

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

Impact d'une alimentation riche en phytoestrogènes sur
l'expression génique cardiaque

Par Catherine Legault
LEGC22548208

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en biologie moléculaire

Août 2006

© Catherine Legault, 2006

Université de Montréal

Impact d'une alimentation riche en phytoestrogènes sur
l'expression génique cardiaque

Par Catherine Legault
LEGC22548208

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en biologie moléculaire

Août 2006

© Catherine Legault, 2006



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Impact d'une alimentation riche en phytoestrogènes sur
l'expression génique

Présenté par:
Catherine Legault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-Philippe Gratton
président-rapporteur

Dr Christian Deschepper
directeur de recherche

Jacques Lussier
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les maladies cardiaques sont une des principales causes de mortalité en Amérique du Nord. Parmi les facteurs de risque impliqués, l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG) est un des facteurs indépendants de prédiction de la mortalité et morbidité liées aux maladies cardiaques. On retrouve dans la littérature des évidences que les phytoestrogènes ont un effet cardioprotecteur. Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires sous-jacents à cet effet cardioprotecteur. Nous avons donc utilisé deux groupes de rats WKY, le premier groupe recevant une alimentation à base de soya (riche en phytoestrogènes) et le deuxième groupe recevant une alimentation à base de caséine (pauvre en phytoestrogènes). Nous avons utilisé la technique de micropuces Affymétrie afin d'observer les différences de transcriptome entre les deux types d'alimentation. Cette expérimentation nous a lancé sur la piste de trois différents groupes de gènes : les gènes circadiens et leurs cibles, les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et les gènes reliés à la kinésine et au cytosquelette. Nos investigations subséquentes nous ont permis d'observer une modification de l'expression circadienne au niveau cardiaque de plusieurs gènes soient $ERR\alpha$, p21, per2, reverb α , tef, β -actine et TBP. Étant donné que certains de ces gènes sont connus comme étant importants au niveau cardiovasculaire, on peut penser qu'ils pourraient être impliqués dans le mécanisme moléculaire conférant son effet cardioprotecteur aux phytoestrogènes.

Mots-clés : maladies cardiovasculaires, hypertrophie du ventricule gauche, phytoestrogènes, micropuces Affymétrie, cycle circadien, cycle cellulaire.

SUMMARY

Cardiac diseases are one of the principal causes of mortality in North America. Among the many risk factors implicated, left ventricular hypertrophy (LVH) has been shown to be an independent predictor of cardiac mortality and morbidity. Several lines of evidence indicate that phytoestrogens have a cardioprotective effect. Our main interest has been to find what are the underlying molecular mechanisms of this cardioprotective effect. To investigate these mechanisms, we have used two groups of WKY rats, the first group received a soya-based alimentation (rich in phytoestrogens) and the second group received a casein-based alimentation (poor in phytoestrogens). We have used the Affymetrix technology to look at the difference in gene expression between the two types of alimentation. This experimentation led us to three different groups of genes: the circadian genes and their targets, the genes implicated in the regulation of cell cycle and genes related to kinesin and cytoskeleton. Our subsequent investigations allowed us to observe a modification of the circadian expression of several genes at the cardiac level: $ERR\alpha$, p21, per2, reverba, tef, β -actin and TBP. Knowing that some of these genes are recognized as being important at a cardiovascular level, it lets us believe that certain genes may be implicated in the molecular mechanisms conferring a cardioprotective effect to phytoestrogens.

Key words: cardiovascular disease, left ventricular hypertrophy, phytoestrogens, Affymetrix chips, circadian cycle, cell cycle.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
SUMMARY	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTES DES TABLEAUX	VI
LISTES DES FIGURES	VII
LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	XI
CHAPITRE I : INTRODUCTION	
1. Hypertrophie cardiaque	1
1.1 Épidémiologie	1
1.2 Définition de l'hypertrophie cardiaque	1
1.3 Causes de l'hypertrophie	2
1.3.1 Stress hémodynamique	2
1.3.2 Facteurs non hémodynamiques	3
1.3.2.1 Stimulation neuroendocrinienne	3
1.3.2.2 Système rénine-angiotensine-aldostérone	3
1.3.2.3 Diète riche en sodium	4
1.3.3 Génétique	4
1.3.3.1 Cardiomyopathie hypertrophique (CMH)	5
1.3.3.2 Cardiomyopathie dilatée (CMD)	6
1.4 Mécanisme moléculaire de l'hypertrophie cardiaque	6
2. Implication de l'environnement stéroïdien dans l'HVG	7
2.1 Dimorphisme sexuel au niveau cardiaque	7
2.2 Les estrogènes	9
2.2.1 Rôle des estrogènes	9
2.2.2 Effets cardiovasculaires des estrogènes	10
2.3 Phytoestrogènes	12
2.3.1 Caractéristiques et métabolisme des phytoestrogènes	12

2.3.2 Effets cardiovasculaires des phytoestrogènes	14
2.3.3 Mode d'action des phytoestrogènes	17
3. Impact cardiovasculaire d'une modification du cycle circadien	17
3.1 Cycle circadien	17
3.1.1 Mécanismes moléculaires	19
3.1.2 Cycle circadien et pathologie cardiovasculaire	22
3.1.3 Effets des estrogènes sur le rythme circadien	23
4. Implication du cycle cellulaire dans l'PHVG	23
4.1 Cycle cellulaire	23
4.1.1 Implication des molécules régulatrices du cycle cellulaire dans la croissance hypertrophique des cardiomyocytes	24
5.1 Projet de recherche	27
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
1. Animaux	28
2. Prélèvement des tissus	28
3. Extraction de l'ARN total	29
4. Micropuces Affymetrix	29
5. RT-PCR semi-quantitative	30
5.1 Transcriptase inverse	30
5.2 PCR	31
5.3 Migration des produits PCR	32
6. Extraction de l'ADN	32
7. Traitement au bisulfite de sodium de l'ADN	33
8. Séquençage	33
9. Constriction aortique	33
10. Analyse statistique	34

CHAPITRE III : RÉSULTATS

1. Résultats de l'analyse des micropuces Affymetrix	35
2. Validation des résultats obtenus par l'analyse des puces Affymétrie	39
3. Comparaison de l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles selon la diète PE+ et PE-	41
4. Effet de la constriction aortique sur l'expression de p21 chez des rats recevant une diète PE+ ou PE-	46
5. Méthylation du promoteur du gène de p21	47

CHAPITRE IV : DISCUSSION

1. Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrie	48
1.1 Gènes circadiens	49
1.2 Gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire	49
2. Différences au niveau de l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles selon la diète PE+ et PE-	50
3. Effet de la constriction aortique sur l'expression de p21 chez des rats recevant une diète PE+ ou PE-	53
4. Analyse de la méthylation du promoteur de p21	54
5. Limitations	56
6. Expérimentations futures	56

