.

La figure 30B montre la courbe IV de I_{CaL} enregistré sur des cellules hiPSC-CM de type nodal. À 0 mV, la densité de I_{CaL} est la même entre le groupe contrôle (CTL : $-14,0 \pm 1,3$ pA/pF) et le groupe traité à l'E₂ (+E₂ : $-14,5 \pm 1,4$ pA/pF). Ces résultats sont aussi observables sur les courbes typiques de I_{CaL} présentées à la figure 30A. Les résultats montrent que l'E₂ ne modifie pas I_{CaL} . Contrairement au courant pacemaker, l'augmentation de I_{CaL} observée pendant la grossesse chez la souris n'est pas expliquée par l'augmentation des œstrogènes dans un modèle cellulaire humain.⁷⁴

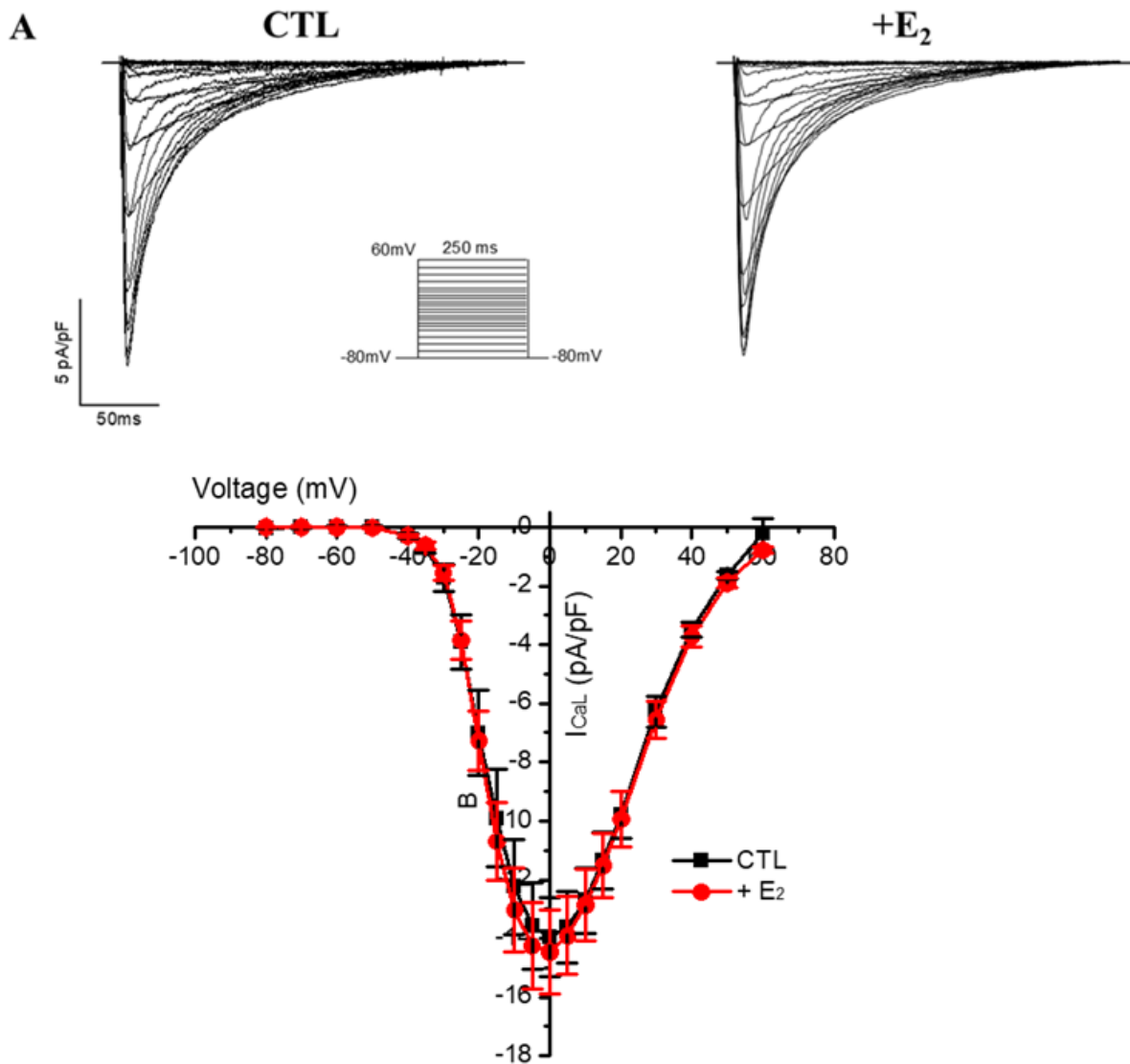


Figure 33. Courant calcique de type L des cellules N-hiPSC-CM traitées à l'E₂. **(A)** Tracés typiques du courant calcique de type L (I_{CaL}) enregistré sur des cellules N-hiPSC-CM traitées ou non à l'E₂. Le protocole d'enregistrement y est aussi présenté. **(B)** Courbe IV montrant que I_{CaL} n'est pas affecté par l'E₂ (CTL : n = 14-15; +E₂ : n = 22-23). L'analyse statistique utilisée est le test T de Student non pairé.

4 DISCUSSION

4.1 Résumé des principaux résultats

L'accélération de la FC coïncide avec l'augmentation des œstrogènes pendant la grossesse. Toutefois, une relation causale n'a pas encore été établie entre ces deux phénomènes. Ainsi, l'objectif principal de ce projet de recherche était d'établir une relation entre l'automatisme cardiaque et l'E₂ et d'examiner les changements électrophysiologiques du NS, le pacemaker naturel du cœur.

Pour y parvenir, nous avons tout d'abord administré, par voie orale, du 17β-œstradiol (E₂) à différents groupes de souris. Ce traitement atteignait des concentrations plasmatiques d'E₂ retrouvées en fin de grossesse, confirmant ainsi le traitement hormonal. L'augmentation de la FC des souris femelles non-gestantes suivant l'administration d'E₂ démontre que les œstrogènes sont impliquées dans l'augmentation de la FC et de l'automatisme cardiaque. D'ailleurs, l'analyse des enregistrements d'électrophysiologie cellulaire démontre que le NS est régulé par les œstrogènes et que l'E₂ augmente la densité du courant pacemaker I_f. Toutes ces modifications ont été observées chez les souris ERKOβ, et non pas chez les souris ERKOα. Ceci nous indique que, pendant la grossesse, les œstrogènes accélèrent la FC via les récepteurs aux œstrogènes alpha. Cette étude montre aussi que les changements de l'homéostasie calcique des cellules de type nodal observé pendant la grossesse (i.e. augmentation de la fréquence des transitoires calciques et augmentation de la densité de I_{CaL}) sont régulés par un ou des mécanismes qui semblent indépendants des œstrogènes. Finalement, les résultats obtenus dans les N-hiPSC-CM permettent d'affirmer que les mécanismes de régulation du NS de souris par les œstrogènes lors de la grossesse sont similaires à ceux d'un modèle cellulaire humain.