CONCLUSION	58
-------------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE	59
----------------------------	-----------

ANNEXE	80
---------------------	-----------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Amorces utilisées pour les différentes réactions PCR.....	31
Tableau II	Paramètres des amplifications PCR selon les différentes amorces.....	32
Tableau III	Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrie présentant les gènes dont l'expression est significativement diminuée en présence de phytoestrogènes.....	35
Tableau IV	Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrie présentant les gènes dont l'expression est significativement augmentée en présence de phytoestrogènes.....	37
Tableau V	Tableau des principaux groupes de gènes isolés à partir de l'analyse des résultats des micropuces Affymétrie.....	38
Tableau VI	Comparaison entre les deux techniques utilisées des ratios PE+/PE- obtenus.....	39
Tableau VII	Résultats d'une analyse par « two-way ANOVA » à partir des données de l'expression circadienne des différents gènes.....	43
Tableau VIII	Résultats d'une analyse par « two-way ANOVA » à partir des données normalisées par β -actine et TBP de l'expression circadienne de p21 et per2.....	45
Tableau IX	Comparaison des résultats obtenus par micropuces Affymétrie et RT-PCR semi-quantitative sur l'impact des phytoestrogènes sur l'expression de différents gènes.....	45

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure des phytoestrogènes en comparaison à l'œstradiol.....	13
Figure 2	Représentation schématique du processus moléculaire constituant l'oscillateur circadien au niveau du NSC chez les mammifères.....	21
Figure 3	Schéma démontrant l'implication possible des molécules régulatrices du cycle cellulaire dans le développement de cardiomyocytes hypertrophiés.....	26
Figure 4	Validation par PCR semi-quantitatives des résultats obtenus par les micropuces Affymétrie.....	40
Figure 5	Impact des phytoestrogènes sur l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles chez les rats de 3 semaines.....	42
Figure 6	Expression génique de p21 et per2 quantifiée par PCR semi-quantitatives normalisées par β -actine et TBP.....	44
Figure 7	Comparaison de l'expression de p21 entre les animaux ayant subi une constriction aortique et leurs contrôles selon le type de diète administrée (PE+ et PE-).....	47
Annexe 1	Mise au point du nombre de cycles d'amplification appropriés pour RT-PCR semi-quantitatives selon les différentes amorces employées.	80

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Akt/PKB	Akt/protéine kinase B
ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1	<i>Angiotensin type 1 receptor</i>
AT2	<i>Angiotensin type 2 receptor</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bmal1 (Arntl)	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
Ca ²⁺	Calcium
Cdc2a	<i>cell division cycle 2 homolog A</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CMH	Cardiomyopathie hypertrophique
CMD	Cardiomyopathie dilatée
Cry	Cryptochrome
CT-1	Cardiotrophine
Dbp	<i>Albumin D element-binding protein</i>
dbEST	<i>Expressed Sequence Tags database</i>
Dec	<i>Differentially expressed in chondrocytes</i>
DNMT	AND méthyltransférase
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERRα	<i>Estrogen-related receptor alpha</i>
ET ₁	Endothelin receptor 1
FC	<i>Fold change</i>

FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HRT	<i>Hormonal replacement therapy</i>
HTA	Hypertension artérielle
HVG	Hypertrophie du ventricule gauche
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IMC	Indice de masse corporelle
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MBD	<i>Methyl binding domain</i>
MeCP2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MT ₁ (Mel _{1a})	<i>Melatonin receptor 1 (1a)</i>
MT ₂ (Mel _{1b})	<i>Melatonin receptor 2 (1b)</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NSC	Noyau suprachiasmatique
O-DMA	O-desméthylangiotensine
PA-1	Activateur tissulaire du plasminogène
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phytoestrogènes
Per	Période
PI ₃ K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
Rb	Rétinoblastome
RefSeq	<i>Reference sequence</i>
Reverb α (Nr1d1)	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>

RORE	<i>Retinoic acid-related orphan receptor response element</i>
RMA	<i>Robust Multi-Array Analysis</i>
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase polymerase chain reaction</i>
SNC	Systeme nerveux central
TA	Tension artérielle
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
Tef	<i>Thyrotroph embryonic factor</i>
TR β	<i>Thyroid hormone receptor β</i>
UV	Ultraviolet
VG	Ventricule gauche
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
WKY	Rat Wistar Kyoto

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier Dr Christian Deschepper de m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai beaucoup apprécié son aide, sa disponibilité, sa compréhension et son respect envers ses étudiants. Malgré le fait que j'ai dû reporter la rédaction de mon mémoire de maîtrise ayant débuté la médecine, Dr Deschepper m'a soutenue et encouragée jusqu'à la fin.

J'aimerais remercier Sonia Bélanger pour le travail exceptionnel qu'elle effectue auprès des animaux et pour la patience dont elle a fait preuve lorsqu'elle m'a enseigné les différentes manipulations animales.

Un gros merci à Danielle de Verteuil, stagiaire d'été au laboratoire, qui a eu la générosité de m'accompagner dans les longues nuits de sacrifices que j'ai dû effectuer et pour la qualité du travail qu'elle a effectué.

Sylvie Picard pour m'avoir aidée à résoudre plusieurs des problèmes techniques auxquels j'ai eu à faire face.

Merci à Marie-Thérèse Berthier, Bastien Llamas, Jennifer Michel et Ahmad Zahabi pour avoir répondu à mes nombreuses questions et pour leur belle amitié.

À tous les autres membres du laboratoire pour l'entraide et pour tous les bons moments passés avec eux.

Johanne Duhaime pour m'avoir montré le fonctionnement de différents logiciels informatiques et pour avoir pris le temps de m'expliquer le principe de l'analyse statistique des micropuces Affymétrie.

Finalement, un gros merci à mes parents et à Stéphan Johnson pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de ma maîtrise.

Chapitre I: INTRODUCTION

1. Hypertrophie cardiaque

1.1 Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité et de morbidité en Amérique du Nord. Plusieurs facteurs de risque tels que la dyslipidémie, l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, l'hyperthyroïdie, l'obésité, la sédentarité, la consommation de tabac ou d'alcool, la diète contribuent de façon significative au développement de ces maladies. Cependant, ces divers facteurs ne suffisent pas à prédire entièrement la mortalité reliée aux maladies cardiovasculaires.

L'étude de « The Framingham Heart Study » a démontré que l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est un important prédicteur de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires et ce non seulement lors d'hypertension primaire mais également dans la population en général (1-3). En effet, une régression de HVG semble être un marqueur pronostique favorable indépendamment de la réduction de la tension artérielle (4;5). L'HVG augmente le risque d'infarctus du myocarde, de maladies vasculaires coronariennes, d'arythmie ventriculaire, de mort subite, de défaillance cardiaque, de maladies vasculaires périphériques et d'accident vasculaire cérébral (AVC) (3).

1.2 Définition de l'hypertrophie cardiaque

Selon le principe de Laplace, l'hypertrophie cardiaque est un mécanisme compensatoire qui se met en branle lorsqu'il y a présence d'un stress anormal au niveau des parois ventriculaires. L'hypertrophie cardiaque peut être un phénomène physiologique, comme on le retrouve chez les athlètes d'élite, qui permettrait d'augmenter le « maximal oxygen uptake » (6). Ce type d'hypertrophie se définit comme étant adaptative. Par contre, l'hypertrophie cardiaque peut également être un phénomène pathologique. On définit ce type d'hypertrophie pathologique comme étant

maladaptative. L'HVG maladaptative permet une adaptation compensatoire pour une certaine période de temps uniquement. Par la suite, le ventricule hypertrophié soumis à une surcharge hémodynamique sur une longue période de temps va éventuellement devenir défaillant (7).

Étant donné que les cardiomyocytes sont des cellules en différenciation terminale, on va retrouver lors de l'HVG une hypertrophie cellulaire plutôt qu'une hyperplasie. Lors d'hypertrophie, on observe une augmentation de la taille des cellules, de la synthèse protéique et une réactivation de l'expression de gènes codant pour des protéines fœtales (8-10). On divise l'HVG en deux catégories : concentrique et excentrique. L'hypertrophie concentrique se caractérise par une augmentation de l'épaisseur des parois ventriculaires sans augmentation du diamètre de la cavité ventriculaire et est retrouvée lors d'une augmentation de la post-charge ventriculaire. Au niveau cellulaire, elle se caractérise par une augmentation du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes. Pour ce qui est de l'hypertrophie excentrique, elle se définit comme étant une augmentation de diamètre de la cavité ventriculaire sans augmentation de l'épaisseur de la paroi due à une surcharge volémique. Elle se caractérise par une diminution du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes (11;12). Ces deux types de surcharge hémodynamique activeraient des voies de signalisation distinctes.

1.3 Causes de l'hypertrophie

1.3.1 Stress hémodynamique

Un stress hémodynamique anormal peut être causé par une obstruction du flot d'éjection, une dysfonction diastolique, une ischémie du myocarde et/ou une tachyarythmie ventriculaire ou supraventriculaire (13). L'hypertrophie compensatoire, lorsque adaptative, permet de rétablir à la normale le stress sur les parois ventriculaires. Toutefois, l'hypertrophie peut être maladaptative si elle ne suffit pas à compenser l'augmentation de stress sur les parois ventriculaires, ce qui va entraîner une dilatation ventriculaire. Dans un ventricule gauche qui est hypertrophié par une augmentation de

stress hémodynamique, la paroi devient non seulement plus épaisse mais également plus rigide, avec plus de fibrose et également plus de cardiomyocytes en apoptose. Ces changements de la paroi compromettent le remplissage diastolique et mènent souvent à un élargissement du ventricule gauche (14). La dilatation du ventricule gauche peut également mener à un étirement de la valve mitrale ce qui va entraîner de l'incompétence valvulaire. Celle-ci va augmenter subséquemment le stress sur les parois, engendrant ainsi un cercle vicieux (15).

1.3.2 Facteurs non hémodynamiques

1.3.2.1 Stimulation neuroendocrine

La stimulation neuroendocrine modifie le remodelage cardiaque dès le début de l'hypertension. Il a été démontré que l'activité du système nerveux sympathique (noradrénaline) au niveau du cœur est significativement augmentée chez les patients hypertendus avec HVG en comparaison avec ceux n'ayant pas d'HVG mais avec un niveau similaire d'HTA (16-19).

1.3.2.2 Système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

Le SRAA modifie le développement de l'HVG de façon significative lors d'HTA. Dans le SRAA, la rénine, sécrétée par les reins, hydrolyse l'angiotensinogène, protéine produite par le foie, pour former l'angiotensine I qui à son tour va être hydrolysée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), sécrétée par les poumons, pour former l'angiotensine II. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur et permet la rétention de sodium et d'eau par le rein ce qui permet d'augmenter la pression sanguine. La stimulation du récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT1) par l'angiotensine II entraîne une augmentation de la masse du ventricule gauche et ce indépendamment de la TA, de l'indice de masse corporelle (IMC), de l'excrétion de sodium et d'autres facteurs cliniques (20). L'effet de la stimulation du récepteur de l'angiotensine de type 2 (AT2) sur l'HVG est toutefois controversé. Certaines études ont démontré que le récepteur AT2

joue un rôle bénéfique dans l'hypertrophie cardiaque (21-25) alors que d'autres ont plutôt démontré que le récepteur AT2 joue un rôle néfaste dans l'hypertrophie cardiaque (26-28).

1.3.2.3 Diète riche en sodium

La quantité de sel ingéré dans la diète modifie le processus d'HVG et ce indépendamment de la TA, de l'IMC, et d'autres déterminants de l'HVG (29;30). L'ingestion d'une diète riche en sel entraîne une suppression inadéquate du système rénine-angiotensine conduisant à une augmentation de l'HVG (31). De plus, une diète riche en sodium entraîne de la fibrose aux niveaux cardiaque et rénal chez les animaux normotendus comme chez les hypertendus. Ces observations suggèrent qu'un apport excessif en sodium pourrait être un facteur pathologique important des maladies cardiovasculaires (32).

1.3.3 Génétique

Plusieurs facteurs environnementaux entraînent une augmentation de masse cardiaque, mais ces facteurs ne suffisent pas à expliquer la variance totale de la masse cardiaque dans la population (33). La corrélation entre le degré d'HTA, la durée de l'HTA et l'HVG est faible. Il a été démontré que des facteurs génétiques influencent la masse cardiaque (34-39). Il a été déterminé qu'environ 50% de la variance de la masse cardiaque est expliquée par les facteurs conventionnels tels que l'âge, la TA, IMC et qu'une partie de la variance non expliquée serait due à des facteurs génétiques (34). La masse cardiaque est un trait complexe ce qui signifie qu'elle est influencée par plusieurs gènes (40).

Les gènes qui codent pour des protéines responsables de la structure du VG, de la transduction de signaux intracellulaires, de l'homéostasie du calcium, de la TA ainsi que les gènes codant pour des hormones, des facteurs de croissance, des substrats

métaboliques pourraient être responsables de l'héritabilité de la masse cardiaque et du développement d'HVG (41).