4.2 Régulation du courant pacemaker I_f par les œstrogènes dans d'autres tissus

Précédemment, notre laboratoire a démontré que la densité du courant pacemaker I_f était augmentée pendant la grossesse⁷⁶. À ce jour, très peu d'études ont porté sur la régulation hormonale des différents courants ioniques des cellules du NS. Toutefois, certains groupes ont étudié la régulation hormonale du courant pacemaker présent dans d'autres types cellulaires, telles les cellules musculaires lisses de l'utérus ainsi que les neurones du cerveau (I_h).¹⁰¹⁻¹⁰³ Tout comme dans les cardiomyocytes, une automaticité cellulaire est observée dans les neurones et l'utérus. Il a été montré que le I_f présent dans l'utérus a des propriétés électrophysiologiques similaires à celui présent dans les cardiomyocytes.¹⁰¹ De plus, la grossesse semble réguler à la hausse la densité de I_f dans les cellules musculaires lisses de l'utérus^{101, 102}, afin de permettre la contractilité du myomètre pendant l'accouchement. Aussi, une étude a démontré que le courant I_h (i.e. l'équivalent de I_f , mais dans le cerveau) des neurones GnRH est régulé par le 17β -œstradiol. En fait, l'expression de l'ARNm et des protéines des canaux HCN est augmentée, accélérant ainsi l'automaticité neuronale.¹⁰³ Ces études prouvent que les œstrogènes jouent un rôle important dans la régulation hormonale de ce courant et ces résultats concordent avec ceux de notre laboratoire.

4.3 Régulation du courant calcique de type L (I_{CaL}) par les œstrogènes

Nos résultats montrent que les courants calciques et l'homéostasie calcique du NS ne sont pas régulés par des niveaux élevés en œstrogènes. Pourtant, plusieurs études ont démontré que le courant calcique de type L (I_{CaL}) ainsi que des protéines contribuant à l'homéostasie calcique sont modifiées à la hausse ou à la baisse par les œstrogènes.

Une étude récente a démontré que la densité des courants I_{CaL} et I_{NCX} (courant créé par l'activité de l'échangeur sodium-calcium NCX), des courants ioniques entre autres responsables de l'homéostasie calcique, est augmentée dans les ventricules de femmes¹⁰⁴ ainsi que dans les ventricules de lapins femelles.¹⁰⁵ Ces changements se produisent à des concentrations plasmatiques d' E_2 retrouvées pendant le cycle menstruel (1 nM) et ils sont

médiés par la voie de signalisation E_2 -ER α .¹⁰⁴ De plus, dans les ventricules de femmes ménopausées et d'hommes, où les concentrations d'œstrogènes sont faibles, aucune différence de I_{CaL} et I_{NCX} n'est observée.¹⁰⁴ Aussi, chez les femmes pré-ménopausées, l'ARNm ainsi que les protéines de la sous-unités alpha des canaux calciques Cav1.2 sont augmentés¹⁰⁴ par rapport aux hommes et aux femmes ménopausées.

Contrairement à ces études, d'autres groupes ont montré qu'une ovariectomie (production d'hormones sexuelles féminines cessée) augmente l'expression de Cav1.2 dans les ventricules de rat.¹⁰⁶ Une thérapie hormonale de 17β -œstradiol semble renverser ces résultats (réduction de I_{CaL}) de manière dose-dépendante.¹⁰⁷ De plus, les transitoires calciques des cardiomyocytes de souris femelles sembleraient être plus faibles que chez les souris mâles,¹⁰⁸ et ces différences sont renversées chez les souris ovariectomisées.¹⁰⁹

Ces études sur l'homéostasie calcique des cardiomyocytes sont contradictoires. En fait, certaines études montrent que I_{CaL} est régulé à la hausse par les œstrogènes, tandis que d'autres études démontrent que ces hormones régulent à la baisse I_{CaL} . Ces résultats contraires peuvent être expliqués par une différence d'espèce (i.e. humain vs lapin vs rat) ou une différence du type de cardiomyocytes (i.e oreillettes vs ventricules). En effet, il est connu que l'électrophysiologie cardiaque est différente entre les espèces et les chambres du cœur.

Finalement, notre laboratoire a démontré que le courant calcique de type L dans les ventricules n'est pas différent entre les souris mâles et femelles.¹¹⁰ De plus, nous avons observé les mêmes résultats dans les ventricules de cochons d'Inde mâles et femelles.¹¹¹ Ceci suggère que les œstrogènes n'ont pas d'effet sur la régulation de I_{CaL} au niveau ventriculaire dans ces espèces.

Les résultats de ce mémoire démontrent qu'il n'y a aucun effet observé sur I_{CaL} ou sur les transitoires calciques en présence d' E_2 . Ces différences de résultats par rapport aux autres études pourraient s'expliquer par plusieurs raisons :

(1) Ce projet de recherche consiste à étudier I_{CaL} et les transitoires calciques du NS, tandis que les autres équipes l'étudiaient dans les cardiomyocytes contractiles (i.e. oreillettes et ventricules). En fait, l'électrophysiologie ainsi que la régulation des canaux ioniques du NS,

des oreillettes et des ventricules est différente. Par exemple, notre laboratoire a démontré que le courant I_{Kur} ($K_{V1.5}$) était régulé par les androgènes dans les ventricules de souris.¹¹² Toutefois, les androgènes ne modifient pas I_{Kur} dans les oreillettes de souris (données non publiées).

(2) Au niveau ventriculaire, I_{CaL} est produit par la protéine $Cav1.2$, tandis que dans le nœud sinusal, il est produit par les protéines $Cav1.2$ et $Cav1.3$. Il a été prouvé que pendant la grossesse⁷⁴, lorsque les concentrations plasmatiques en œstrogènes sont assez élevées pour induire un changement, seulement I_{CaL} provenant de $Cav1.3$ est modifié. Alors il est possible que $Cav1.2$ et $Cav1.3$ ne soient pas régulés de la même manière et que les œstrogènes agissent seulement sur une des deux sous-unités alpha, soit le $Cav1.2$. De plus, il est possible que les sous-unités accessoires, responsables de l'ouverture et/ou de l'activité des Cav ne soient pas les mêmes entre les cardiomyocytes contractiles et les cellules du nœud sinusal.

(3) Le courant calcique de type L n'a pas le même rôle dans les cellules nodales comparées aux cellules ventriculaires. Au niveau du potentiel d'action ventriculaire, I_{CaL} est responsable de la phase plateau, tandis que pour le NS, I_{CaL} est important pour la fin de la pente DD et la phase ascendante du PA. Ainsi, une augmentation ou une diminution des courants calciques n'a pas le même effet dans les cellules du NS par rapport aux cellules ventriculaires. Par exemple, une densité de I_{CaL} plus grande dans le nœud sinusal accélère la pente DD et une augmentation de l'automaticité cardiaque peut être observée. À l'inverse, une augmentation de I_{CaL} dans les ventricules accentue l'entrée de Ca^{2+} (charges positives) dans les cellules, ce qui prolonge la durée du potentiel d'action.

(4) Le modèle animal utilisé n'est pas le même d'une étude à une autre (ex : lapin vs rat vs souris vs humain). Ceci peut expliquer les différents résultats. En fait, les canaux et les courants ioniques du cœur diffèrent d'un modèle animal à un autre. De plus, les concentrations plasmatiques d'hormones sexuelles diffèrent d'une espèce à une autre.

(5) D'une étude à l'autre, le régime posologique du traitement à l' E_2 n'est pas le même. Pour cette étude, nous avons utilisé un traitement chronique à l' E_2 à des doses retrouvées pendant la grossesse (25 nM). Les autres études ont utilisé des concentrations retrouvées pendant le cycle menstruel (1 nM). Des concentrations plasmatiques différentes en E_2 n'ont pas le même effet

sur le cœur. Par exemple, des concentrations d'E₂ retrouvées pendant le cycle menstruel n'ont pas d'effet sur la FC. Par contre, plus les concentrations en E₂ sont élevés, plus la FC accélère.

4.4 Courant calcique total et courant calcique de type T

Lors de la grossesse, le courant calcique total ($I_{CaTotal}$) est augmenté, tandis que le courant calcique de type T (I_{CaT}) est inchangé.⁷⁴ Tout comme le courant calcique de type L (I_{CaL}), nous avons tenté de mesurer $I_{CaTotal}$ et I_{CaT} dans les cellules N-hiPSC-CM suivant un traitement à l'E₂. I_{CaT} est obtenu suivant la soustraction de I_{CaL} à $I_{CaTotal}$. Lors de l'enregistrement de $I_{CaTotal}$, le potentiel de maintien est à -80 mV, tandis que pour I_{CaL} , il est à -50 mV. Pour ce projet, I_{CaL} a été mesuré à un potentiel de maintien de -40 mV plutôt que de -50 mV. Ceci entraîne une perte de I_{CaL} lors de l'enregistrement. La figure 31 illustre la courbe IV du courant calcique résultant de la soustraction de I_{CaL} à $I_{CaTotal}$. À -15 mV, la densité de ce courant est similaire entre les deux groupes (CTL : $-3,6 \pm 0,6$ pA/pF; +E₂ : $3,7 \pm 0,5$ pA/pF).

Généralement, ce courant soustrait devrait être le courant calcique de type T (I_{CaT}). Ce dernier s'active normalement à des potentiels plus négatifs que I_{CaL} et la densité maximale de ce courant est observée à -45 mV. Toutefois, selon les résultats, ce courant soustrait ne semble pas être du I_{CaT} , et ce, pour différentes raisons :

(1) Dans les cellules de type nodal, la densité maximale du courant I_{CaL} provenant de $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ est normalement observée à 0 et -10 mV, respectivement. De plus, $Ca_v1.3$ est l'isoforme le plus dominant donc la densité maximale de I_{CaL} devrait être à -10 mV. Pourtant, pour cette expérience, I_{CaL} pic à 0 mV. Ceci suggère que le courant calcique soustrait serait du I_{CaL} provenant de $Ca_v1.3$.

(2) Lorsqu'il y a présence de I_{CaT} , la courbe IV de $I_{CaTotal}$ possède deux courbes en forme de cloche inversée, où l'une représente le I_{CaT} et l'autre I_{CaL} . Toutefois, cette forme n'est pas observée (données non présentées), suggérant l'absence de I_{CaT} dans les N-hiPSC-CM.

(3) Lors des enregistrements de I_{CaL} , le potentiel de maintien s'est fait à -40 mV. Toutefois, il aurait dû se faire à -50 mV. Ainsi, il est possible qu'une portion de I_{CaL} ait été inactivée pendant l'enregistrement et que c'est cette même portion qui est observée pour le courant calcique soustrait.

(4) Sur la courbe IV du courant calcique soustrait (figure 31), la densité de courant maximale est entre -15 et -10 mV, plutôt qu'à -45 mV. Ceci représente du I_{CaL} plutôt que du I_{CaT} .

(5) I_{CaT} n'a jamais été observé dans un modèle cellulaire humain de type nodal. La seule preuve de la présence de I_{CaT} est la diminution de la fréquence cardiaque chez l'humain suite à la prise de l'agent pharmacologique Mibefradil, un bloqueur des canaux calciques de type T.¹¹³ Toutefois aucune preuve directe n'a été établie puisque I_{CaT} n'a jamais été enregistré dans les cellules de nœud sinusal humaines.

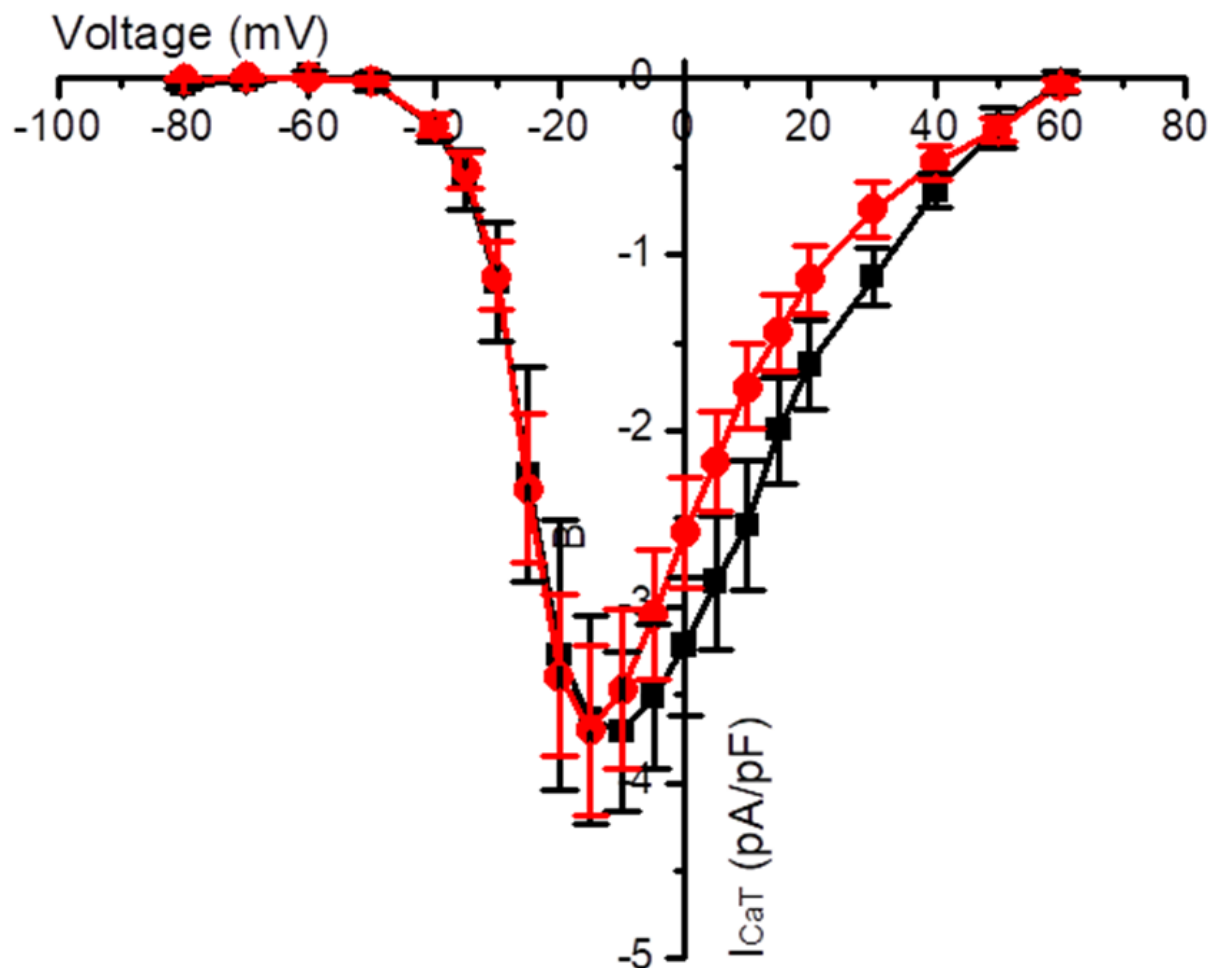


Figure 34. Courant calcique soustrait des cellules N-hiPSC-CM. Courbe IV montrant que le courant calcique soustrait est semblable entre les deux groupes (CTL : n = 11-13; +E₂ : n = 22). L'analyse statistique utilisée est le test T de Student non pairé.