Jusqu'à présent, plusieurs gènes ont été ciblés pour être responsables de la variation de la masse cardiaque. Il fut démontré qu'un polymorphisme de la région TA du gène du ER α serait relié à la masse du VG. Les patients qui possèdent au moins un allèle présentant une longue répétition de TA auraient tendance à avoir une masse du VG plus élevée (42). Un polymorphisme du promoteur du gène de l'angiotensinogène fut également associé à la masse cardiaque (43). Un polymorphisme d'insertion/délétion de 5 paires de bases a été identifié dans le gène de la calcineurine B. Une délétion de 5 paires de bases dans ce gène peut causer une croissance excessive du VG lorsqu'elle est associée à une hypertension sévère (44). De plus, il fut démontré chez le rat que le taux d'expression du gène codant pour le facteur natriurétique de l'oreillette (ANF) est génétiquement lié à la masse cardiaque et ce, indépendamment de la TA (45). Par contre, cette liste de gènes n'est pas exhaustive et permet seulement d'illustrer la complexité des facteurs génétiques responsables de la détermination de la masse cardiaque. Chaque gène mentionné ci-dessus contribue seulement pour une faible part à la variance de la masse cardiaque.

1.3.3.1 Cardiomyopathie hypertrophique (CMH)

La cardiomyopathie hypertrophique est une maladie héréditaire qui se transmet dans la majorité des cas comme un trait autosomique dominant. Dans certains cas peu communs, la transmission se fait selon un mode autosomique récessif, lié à l'X ou mitochondrial. La prévalence de CMH est estimée à 1/500, ce qui en fait une des maladies génétiques les plus fréquentes. Dans la majorité des cas, on retrouve une altération de la fonction des protéines du sarcomère cardiaque. Les anomalies des protéines sarcomériques sont variables : défauts divers dans la formation de myofibrilles, activité ATPase altérée, changement dans la sensibilité au Ca^{2+} , défaut de l'interaction actine-myosine. Lors de CMH, l'hypertrophie pourrait représenter une adaptation à

l'incapacité des fibres musculaires de générer une force contractile suffisante pour maintenir un flot cardiaque adéquat (46).

1.3.3.2 Cardiomyopathie dilatée (CMD)

La forme familiale de cardiomyopathie dilatée est une pathologie héréditaire qui a un patron de transmission autosomique dominant dans la majorité des cas, mais peut également être autosomique récessif, matrilineaire ou lié à l'X dans de plus rares cas. Il existe une grande hétérogénéité génétique pour la CMD et 5 grands groupes de protéines sont impliqués : du cytosquelette, des jonctions adhérentes, de l'enveloppe et de la lamina nucléaires et du sarcomère (47).

1.4 Mécanisme moléculaire de l'hypertrophie cardiaque

Lors de l'HVG, l'expression de plusieurs gènes foetaux est augmentée, comme par exemple la chaîne lourde de la β -myosine (48;49), l'actine α des muscles lisses et squelettiques (50;51), et le facteur natriurétique de l'oreillette (52-54). On observe aussi une diminution de l'expression de la chaîne lourde de la myosine α (48;49) et de la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique (55).

Les mécanismes moléculaires que l'on retrouve dans l'hypertrophie adaptative semblent être différents de ceux que l'on retrouve dans l'hypertrophie maladaptative. Pouvoir identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie maladaptative permettrait de développer des moyens thérapeutiques afin de prévenir le développement d'une telle hypertrophie.

L'hypertrophie est initiée et maintenue *in vivo* et *in vitro* par plusieurs facteurs comme des peptides vasoactifs, des facteurs de croissance, des hormones et des neurotransmetteurs. Parmi ces facteurs, on retrouve le récepteur de l'endothéline 1 (ET-1), l'agonistes α_1 -adrénergiques, angiotensine II, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance « insulin-like » (IGF)-1 et la cardiotrophine

(CT)-1 (56-61). Plusieurs agonistes des récepteurs couplés à une protéine G sont impliqués dans la réponse hypertrophique (62-64). Les voies de signalisation intracellulaire situées en aval du récepteur couplé à une protéine G sont également impliquées dans l'induction de l'hypertrophie. La PKC, protéine de la famille des sérine/thréonine kinases, fait partie de ces protéines (65-67). Les protéines des familles Ras et Rho jouent également un rôle dans l'hypertrophie en activant la voie des MAPK, grande famille de protéines kinases qui joueraient un rôle crucial dans l'activation de l'hypertrophie et également dans sa transition vers la défaillance cardiaque (68-71). L'activation de différentes branches de la voie des MAPKs influence la morphologie cardiaque. Par exemple, l'activation de ERK1/2 va entraîner une hypertrophie concentrique qui permet l'amélioration de la fonction cardiaque (72;73). L'activation de PI₃K va également entraîner une hypertrophie adaptative (74;75). Pour sa part, l'induction de ERK 5 induirait une hypertrophie excentrique et une transition rapide vers la défaillance cardiaque (76). L'activation de p38-MAPK et de JNK mènent également vers une hypertrophie maladaptative (77-79). Le calcium intracellulaire est également impliqué dans la réponse hypertrophique. L'activation de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase, entraîne la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT3 permettant sa translocation dans le noyau et son interaction avec le facteur de transcription GATA4 et ainsi induire l'expression de gènes hypertrophiques (80). Il fut démontré par plusieurs études *in vitro* et *in vivo* et sur différents modèles expérimentaux, que le traitement avec la cyclosporine A, inhibiteur de la calcineurine, produit une réduction significative de l'hypertrophie (81).

2. Implication de l'environnement stéroïdien dans l'HVG

2.1 Dimorphisme sexuel au niveau cardiaque

Chez l'humain, on ne retrouve pas avant la puberté de différence significative entre les sexes pour ce qui est de la masse cardiaque (82). Après la puberté, on retrouve une masse cardiaque plus importante chez les mâles que les femelles d'environ 15-30% (3;83). En sachant que les mâles et les femelles ont à l'origine le même nombre et la

même taille de cardiomyocytes, on peut donc conclure que les cardiomyocytes des mâles subissent après la puberté une hypertrophie plus importante. Les femmes pré-ménopausées ont également un plus faible risque de maladies cardiovasculaires que les hommes. Chez les femmes, le risque de décès par maladies coronariennes correspond approximativement au risque chez les hommes plus jeunes d'environ 10 ans. Ce risque se voit augmenter dans la période post-ménopause. Entre 45 et 64 ans, plus d'hommes (39%) que de femmes meurent de maladies cardiovasculaires. Toutefois, après 65 ans, on retrouve plus de femmes (22%) que d'hommes qui décèdent de maladies cardiovasculaires (84). De plus, les femmes pré-ménopausées ont un meilleur pronostic pour plusieurs maladies cardiovasculaires que les hommes. Lors de sténose aortique, d'hypertension, du vieillissement, de CMH, on retrouve chez les femmes une contractilité augmentée avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. Chez les hommes, on retrouve une mauvaise contractilité, une dilatation de la chambre et un amincissement de la paroi ventriculaire (85-90). Une explication intéressante à ces observations est que les estrogènes auraient des propriétés cardioprotectrices. Par contre, cette différence pourrait également impliquer un mécanisme soit génétique, soit hormonal (autre que les estrogènes), soit relié au mode de vie, ou une combinaison de ces facteurs (91).

Il existerait également une différence entre les sexes pour ce qui est de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique des médicaments. La pharmacocinétique peut différer entre les sexes à cause de plusieurs facteurs, incluant entre autres l'acidité gastrique, le flot sanguin gastrointestinal, la proportion tissus musculaires/tissus adipeux, la quantité de protéines liant le médicament et la quantité disponible d'isoenzyme P450, pour ne nommer que ceux-là. La grossesse, les menstruations, la ménopause, la prise de contraceptifs oraux entraînent également des modifications du métabolisme des médicaments. Il fut noté que les femmes avaient un plus grand risque de développer une torsade de pointes (forme particulière de tachycardie ventriculaire due à un trouble de repolarisation ventriculaire) lors de la prise d'antiarythmiques comme le d-sotalol. De plus, les femmes ont un risque cardiovasculaire augmenté lors de la prise de digoxine (92).

2.2 Les estrogènes

Les estrogènes, comme tous les stéroïdes, sont dérivés du cholestérol et de la prégnénolone qui sont transformés en androstènedione et testostérone, précurseurs directs des estrogènes. Les estrogènes sont synthétisés principalement par les ovaires mais également par les testicules, les glandes corticosurrénales, le tissu adipeux et le cerveau (93).

Les récepteurs des estrogènes (ERs) sont des protéines cytosoliques solubles. Il existe 2 sous-types de ERs, α et β , ayant une distribution tissulaire spécifique (94). Le complexe stéroïde-récepteur accède au noyau par les pores nucléaires (95). Ces ERs sont des facteurs de transcription activés par le ligand. Cette liaison permet l'activation ou la répression de la transcription des gènes dont le promoteur contient la séquence palindromique de l'élément de réponse à l'estrogène: 5'-GGTCACAGTGACC-3' (96). De plus, on retrouve également des ERs à la surface cellulaire. Ces ERs membranaires activent des voies de signalisation intracellulaire via des cascades de kinases, le calcium et d'autres seconds messagers modulant la transcription (97;98). De plus, les ERs peuvent également être activés par des facteurs de croissance sans la présence d'estrogènes (99). L'activation des ERs indépendante des estrogènes intervient dans différentes voies intracellulaires dans les cellules vasculaires et non vasculaires (100).

2.2.1 Rôle des estrogènes

Les estrogènes modulent plusieurs mécanismes physiologiques dans le système reproducteur mâle et femelle, le système cardiovasculaire, le système immunitaire, le SNC et l'os (101).

2.2.2 Effets cardiovasculaires des estrogènes

Il a été établi que les femmes avant la ménopause ont un risque moins élevé de maladie cardiaque ischémique. Par contre, ce risque se voit augmenter à la survenue de la ménopause, ce qui suggère que les hormones sexuelles féminines, principalement l'estrogène, jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardiaques ischémiques (102). Il fut démontré que les cardiomyocytes contenaient des ERs (103) et des récepteurs aux androgènes (104). Toutefois, nous ne savons pas quel sous-type de ERs est responsable de l'effet protecteur des estrogènes (94). Les mécanismes par lesquels les estrogènes exercent leur effet cardioprotecteur peuvent être de deux types : 1) effet des estrogènes sur des facteurs systémiques ; 2) effet direct des estrogènes sur les cellules cardiaques.

Les études sur l'hormonothérapie de remplacement (HRT) administrée aux femmes ménopausées a permis de démontrer que les estrogènes modifient le ratio LDL/HDL en augmentant les HDL et en réduisant les LDL et le cholestérol total, favorisent le métabolisme du glucose, facilitent la vasodilatation entraînée par l'oxyde nitrique (NO) et inhibent la réponse des vaisseaux sanguins aux lésions et à l'athérosclérose (105-107). Il a été démontré que les estrogènes ont un effet direct sur le cœur en réduisant la taille du myocarde infarci et l'arythmie ventriculaire lors de lésions par ischémie/reperfusion sans changement des paramètres hémodynamiques (105;106). Ces effets cardioprotecteurs des estrogènes pourraient en partie expliquer la prévalence plus faible de maladies cardiovasculaires chez les femmes pré-ménopausées. Pendant plusieurs années, l'HRT fut utilisée afin de diminuer les symptômes de la ménopause et pour ses effets positifs sur l'ostéoporose, la maladie d'Alzheimer et la fonction cardiovasculaire. Par contre, en 2002, une étude clinique de la WHI sur l'administration d'une HRT contenant de la progestérone et de l'estrogène a du être stoppée prématurément étant donné l'observation d'une augmentation du risque de cancer du sein, d'AVC et de maladies des artères coronariennes (108). De plus, l'étude clinique du WHI sur l'administration d'estrogène seulement n'a pas démontré de protection cardiovasculaire (109). Par ailleurs, l'expression hépatique de certaines protéines

impliquées dans la coagulation et la fibrinolyse est contrôlée par l'estrogène à l'aide des ERs. L'HRT augmente la quantité de facteur VII et diminue la concentration de prothrombine III, ce qui favorise la thrombose veineuse (110;111). L'HRT augmente également la quantité de marqueur de l'inflammation, comme la protéine C-réactive (112). Donc, encore aujourd'hui l'usage de l'HRT est très controversé.

Les études chez les animaux ont permis de démontrer que l'estrogène diminue rapidement le courant calcique des canaux calciques de type L ce qui permet de diminuer le calcium intracellulaire lors de la systole (113;114). Lorsque les estrogènes sont présents en plus faible concentration, comme chez les mâles et les femelles ménopausées, l'augmentation du calcium intracellulaire peut entraîner plus facilement une induction des voies de signalisation hypertrophiques calcium-dépendantes comme calmoduline/NFAT et MAPK (115). De plus, les ERs activés par les estrogènes lient la sous-unité régulatrice de PI₃K qui activera à son tour la kinase Akt/PKB et eNOS. Cette activation induira une protection contre les lésions vasculaires causées par l'ischémie/reperfusion (116). Les stéroïdes sexuels seraient responsables de l'augmentation de l'expression de l'ACE chez les mâles comparativement aux femelles. Il fut suggéré que les estrogènes permettraient une diminution de l'expression de l'ACE alors que la testostérone permettrait une régulation à la hausse de l'expression de l'ACE (117). PKB est une molécule centrale de la régulation de l'apoptose et du métabolisme du glucose. La phosphorylation de PKB induit sa migration vers le noyau et l'activation par phosphorylation de facteurs de transcription pro-apoptotiques (118). On retrouve chez les femmes pré-ménopausées une plus grande quantité de PKB et de facteurs pro-apoptotiques phosphorylés que chez les hommes du même âge (119). Il fut démontré qu'une augmentation de l'activité de PKB est peut être protectrice contre les lésions par ischémie/reperfusion et les infarctus. De plus, PKB activé permettrait d'augmenter la recapture de glucose en augmentant l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (120). P38-MAPK induit l'expression de gènes hypertrophiques et une réorganisation sarcomérique qui contribuent à la transition vers une défaillance cardiaque (121). Il fut démontré que l'estrogène inhibe P38-MAPK (122).