4.5 Mécanismes potentiels de régulation des HCN par des concentrations élevées en œstrogènes

Notre laboratoire a démontré que l'augmentation du courant pacemaker I_f observée pendant la grossesse était expliquée par une augmentation des canaux HCN2 à la membrane des cellules du NS. Nous avons aussi démontré que les œstrogènes étaient responsables de l'accélération de l'automaticité cardiaque et de l'augmentation de la densité du courant I_f . Sachant que ce mécanisme est de nature génomique, nous croyons que ces effets sont médiés par les voies de signalisation 3 et 4 expliqués dans la section 1.3.3 de l'introduction, soient les voies dépendantes et indépendantes du ERE. Ainsi, les sites de reconnaissances et de liaison des récepteurs aux œstrogènes sur la région promotrice des gènes HCN pourraient expliquer l'augmentation de I_f .

La base de données de gènes humains *GeneCards* permet de détecter des régions de liaisons des récepteurs aux œstrogènes dans la région promotrice des différents gènes. Afin de considérer un site de liaison comme fonctionnel, il doit être dans les 500 paires de bases (pb) précédant le gène ciblé. Pour les isoformes des HCN présents dans le NS, seul HCN2 possédait un site de liaison possible pour ER α . En effet, à 100 pb du promoteur de HCN2, le site de liaison pour SP1 est présent. Ceci suggère que lorsque l'E $_2$ se lie sur ER α , ce dernier transloque au noyau, se lie sur la protéine SP1 ayant un site de liaison situé sur le promoteur de HCN2 et favorise ainsi la transcription du gène HCN2. Ceci résulte en une expression plus élevée des HCN2 à la membrane cellulaire et d'un courant I_f plus abondant. Ces données concordent avec l'étude précédente du laboratoire⁷⁶, démontrant que seul l'isoforme HCN2 est augmenté pendant la grossesse.

KCNE2 est un gène qui encode pour une sous-unité accessoire MiRP1 (*Mink-related peptide 1*). Il est connu que *KCNE2* est régulé par les œstrogènes et que MiRP1 module les HCN (canaux responsables du courant I_f). Ainsi, il serait possible que l'augmentation du courant I_f associée à la grossesse soit médiée par une augmentation de l'expression de MiRP1. De plus amples informations sur ce phénomène sont décrites à la section 4.8.

4.6 Implications cliniques potentielles

La grossesse induit une accélération de la fréquence cardiaque chez les femmes. Ce changement de la fonction cardiaque est nécessaire afin de répondre à une plus grande demande physiologique. Cependant, l'augmentation de la fréquence cardiaque peut générer des arythmies supraventriculaires, et ce, même chez les femmes sans antécédent cardiaque. Ces arythmies ne sont pas néfastes en soi. Par contre, elles le deviennent lorsqu'elles sont fréquentes et/ou soutenues et elles peuvent engendrer de graves conséquences pour la mère et le fœtus. Grâce aux avancées scientifiques, les femmes ayant des arythmies cardiaques congénitales vivent plus longtemps et peuvent devenir enceintes. Cependant, l'élévation de la fréquence cardiaque peut exacerber leurs arythmies cardiaques pré-existantes. De nos jours, les femmes vivent en moyenne leur première grossesse à un âge plus avancé. Selon Statistiques Canada, entre 1960 et 2011, l'âge moyen de la première grossesse est passé de 24 à 29 ans. De plus, plus de 58% des grossesses surviennent à un âge plus élevé que 30 ans. Sachant que l'âge est un facteur de risque pour les problèmes cardiovasculaires et que la grossesse peut générer des arythmies cardiaques et/ou exacerber les arythmies pré-existantes chez la femme, ce projet pourrait permettre une meilleure compréhension quant au développement des arythmies pendant la grossesse. Ultiment, ces connaissances pourraient permettre une meilleure gestion des arythmies chez les femmes enceintes et ainsi de diminuer les complications potentielles chez la mère et le fœtus.

Ce projet est d'une grande importance pour la santé des femmes puisqu'elles subissent des changements hormonaux tout au long de leur vie. Par exemple, ces fluctuations hormonales peuvent survenir lors du cycle menstruel, de la prise d'anovulants, de la grossesse, de la ménopause, d'une thérapie de remplacement hormonal ou lors de la prise d'un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (i.e. thérapie adjuvante du cancer du sein). De nombreuses études réalisées sur les ventricules et les oreillettes ont montré que le cœur est régulé par les hormones sexuelles. Par contre, très peu d'information est disponible à ce jour sur la régulation hormonale des propriétés électrophysiologiques du nœud sinusal. Ce projet permettra d'approfondir les connaissances quant au rôle des œstrogènes dans la régulation de l'activité électrique du nœud sinusal.

4.7 Limites de l'étude

Comme tout modèle animal, l'utilisation d'un modèle murin comporte des limites lors d'une étude sur le système cardiovasculaire. En effet, la fréquence cardiaque au repos des souris conscientes s'élève à plus de 700 bpm, tandis que celle des humains est en moyenne de 72 bpm. Toutefois, l'utilisation de ce modèle animal est adéquate pour ce projet de recherche. En effet, les changements dans la fonction cardiaque et les fluctuations hormonales observés chez les femmes enceintes sont aussi observés chez les souris gestantes, confirmant ainsi la validité du modèle animal. De plus, l'utilisation des souris comme modèle animal nous donne accès à des souris transgéniques (ERKO α et ERKO β). Aussi, la composition du nœud sinusal (i.e. canaux ioniques, courants ioniques et récepteurs) entre les deux espèces est relativement similaire. Finalement, tout comme chez l'humain, les souris possèdent des récepteurs d'hormones sexuelles (ex : ER) au niveau cardiaque.³⁰

L'utilisation des N-hiPSC-CM peut aussi entraîner certaines limites. Tout d'abord, lorsque ce modèle cellulaire humain est mis en culture, les trois types de cellules cardiaques sont présents (nodal, auriculaire et ventriculaires) et leur maturité est incertaine. Dans le laboratoire, nous avons développé un protocole dans le but de contourner cette limite. En effet, les cellules sont soumises à des stimulations électriques constantes. Cette méthode permet à la fois aux cellules de mûrir et de les distinguer par leurs propriétés électrophysiologiques, leur morphologie et leur taille. Ensuite, les N-hiPSC-CM proviennent de tissus humains, mais il serait plus intéressant de réaliser les expériences sur de véritables cardiomyocytes de type nodal. Toutefois, l'utilisation des N-hiPSC-CM est justifiée pour cette étude, considérant que la disponibilité de tissu cardiaque humain, sain, jeune et ayant un profil hormonal adéquat, est plutôt restreinte. Finalement, les cellules hiPSC-CM utilisées pour ce projet de maîtrise proviennent d'une femme âgée entre 35 et 39 ans, soit deux paramètres importants (le sexe et l'âge) considérant que l'âge moyen des grossesses est maintenant rendu dans la trentaine.

Généralement, les courants calciques sont enregistrés à une température de 37°C. Toutefois, lors des enregistrements des courants calciques, la température était maintenue à 22°C puisque je n'étais pas capable de réaliser une succion sur les cellules lorsque la solution extracellulaire était à 37°C. Sachant que la densité des courants Ca²⁺ est dépendante de la

température, cette différence a peut-être causé une diminution de la densité des courants I_{CaL} . En effet, si l'enregistrement avait été fait à 37°C, peut-être que la densité des courants aurait été plus grande. Par contre, cette température a été utilisée dans les deux groupes, c'est-à-dire pour les cellules N-hiPSC-CM contrôles et traitées à l'E₂. Ainsi, je crois que s'il y avait une différence, nous l'aurions probablement observée étant donné que les conditions sont les mêmes pour les deux groupes. Finalement, il est important de noter que I_{CaL} a seulement été enregistré sur des N-hiPSC-CM et non pas sur les souris ERKO.

4.8 Perspectives

Tout comme les œstrogènes, la progestérone (P₄) est une hormone sexuelle féminine produite principalement par les ovaires.¹¹⁴ Lors de la grossesse, le placenta devient la principale source de P₄. De plus, les concentrations plasmatiques de P₄ augmentent considérablement, passant de 120 nM à 1200 nM pendant la grossesse.¹¹⁵ Quelques études ont démontré que la P₄ a la capacité de modifier les propriétés électrophysiologiques des ventricules.^{114, 115} Puisque l'augmentation des niveaux de P₄ coïncide avec l'augmentation de la FC, il serait également intéressant de déterminer si cette hormone participerait à ce phénomène. Puisque l'E₂ n'a pas d'effet sur l'homéostasie calcique des cellules du NS, peut-être que l'augmentation de la fréquence des transitoires calciques et des courants calciques qui est observée pendant la grossesse serait dépendante de la P₄. Ces expériences seraient tout d'abord réalisées sur des cellules N-hiPSC-CM traitées à la P₄, puis sur des cellules de NS de souris.

Puisque l'E₂ et la P₄ sont les deux hormones sexuelles féminines augmentées pendant la grossesse, il serait intéressant de traiter des cellules N-hiPSC-CM en culture avec de l'E₂ et/ou de la P₄. Ceci permettrait de voir si la combinaison de ces hormones accentue l'accélération de la fréquence cardiaque ou si l'effet est le même.

Pendant la grossesse, les concentrations plasmatiques de plusieurs autres hormones sont augmentées. On retrouve, entre autres, une augmentation de l'hormone thyroïdienne (T₃) ainsi que de la relaxine (RLX). La T₃ est connue pour augmenter la FC.¹¹⁶ Toutefois, notre laboratoire a démontré que la T₃ n'était pas responsable de l'accélération de l'automatisme cardiaque associée à la grossesse (résultats non publiés). Il a été démontré que la RLX, quant à

elle, a la capacité de modifier la fonction cardiaque (i.e. diminue la résistance vasculaire, augmente le débit cardiaque)¹¹⁷, d'augmenter la FC et la fréquence des potentiels d'action spontanés des cellules de NS.¹¹⁸ À des concentrations observées pendant la grossesse, la RLX augmente la densité de I_{CaL} de manière dépendante de la PKA¹¹⁸ dans les cellules de NS. Toutefois, notre laboratoire a démontré que la RLX n'affecte par I_f ⁷⁶ pendant la grossesse. Il serait tout de même intéressant de voir si l'application de RLX à des concentrations retrouvées lors de la grossesse augmenterait I_{CaL} dans les N-hiPSC-CM et/ou des cellules de NS.

Tel que décrit dans l'introduction, la PKA est un enzyme permettant la phosphorylation de certaines protéines, tels que $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ (canaux ioniques) ainsi que RyR2, SERCA2a et PLB (protéines impliquées dans l'homéostasie calcique). Dans le cas où la P_4 ne modifie par le *Calcium Clock* du NS, il serait important de réaliser des expériences dans le but de déterminer si l'expression de PKA est modifiée pendant la grossesse. Dépendamment de la concentration de PKA, l'augmentation de I_{CaL} et de la fréquence des transitoires calciques observée pendant la grossesse serait expliquée par la PKA. Pour y arriver, des PCR quantitatifs et des immunobuvardages de type western blot seraient réalisés sur des NS de souris gestantes, non-gestantes et post-partum.

Tout comme le courant I_f (nœud sinusal) et le courant calcique de type L (ventricules et oreillettes), certains courants potassiques présents dans les cardiomyocytes contractiles semblent être régulés par les œstrogènes.⁹⁸ En effet, notre laboratoire a démontré que les œstrogènes diminuent le courant potassique transitoire sortant indépendant du calcium (I_{to}) en diminuant l'expression des canaux potassiques activés par le voltage $K_v4.x$, et ces effets sont médiés par $ER\alpha$.⁹⁸ Une diminution de la production des hormones sexuelles (74%) induite par une ovariectomie a un effet contraire sur I_{to} (augmentation de 35%).⁹⁸ En lien avec ces résultats, un traitement chronique au tamoxifène, un modulateur spécifique des récepteurs aux œstrogènes, augmente la densité de certains courants potassiques (ex : I_{to} est augmenté de 66%) présents dans les ventricules en bloquant les récepteurs aux oestrogènes.¹¹⁹ De plus, l'expression du gène codant pour le canal potassique voltage dépendant 4.3 ($K_v4.3$), responsable de I_{to} , est diminué pendant la grossesse (de 3 à 5 fois) ou chez des souris ovariectomisées recevant un traitement à l' E_2 .¹ Au niveau du nœud sinusal, certains courants potassiques (ex : I_{Kr} , I_{KAcH} , I_{KCa}) contribuent à l'automaticité cardiaque et sont responsables de

la phase de repolarisation du potentiel d'action. Il serait donc pertinent d'évaluer si les courants potassiques présents dans le nœud sinusal sont aussi modifiés par les œstrogènes.

Il a été démontré que MiRP1, une sous-unité accessoire de $K_{V11.1}$ (ERG) et encodée par le gène *KCNE2*, peut modifier à la hausse l'expression protéique des HCN et accélérer la cinétique d'activation de I_f .^{69, 120-122} De plus, une étude a prouvé que les transcrits de *KCNE2* étaient augmentés en fin de grossesse, et ce, via la voie de signalisation E_2 -ER α .¹²³ En lien avec ces résultats, le site *GeneCards*, une base de données sur les gènes humains, montre que l'un des importants sites de liaison des facteurs de transcription est celui du ER α . Ainsi, il serait important de voir si l'expression de *KCNE2* (ARNm) et MiRP1 (niveaux protéiques) dans le nœud sinusal est modifiée par la grossesse. Dans un premier temps, l'expression de *KCNE2* et de MiRP1 serait mesurée par qPCR et Western Blot, respectivement. Si un changement est observé, ces expériences pourraient être répétées, mais cette fois-ci, sur des cellules de NS de souris non-gestantes traitées à l' E_2 afin de déterminer si les œstrogènes seraient responsables de ce mécanisme de régulation.

L'accélération de l'automaticité cardiaque est, entre autres, régulée par les ER α chez les souris. Même si l'automaticité des N-hiPSC-CM est plus rapide dans les cellules traitées, il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme est semblable dans les cellules humaines. Pour se faire, des siRNA spécifiques aux ER α ou aux ER β pourraient être introduit dans le milieu de culture des N-hiPSC-CM. De ce fait, en empêchant l'expression d'un seul isoforme des ER, il serait possible de déterminer par lequel l' E_2 module la FC. De manière plus simple, il serait aussi possible de déterminer le rôle des ER en utilisant des agonistes/antagonistes spécifiques des ER α ou ER β .