2.3 Phytoestrogènes

2.3.1 Caractéristiques et métabolisme des phytoestrogènes

Les phytoestrogènes sont des molécules non stéroïdiennes qui ressemblent aux estrogènes, plus particulièrement au 17β -estradiol, et que l'on retrouve dans une grande variété de plantes. Les phytoestrogènes sont séparées en 4 classes principales : isoflavones, stilbènes, coumestans et lignans. Les principales isoflavones, qu'on nomme également phytoestrogènes, sont la génistéine et la daidzéine qu'on retrouve communément sous forme de glucoside inactif en grande quantité dans le soya (123) et en petite quantité dans les fruits. La principale stilbène est le resvératrol qu'on retrouve principalement dans de la pelure du raisin et dans les arachides (124;125). Seulement quelques coumestans ont une activité estrogénique, dont le plus important est le coumestrol que l'on retrouve dans les légumes (126). Lignans est un terme général pour désigner plusieurs composés, dont un des plus importants est le matairesinol qui est un dimère non estrogénique, mais qui est converti par la flore intestinale en entérolactone qui, lui, a une activité estrogénique et qui est facilement absorbé. On retrouve les lignans principalement dans les graines de lin mais également dans la farine de blé entier, les fruits et le thé (127).

Figure 1 : Structure des phytoestrogènes en comparaison à l'estradiol.

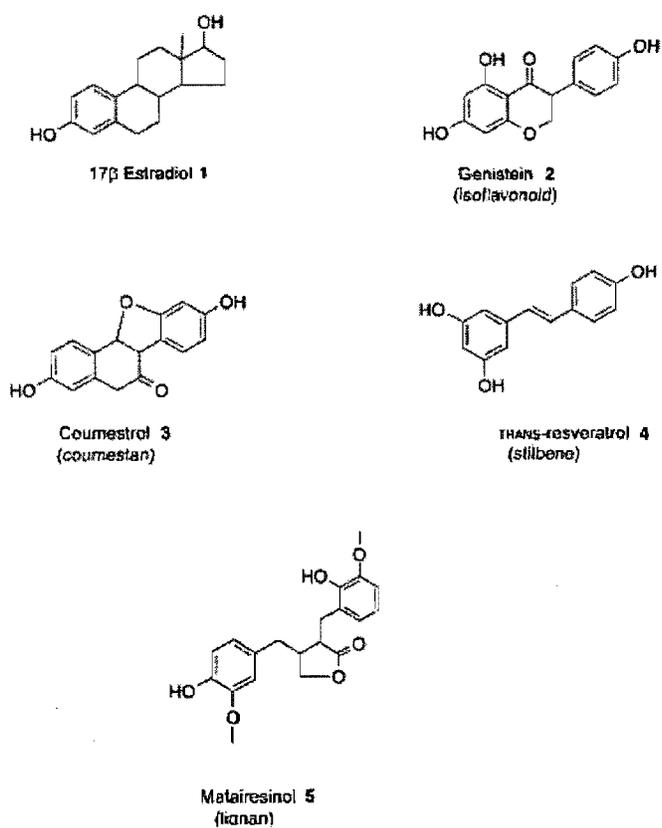


Image modifiée à partir de Cornwell T et al., *Phytochemistry* 2004;65 :995-1016.(124)

Les isoflavones sont également présentes sous forme de précurseurs, tels que la biochanine A et formononétine qui sont respectivement convertis en génistéine et en daidzéine, molécules ayant une plus grande estrogénécité (128), par la glucosidase intestinale. La génistéine et la daidzéine sont ensuite métabolisées respectivement en *p*-éthyl phénol et en équol et/ou *O*-desméthylangolensine (*O*-DMA) des composés facilement absorbés. Les composés absorbés sont par la suite conjugués dans le foie à l'acide glucuronique ou sulfurique et entrent dans la circulation entérohépatique et sont excrétés dans l'urine et la bile (129). Ces phytoestrogènes ont une affinité plus grande pour les ERs β que α (130). Comme pour ce qui est des estrogènes endogènes, les phytoestrogènes peuvent lier des ERs cytosoliques et avoir un effet soit génomique (131), ou lier les ERs membranaires et induire l'activation de voies de signalisation intracellulaire (132).

2.3.2 Effets cardiovasculaires des phytoestrogènes

Dans la diète des Asiatiques, on retrouve une quantité plus importante de phytoestrogènes que dans celle des populations occidentales. En effet, en moyenne la diète asiatique contient entre 20 et 80 mg par jour de phytoestrogènes (133;134) tandis que la consommation quotidienne aux États-Unis se situe entre 0,15 à 3 mg (135). On retrouve également dans les populations orientales une prévalence moins élevée de maladies cardiovasculaires, d'ostéoporose, de cancer de la prostate, du sein et du colon. Cette protection contre ces diverses pathologies est cependant perdue lorsque les Asiatiques adoptent une alimentation et un style de vie occidentale (136).