5 CONCLUSION

En conclusion, l'objectif principal de ce projet de recherche était de déterminer si l'accélération de la fréquence cardiaque observée pendant la grossesse était expliquée par les niveaux élevés en œstrogènes. Une accélération de la FC chez les souris ERKO β , mais non chez les ERKO α , suivant un traitement à l'E₂, démontre que l'augmentation de l'automatisme cardiaque est régulée par l'E₂. De plus, nous pouvons affirmer que ce sont les récepteurs aux œstrogènes alpha (ER α) qui sont responsables de ce phénomène. Les mécanismes par lesquels l'E₂ modifie l'automatisme cardiaque ont été étudiés sur des cellules isolées de NS de souris ERKO β . Tout comme dans la grossesse, la fréquence des potentiels d'action est accélérée et le courant pacemaker I_f est plus dense chez les souris traitées à l'E₂ comparées aux souris non traitées. Ceci signifie que l'E₂ accélère l'automatisme cardiaque par une augmentation de I_f, et ce, via la voie de signalisation ER α . Contrairement à ce qui était observé pendant la grossesse, l'homéostasie calcique était comparable entre les groupes de souris traitées ou non à l'E₂. Ceci suggère que d'autres changements observés pendant la grossesse, autres que les niveaux élevés en œstrogènes, contribueraient à l'accélération de l'automatisme cardiaque. Tout comme dans les cellules de NS de souris, les cellules N-hiPSC-CM démontraient une augmentation de I_f suivant un traitement à l'E₂. En lien avec les résultats obtenus sur l'homéostasie calcique des cellules de NS, le courant I_{CaL} demeure inchangé dans les N-hiPSC-CM suivant un traitement à l'E₂. Les résultats obtenus dans ce modèle cellulaire humain démontrent que les données acquises sur les cellules de NS de souris peuvent être applicables à l'humain. Bref, l'accélération de la FC induite par la grossesse est, entre autres, expliquée par une augmentation des niveaux en œstrogènes et une augmentation du courant pacemaker I_f.

6 BIBLIOGRAPHIE

1. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.* 2005;96(11):1208-16.
2. Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, Borbas Z, D'Souza A, Fraser JF, Inada S, Logantha SJ, Monfredi O, Morris GM, Moorman AF, Nikolaidou T, Schneider H, Szuts V, Temple IP, Yanni J, Boyett MR. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol Ther.* 2013;139(2):260-88.
3. Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J.* 1992;68(6):540-3.
4. Burkart TA, Conti JB. Cardiac arrhythmias during pregnancy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2010;12(5):457-71.
5. Enriquez AD, Economy KE, Tedrow UB. Contemporary management of arrhythmias during pregnancy. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2014;7(5):961-7.
6. Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD, Morton MJ. Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol.* 2000;24(1):11-4.
7. Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16(8):285-91.
8. Redondo-Angulo I, Mas-Stachurska A, Sitges M, Giralt M, Villarroya F, Planavila A. C/EBPbeta is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2016;202:819-28.
9. Adamson DL, Nelson-Piercy C. Managing palpitations and arrhythmias during pregnancy. *Heart.* 2007;93(12):1630-6.
10. Khairy P, Ouyang DW, Fernandes SM, Lee-Parritz A, Economy KE, Landzberg MJ. Pregnancy outcomes in women with congenital heart disease. *Circulation.* 2006;113(4):517-24.

11. Silversides CK, Harris L, Haberer K, Sermer M, Colman JM, Siu SC. Recurrence rates of arrhythmias during pregnancy in women with previous tachyarrhythmia and impact on fetal and neonatal outcomes. *Am J Cardiol.* 2006;97(8):1206-12.
12. Regitz-Zagrosek V, Gohlke-Barwolf C, Iung B, Pieper PG. Management of cardiovascular diseases during pregnancy. *Curr Probl Cardiol.* 2014;39(4-5):85-151.
13. Knotts RJ, Garan H. Cardiac arrhythmias in pregnancy. *Semin Perinatol.* 2014;38(5):285-8.
14. Brickner ME. Cardiovascular management in pregnancy: congenital heart disease. *Circulation.* 2014;130(3):273-82.
15. Clapp JF, 3rd, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol.* 1997;80(11):1469-73.
16. Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(8):1095-100.
17. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;240(4854):889-95.
18. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443-53.
19. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002;346(5):340-52.
20. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(3 Suppl):S116-24.
21. Yasar P, Ayaz G, User SD, Gupur G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2017;16(1):4-20.
22. Luo T, Kim JK. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview. *Can J Cardiol.* 2016;32(8):1017-25.
23. Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond).* 2006;111(2):107-18.
24. Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids.* 2012;77(1-2):27-35.
25. Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res.* 2012;28(2):71-6.

26. Hughes ZA, Liu F, Marquis K, Muniz L, Pangalos MN, Ring RH, Whiteside GT, Brandon NJ. Estrogen receptor neurobiology and its potential for translation into broad spectrum therapeutics for CNS disorders. *Curr Mol Pharmacol*. 2009;2(3):215-36.
27. Xiao J, Wang NL, Sun B, Cai GP. Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(1):C128-38.
28. Knowlton AA, Korzick DH. Estrogen and the female heart. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389(1-2):31-9.
29. Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res*. 2000;46(1):28-49.
30. Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(1-3):75-86.
31. Robertson T, Kennard ED, Mehta S, Popma JJ, Carrozza JP, Jr., King SB, 3rd, Holmes DR, Cowley MJ, Hornung CA, Kent KM, Roubin GS, Litvack F, Moses JW, Safian R, Desvigne-Nickens P, Detre KM. Influence of gender on in-hospital clinical and angiographic outcomes and on one-year follow-up in the New Approaches to Coronary Intervention (NACI) registry. *Am J Cardiol*. 1997;80(10A):26K-39K.
32. Arnstein PM, Buselli EF, Rankin SH. Women and heart attacks: prevention, diagnosis, and care. *Nurse Pract*. 1996;21(5):57-8, 61-4, 7-9; quiz 70-1.
33. Wenger NK, Shaw LJ, Vaccarino V. Coronary heart disease in women: update 2008. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(1):37-51.
34. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(14):2905-19.
35. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. 1999;20(3):358-417.
36. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-70.
37. DeLisle RK, Yu SJ, Nair AC, Welsh WJ. Homology modeling of the estrogen receptor subtype beta (ER-beta) and calculation of ligand binding affinities. *J Mol Graph Model*. 2001;20(2):155-67.

38. Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002;109(5-6):567-83.
39. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol*. 2001;15(12):2057-63.
40. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*. 1993;17(1):263-5.
41. Sluysers M, Rijkers AW, de Goeij CC, Parker M, Hilkens J. Assignment of estradiol receptor gene to mouse chromosome 10. *J Steroid Biochem*. 1988;31(5):757-61.
42. White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol*. 1987;1(10):735-44.
43. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243(1):122-6.
44. Gonzalez TL, Rae JM, Colacino JA, Richardson RJ. Homology models of mouse and rat estrogen receptor-alpha ligand-binding domain created by in silico mutagenesis of a human template: molecular docking with 17ss-estradiol, diethylstilbestrol, and paraben analogs. *Comput Toxicol*. 2019;10:1-16.
45. Harris HA, Bapat AR, Gonder DS, Frail DE. The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent. *Steroids*. 2002;67(5):379-84.
46. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2012;135(1):54-70.
47. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 2008;6:e003.
48. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1535-65.
49. Geserick C, Meyer HA, Haendler B. The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;236(1-2):1-7.

50. Aronica SM, Katzenellenbogen BS. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol.* 1993;7(6):743-52.
51. Chalbos D, Philips A, Rochefort H. Genomic cross-talk between the estrogen receptor and growth factor regulatory pathways in estrogen target tissues. *Semin Cancer Biol.* 1994;5(5):361-8.
52. Ince BA, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 1994;8(10):1397-406.
53. Lahooti H, Thorsen T, Aakvaag A. Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J Mol Endocrinol.* 1998;20(2):245-59.
54. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1994;269(6):4458-66.
55. Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E. Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *FASEB J.* 2004;18(13):1594-6.
56. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):561-70.
57. Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, Chiu KP, Lipovich L, Barnett DH, Stossi F, Yeo A, George J, Kuznetsov VA, Lee YK, Charn TH, Palanisamy N, Miller LD, Cheung E, Katzenellenbogen BS, Ruan Y, Bourque G, Wei CL, Liu ET. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* 2007;3(6):e87.
58. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.* 2001;62:231-52.
59. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):311-7.
60. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-30.

61. Han G, Li F, Yu X, White RE. GPER: a novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2013;71:53-60.
62. Patel VH, Chen J, Ramanjaneya M, Karteris E, Zachariades E, Thomas P, Been M, Randeve HS. G-protein coupled estrogen receptor 1 expression in rat and human heart: Protective role during ischaemic stress. *Int J Mol Med.* 2010;26(2):193-9.
63. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2):9-16.
64. Giguere V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev.* 2008;29(6):677-96.
65. Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, Evans RM, Blanchette M, Giguere V. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab.* 2007;5(5):345-56.
66. Choudhury M, Boyett MR, Morris GM. Biology of the Sinus Node and its Disease. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2015;4(1):28-34.
67. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res.* 2000;47(4):658-87.
68. Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(1):55-64.
69. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008;88(3):919-82.
70. Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News Physiol Sci.* 2002;17:32-7.
71. Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem.* 2001;268(6):1646-52.
72. Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem.* 2005;280(41):34635-43.
73. Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):729-38.

74. El Khoury N, Ross JL, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. *Cardiovasc Res.* 2018;114(12):1605-16.
75. Baruscotti M, Bucchi A, Viscomi C, Mandelli G, Consalez G, Gneccchi-Rusconi T, Montano N, Casali KR, Micheloni S, Barbuti A, DiFrancesco D. Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene *Hcn4*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1705-10.
76. El Khoury N, Mathieu S, Marger L, Ross J, El Gebeily G, Ethier N, Fiset C. Upregulation of the hyperpolarization-activated current increases pacemaker activity of the sinoatrial node and heart rate during pregnancy in mice. *Circulation.* 2013;127(20):2009-20.
77. Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca^{2+} channels in heart automaticity. *Front Physiol.* 2015;6:19.
78. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type $\text{Cav}1.3$ Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5543-8.
79. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res.* 2010;106(4):659-73.
80. 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 Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1757-66.
81. Torrente AG, Zhang R, Wang H, Zaini A, Kim B, Yue X, Philipson KD, Goldhaber JJ. Contribution of small conductance K^{+} channels to sinoatrial node pacemaker activity: insights from atrial-specific $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange knockout mice. *J Physiol.* 2017;595(12):3847-65.
82. Weisbrod D, Khun SH, Bueno H, Peretz A, Attali B. Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(1):82-97.
83. Mesirca P, Marger L, Toyoda F, Rizzetto R, Audoubert M, Dubel S, Torrente AG, DiFrancesco ML, Muller JC, Leoni AL, Couette B, Nargeot J, Clapham DE, Wickman K, Mangoni ME. The G-protein-gated K^{+} channel, *IKACH*, is required for regulation of

- pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *J Gen Physiol.* 2013;142(2):113-26.
84. Gehrmann J, Meister M, Maguire CT, Martins DC, Hammer PE, Neer EJ, Berul CI, Mende U. Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein betagamma-subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H445-56.
 85. Christel CJ, Cardona N, Mesirca P, Herrmann S, Hofmann F, Striessnig J, Ludwig A, Mangoni ME, Lee A. Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol.* 2012;590(24):6327-42.
 86. Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res.* 2001;88(12):1254-8.
 87. Sirenko S, Yang D, Li Y, Lyashkov AE, Lukyanenko YO, Lakatta EG, Vinogradova TM. Ca⁽²⁺⁾-dependent phosphorylation of Ca⁽²⁺⁾ cycling proteins generates robust rhythmic local Ca⁽²⁺⁾ releases in cardiac pacemaker cells. *Sci Signal.* 2013;6(260):ra6.
 88. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res.* 2010;106(3):434-46.
 89. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 1991;351(6322):145-7.
 90. Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(1):39-48.
 91. DiFrancesco D, Tromba C. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 1988;405:493-510.
 92. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11162-6.
 93. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15677-82.
 94. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One.* 2012;7(4):e35538.

95. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):39-49.
96. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(11):713-26.
97. Gelinas R, El Khoury N, Chaix MA, Beauchamp C, Alikashani A, Ethier N, Boucher G, Villeneuve L, Robb L, Latour F, Mondesert B, Rivard L, Goyette P, Talajic M, Fiset C, Rioux JD. Characterization of a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Model for the Study of Variant Pathogenicity: Validation of a KCNJ2 Mutation. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10(5).
98. El Gebeily G, El Khoury N, Mathieu S, Brouillette J, Fiset C. Estrogen regulation of the transient outward K(+) current involves estrogen receptor alpha in mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;86:85-94.
99. Strom JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson IM, Theodorsson E. Ovariectomy and 17beta-estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *J Vis Exp*. 2012(64):e4013.
100. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*. 1998;274(3 Pt 2):H747-51.
101. Satoh H. Identification of a hyperpolarization-activated inward current in uterine smooth muscle cells during pregnancy. *Gen Pharmacol*. 1995;26(6):1335-8.
102. Miyoshi H, Yamaoka K, Garfield RE, Ohama K. Identification of a non-selective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch*. 2004;447(4):457-64.
103. Chu Z, Takagi H, Moenter SM. Hyperpolarization-activated currents in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons contribute to intrinsic excitability and are regulated by gonadal steroid feedback. *J Neurosci*. 2010;30(40):13373-83.
104. Papp R, Bett GCL, Lis A, Rasmusson RL, Bacsko I, Varro A, Salama G. Genomic upregulation of cardiac Cav1.2alpha and NCX1 by estrogen in women. *Biol Sex Differ*. 2017;8(1):26.
105. Yang X, Chen G, Papp R, Defranco DB, Zeng F, Salama G. Oestrogen upregulates L-type Ca(2)(+) channels via oestrogen-receptor- by a regional genomic mechanism in female rabbit hearts. *J Physiol*. 2012;590(3):493-508.

106. Chu SH, Goldspink P, Kowalski J, Beck J, Schwertz DW. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, beta-adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sci.* 2006;79(13):1257-67.
107. Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y, Hazama H. Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17beta-estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* 1999;127(2):429-40.
108. Parks RJ, Ray G, Bienvenu LA, Rose RA, Howlett SE. Sex differences in SR Ca(2+) release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;75:162-73.
109. Parks RJ, Bogachev O, Mackasey M, Ray G, Rose RA, Howlett SE. The impact of ovariectomy on cardiac excitation-contraction coupling is mediated through cAMP/PKA-dependent mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;111:51-60.
110. Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res.* 2001;89(5):437-44.
111. Brouillette J, Lupien MA, St-Michel C, Fiset C. Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(2):357-66.
112. Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):148-57.
113. Levine TB, Bernink PJ, Caspi A, Elkayam U, Geltman EM, Greenberg B, McKenna WJ, Ghali JK, Giles TD, Marmor A, Reisin LH, Ammon S, Lindberg E. Effect of mibefradil, a T-type calcium channel blocker, on morbidity and mortality in moderate to severe congestive heart failure: the MACH-1 study. *Mortality Assessment in Congestive Heart Failure Trial. Circulation.* 2000;101(7):758-64.
114. Salerni S, Di Francescomarino S, Cadeddu C, Acquistapace F, Maffei S, Gallina S. The different role of sex hormones on female cardiovascular physiology and function: not only oestrogens. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(6):634-45.
115. Feridooni HA, MacDonald JK, Ghimire A, Pyle WG, Howlett SE. Acute exposure to progesterone attenuates cardiac contraction by modifying myofilament calcium sensitivity in the female mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312(1):H46-H59.
116. Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the

- regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):968-74.
117. Martin B, Romero G, Salama G. Cardioprotective actions of relaxin. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;487:45-53.
118. Han X, Habuchi Y, Giles WR. Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells. *Circ Res.* 1994;74(3):537-41.
119. El Gebeily G, Fiset C. Upregulation of ventricular potassium channels by chronic tamoxifen treatment. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):68-76.
120. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res.* 2001;88(12):E84-7.
121. Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K. KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch.* 2003;446(6):633-40.
122. Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, Cohen IS, Robinson RB. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43497-502.
123. Kundu P, Ciobotaru A, Foroughi S, Toro L, Stefani E, Eghbali M. Hormonal regulation of cardiac KCNE2 gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;292(1-2):50-62.