En 2000, le « American Heart Association » indiquait que la consommation quotidienne de 25 g de protéines de soya contenant des phytoestrogènes intacts pouvait entraîner une amélioration du profil lipidique chez un humain ayant une hyperlipidémie, en diminuant le taux de cholestérol total, les lipoprotéines à faible densité (LDLs) et les triglycérides sans affecter de façon significative les lipoprotéines à haute densité (HDLs) (137). Il fut démontré que les protéines de soya ne contenant pas d'isoflavones sont moins efficaces (138;139). Un apport de 25-50 mg par jour serait suffisant et sécuritaire

pour diminuer les LDLs d'environ 4-8%. L'effet hypocholestérolémiant des phytoestrogènes semble être plus significatif chez les individus ayant initialement un taux élevé de cholestérol. L'ingestion de phytoestrogènes semble avoir un effet moindre ou ne pas avoir d'effet chez les individus ayant un taux normal de cholestérol (140;141). Les différences individuelles au niveau des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des phytoestrogènes pourraient être un facteur important qui déterminerait l'efficacité de ces composés à procurer une cardioprotection. En effet, environ un tiers de la population humaine convertit efficacement la daidzéine en équol (142;143). Cette différence au niveau de l'efficacité de conversion semble être due à une différence individuelle dans la composition de la flore intestinale qui est modulée par les habitudes alimentaires (143). Le mécanisme par lequel les isoflavones induisent leur effet hypocholestérolémiant n'est pas encore connu (144). Toutefois, il a été proposé que les phytoestrogènes présents dans les protéines de soya pourraient stimuler la clairance du cholestérol en augmentant l'activité des récepteurs de LDLs (145). De plus, il subsiste une controverse par rapport à cet effet hypolipidémiant des isoflavones. En effet, quelques études portant sur l'effet des isoflavones pures sur le profil lipidique ont obtenu des résultats négatifs (141;146-148)

De plus, les phytoestrogènes pourraient avoir une activité vasodilatatrice. Par contre, les différentes études sur ce sujet n'arrivent pas toutes à la même conclusion (149-155).

Des études *in vivo* et *in vitro* ont également démontré que les phytoestrogènes auraient une activité antioxydante. Les phytoestrogènes semblent augmenter de façon directe ou indirecte l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase (156;157). La peroxydation des lipides artériels est un mécanisme présumé de développement et de progression de l'athérosclérose (158-160).

Les isoflavones, en particulier la génistéine, ont démontré des effets antiprolifératifs dans des lignées cellulaires humaines (161). Sachant que le processus de

formation de plaques athérosclérotiques est dû initialement à une lésion endothéliale qui mène à une infiltration et à une prolifération cellulaire, des études *in vitro* ont démontré que les isoflavones pouvaient altérer de façon favorable les processus cellulaires associés au développement de la lésion (162).

De plus, il fut démontré que la génistéine prévient la thrombogénèse et supprime l'agrégation plaquettaire *in vitro* chez la souris (163). Les isoflavones joueraient un rôle de bloqueur de canaux calciques qui entraînerait une inhibition de l'activation des plaquettes chez l'humain (164).

Une étude a également démontré que l'administration de nourriture riche en phytoestrogènes à des rates présentant une surcharge volumique chronique causée par une fistule aorto-veineuse prévient la dilatation du VG (165).

Le placenta n'étant pas une barrière pour les phytoestrogènes, les mères qui consomment une diète riche en isoflavones procurent donc à leur fœtus une exposition significative à ces molécules (166). De plus, plusieurs études présentent un intérêt soutenu pour les formules de lait pour enfants à base de soya qui contiennent une quantité importante de phytoestrogènes. Cette inquiétude provient du fait que des études animales ont démontré qu'une exposition à 50 mg/kg par jour de génistéine augmenterait l'incidence d'adénocarcinome de l'utérus à 18 mois (167). Toutefois, une étude sur différentes formules pour enfants de lait de soya a établi la dose quotidienne d'isoflavones ingérée à environ 3 mg/kg de masse corporelle, ce qui est bien en dessous de la dose induisant des néoplasies chez les souris néonatales (168). Il fut également démontré que lorsqu'une rate est nourrie durant la période de gestation et de lactation avec une nourriture à base de soya, riche en phytoestrogènes, ses rejetons à l'âge adulte ont des cardiomyocytes plus courts que les rejetons dont la mère a reçu une alimentation à base de caséine dépourvue de phytoestrogènes. Toutefois, la diète à base de soya n'a pas cet effet cardioprotecteur lorsqu'elle est administrée après l'âge de 6 semaines. Cet effet est reproduit lorsqu'on supplémente la diète maternelle exempte de phytoestrogènes (à base de caséine) avec la daidzéine et la génistéine, les phytoestrogènes les plus

abondants de la diète à base de soya (169). Par contre, l'impact des phytoestrogènes sur la morphologie des cardiomyocytes chez les rats n'a pu être vérifié étant donné qu'il est impossible d'isoler à cet âge des cardiomyocytes complètement différenciés.

2.3.3 Mode d'action des phytoestrogènes

Il fut démontré que non seulement les phytoestrogènes ont la capacité de lier les ERs α et β , mais que les phytoestrogènes peuvent également lier d'autres récepteurs nucléaires. En effet, les phytoestrogènes lient les récepteurs nucléaires PPAR α , PPAR γ , PXR, TR β et ERRs. Donc, les effets biologiques des phytoestrogènes pourraient être dus en partie à l'activation de ces récepteurs nucléaires.

De plus, les phytoestrogènes joueraient un rôle important au niveau de la méthylation de l'ADN. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les phytoestrogènes modifiaient l'expression de plusieurs gènes en altérant le profil de méthylation de leur promoteur (170-173).

3. Impact cardiovasculaire d'une modification du cycle circadien

3.1 Cycle circadien

Toute personne ayant déjà subi un important décalage horaire a ressenti les désagréments qu'entraîne une perturbation de notre cycle circadien. En effet, cette situation entraîne plusieurs symptômes : somnolence, diminution de l'attention et des performances, difficulté à s'endormir et à maintenir le sommeil, irritabilité, malaises gastro-intestinaux (174;175). De fréquents voyages aériens sont associés à des troubles menstruels (176), à une atrophie des lobes temporaux et à des déficits cognitifs (177). De plus, prendre des repas à des phases inhabituelles du cycle circadien entraîne une réponse métabolique inappropriée considérée comme un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires et le diabète mellitus de type II (178). Les travailleurs de nuit ont un

risque plus élevé d'ulcères gastrique et duodéal comparativement aux travailleurs diurnes (179). De plus, une étude est arrivée à la conclusion que les travailleuses nocturnes avaient un risque plus élevé de cancer du sein (180).

Tous les organismes vivants ont un rythme circadien extrêmement précis et soutenu, allant des unicellulaires aux organismes plus complexes (181;182). Le cycle circadien donne l'avantage de l'anticipation. Il prépare la cellule aux changements de l'environnement avant même qu'ils arrivent. Il fut suggéré que l'évolution a entraîné le développement d'une horloge circadienne pour permettre aux cellules non complexes d'anticiper les périodes de forte radiation ionisante par la lumière du soleil et permettre ainsi la synthèse d'ADN la nuit et minimiser la quantité de mutations (183). Une des particularités du cycle circadien est qu'il peut être réinitialisé, ce qui nous permet de s'adapter au décalage horaire.