7 ANNEXE 1 : Curriculum vitae abrégé

Bourses

- **2016** Bourse de stagiaire de recherche conjointement offerte par la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal et le laboratoire d'accueil (4 500\$)
- **2017** Bourse de recrutement de 2^e cycle de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (6 000\$)
- **2017** Bourse de 2^e cycle du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (10 000\$)
- **2018** Bourse de voyage : ISHR-NAS Early Career Investigator Travel Award (250\$ US)
- **2018** Bourse de voyage: Appui communautaire des Instituts de recherche en santé du Canada – Institut de la santé circulatoire et respiratoire (ISCR) (1 000\$)
- **2018-2020** Bourse de formation à la maîtrise des Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRQS) (17 500\$/an pour deux années)
- **2019** Bourse de voyage : 40th Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society (1 500\$ US)
- **2019** Bourse de l'AFPC 2019, Council for Continuing Pharmaceutical Education Graduate Pharmacy Student Research Poster Award (1 500\$)

Prix

- **2016** Premier prix de présentation des stagiaires boursiers de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (125\$)
- **2018** Premier prix : ISHR-NAS Poster Prize, Integration of Sex and Gender in Biomedical Research, CIHR Institute of Gender
- **2018** Premier prix de présentation à la maîtrise : Prix du CMDO 2018 (500\$)
- **2018** Finaliste du concours Hans-Selye du Club des Recherches Cliniques du Québec (CRCQ) (100\$)

- **2018** Deuxième prix de présentation du concours Hans-Selye du CRCQ (250\$)
- **2018** Premier prix de présentation : Gordon K. Moe – Young Investigators Award, Upstate New York Cardiac Electrophysiology Society (500\$ US)
- **2018** Premier prix de l'axe Découverte et validation des cibles thérapeutiques de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, concours de présentations par affiche des étudiants aux cycles supérieurs (250\$)
- **2018** Prix de l'Association des Facultés de Pharmacie du Canada (AFPC) pour la meilleure affiche – Pré-sélection

Publications

Papiers

1. El Khoury N, Ross JL, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. *Cardiovasc Res*. 2018 Oct 1;114(12):1605-1616.
2. Long V, Guertin MC, Dyrda K, Benrimoh D, Brouillette J. Descriptive Study of Anxiety and Posttraumatic Stress Disorders in Cardiovascular Disease Patients: From Referral to Cardiopsychiatric Diagnoses. *Psychother Psychosom*. 2018;87(6):370-371.
3. Cyr S, Long V, Levesque S, Jobidon L, Dyrda K, Laliberté MA, Guertin MC, Brouillette J. Post-traumatic stress disorder in medical populations: Literature review and case series (en préparation).

Abrégés

Présentations orales

1. Long V, Thibault S, Fiset C. Mécanismes de l'automatisme cardiaque régulés par les œstrogènes. *Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 22^e édition*. Juin 2019.
2. Long V, Thibault S, Fiset C. Mécanismes responsables de l'augmentation de la fréquence cardiaque associée à la grossesse. *Retraite facultaire de la recherche de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal*. Mai 2019.

Présentations par affiche

3. Long V, Thibault S, Fiset C. Regulation of cardiac automaticity by 17 β -estradiol during pregnancy. *Association of Faculty of Pharmacy of Canada*. Juin 2019.

4. Long V, Thibault S, Fiset C. Mechanisms Underlying Estrogen-Induced Accelerated Heart Rate. *40th Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society*. Mai 2019.
5. Long V, Thibault S, Fiset C. Régulation de la fréquence cardiaque par les œstrogènes lors de la grossesse. *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, 7^e édition*. Décembre 2018.
6. Long V, Thibault S, Fiset C. Role of 17 β -estradiol on increased cardiac automaticity during pregnancy. *Upstate New York Cardiac Electrophysiology Society, 28^e édition*. Octobre 2018.
7. Long V, Thibault S, Fiset C. Implication des œstrogènes dans l'augmentation de l'automatisme cardiaque associée à la grossesse. *Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 60^e édition*. Octobre 2018.
8. Long V, El Khoury N, Thibault S, Fiset C. Le rôle des œstrogènes dans l'augmentation de la fréquence cardiaque induite par la grossesse. *Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 21^e édition*. Juin 2018.
9. Long V, El Khoury N, Thibault S, Fiset C. The role of estrogens in pregnancy-induced increased heart rate. *37th Annual Meeting of the North American Section of the International Society for Heart Research (ISHR)*. Mai 2018.
10. Long V, Larose M, Fiset C. Implication des hormones sexuelles dans l'augmentation de l'automatisme cardiaque associée à la grossesse. *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, 6^e édition*. Décembre 2017.
11. Long V, Guertin MC, Dyrda K, Brouillette J. Étude de la répartition des troubles anxieux selon le type de maladie cardiovasculaire des patients suivis en cardiologie. *Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 59^e édition*. Octobre 2017.
12. Long V, Guertin MC, Dyrda K, Brouillette J. Description de la comorbidité cardiopsychiatrique des patients référés en clinique de psychosomatique à l'Institut de cardiologie de Montréal. *Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal*. Septembre 2017.
13. Long V, Guertin MC, Dyrda K, Brouillette J. Étude de la répartition des troubles anxieux selon le type de maladie cardiovasculaire des patients suivis en cardiologie. *Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 20^e édition*. Juin 2017.
14. El Khoury N, Ross J, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Increased Heart Rate in Pregnant Mice is Associated with Changes in Sinoatrial Node Calcium Homeostasis. *Canadian Society for Pharmaceutical Sciences (CSPS)*. Mai 2017.

15. Long V, Thibault S, Ton AT, El Khoury N, Fiset C. Rôle des œstrogènes dans l'augmentation de la fréquence cardiaque durant la grossesse. *Rendez-vous de la recherche à la Faculté de pharmacie à l'Université de Montréal, 5^e édition*. Décembre 2016.

Résumés de communication

1. De Xuan G, Cyr S, Long V, Lévesque S, Jobidon L, Dyrda K, Brouillette J. Posttraumatic stress disorder in medical populations: Systematic literature review. *Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 22^e édition*. Juin 2019.
2. Cyr S, Long V, Lévesque S, Jobidon L, Dyrda K, Laliberté MA, Guertin MC, Brouillette J. Characterization of the trauma and the care provided to patients suffering from post-traumatic stress disorder in cardiology: a case series and review of the literature. *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, 7^e édition*. Décembre 2018.
3. Cyr S, Long V, Lévesque S, Jobidon L, Dyrda K, Laliberté MA, Guertin MC, Brouillette J. Characterization of the trauma and the care provided to patients suffering from post-traumatic stress disorder in cardiology: a case series and review of the literature. *International Society for Traumatic Stress Studies – ISTSS 34th Annual Meeting*. Novembre 2018.