Dans l'établissement du cycle circadien, l'alternance lumière/obscurité, qu'on nomme également zeitgeber, est le facteur le plus important. Par contre, d'autres facteurs influencent l'oscillation circadienne : le cycle de température, le moment des repas et les interactions sociales (184). Chez les mammifères, l'horloge circadienne située au niveau du noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus reçoit les informations sur le cycle lumière/obscurité et orchestre le rythme circadien au niveau de l'organisme. En effet, le NSC entraîne le cycle veille-sommeil et l'oscillation circadienne au niveau de la synthèse et de la relâche hormonales (par exemple, le cortisol et la mélatonine), du maintien de la température corporelle, de l'apport alimentaire, de divers aspects du métabolisme, de la pression intraoculaire et de la sensibilité visuelle (185). Des expérimentations animales ont démontré qu'une lésion au niveau du NSC entraîne une perte du rythme circadien, tandis qu'une transplantation de tissus du NSC fœtal réintroduit l'oscillation circadienne chez l'animal (186). Le rythme circadien est un mécanisme qui se manifeste au niveau cellulaire. On a retrouvé un rythme circadien au niveau de toutes les cellules mammifères qui ont été investiguées jusqu'à présent (187-190). Toutefois, cette oscillation périphérique est gardée en phase grâce au NSC. Le NSC reçoit des signaux des photorécepteurs de la rétine via la voie rétinohypothamique. En réponse aux signaux

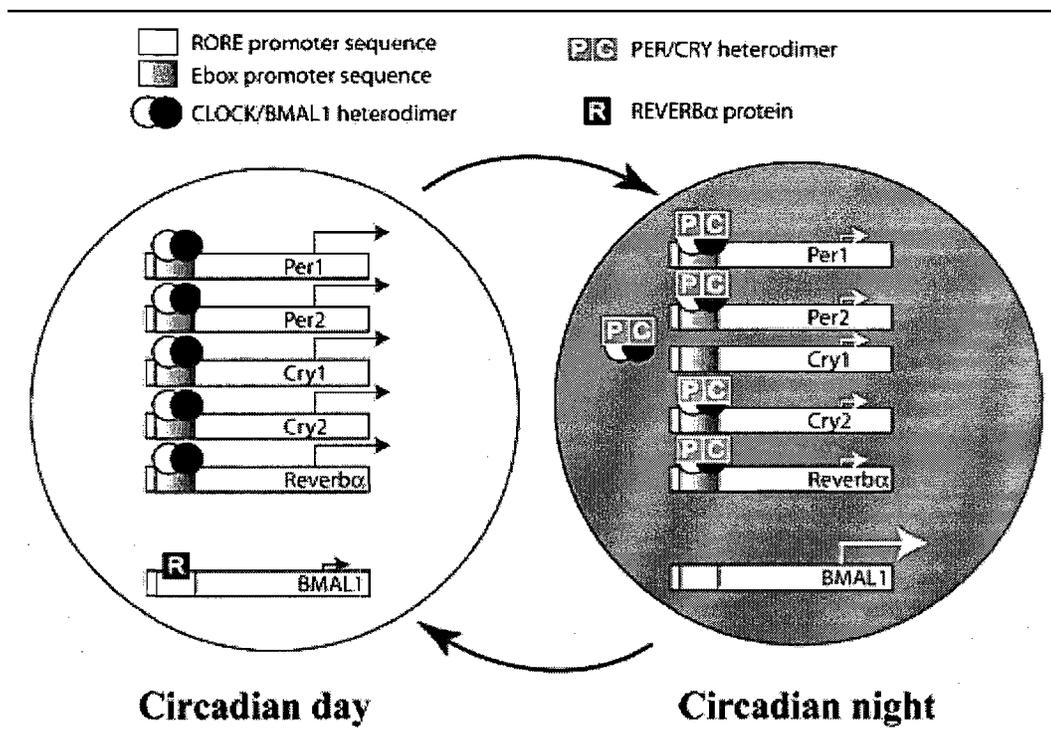
envoyés par la rétine, le NSC stimule la sécrétion de sérotonine par la glande pinéale durant la journée et de mélatonine durant la nuit (191). La concentration de mélatonine est toujours plus élevée durant la nuit chez tous les animaux étudiés jusqu'à présent même chez ceux actifs la nuit. L'élévation nocturne de mélatonine dépend également de l'augmentation de noradrénaline au niveau de la branche nerveuse terminale qui agit sur les récepteurs α et β -adrénergiques (192). La sécrétion nocturne de mélatonine est abolie ou réduite substantiellement lorsqu'un mammifère est exposé de façon continue (24 heures) à la lumière. Toutefois, l'expression des gènes circadiens reste inchangée ou subit une légère translation. Les personnes aveugles ont un cycle circadien qui est un peu plus long que 24 heures (environ 24,5 heures) mais qui n'est pas synchronisé avec les éléments environnementaux (lumière/obscurité). L'administration de mélatonine exogène chez ces gens régularise leur cycle circadien (193). Les effets de la mélatonine sont médiés par des récepteurs membranaires couplés à une protéine G. Chez les mammifères, deux sous-types de récepteurs ont été identifiés : MT₁ (Mel_{1a}) et MT₂ (Mel_{1b}). Toutefois, l'effet physiologique de la mélatonine endogène n'est encore que très peu compris.

3.1.1 Mécanismes moléculaires

Le cycle circadien est régi par plusieurs protéines qui induisent une boucle de rétroaction transcriptionnelle positive et négative sur une période de 24 heures (figure 2). Le modèle couramment accepté de l'oscillateur circadien chez les mammifères est composé de : période (Per1, Per2, Per3), cryptochrome (Cry1, Cry2), Clock et 2 Bmal. Chez les mammifères, Clock et Bmal1 s'hétérodimérisent pour former un complexe transcriptionnel actif qui va lier l'élément « E-box » (CACGTG) qu'on retrouve dans le promoteur des gènes Per et Cry (194;195). Lorsque que Per et Cry ont été traduits, ils forment un complexe qui se transloque au noyau et inhibe la transcription dépendante de l'hétérodimère Clock-Bmal1 par une interaction protéine-protéine directe (196). La transcription d'autres gènes contenant des « E-box » est également modulée par la liaison de l'hétérodimère comme par exemple, Dbp (albumin D element-binding protein) et Tef.

(thyrotroph embryonic factor) (197). Une boucle auxiliaire qui est contrôlée par *Reverba*, récepteur nucléaire orphelin, ferait le lien entre la partie positive et négative de l'oscillateur moléculaire (198). *Reverba*, dont l'expression est induite par l'hétérodimère *Bmal1-Clock*, est exprimé en phase avec *Per* et *Cry*. La protéine *Reverba* supprime *Bmal1* et *Clock* par une séquence RORE (retinoic acid-related orphan receptor response element). La diminution de concentration de *Reverba* permet l'expression de *Bmal1* et *Clock* qui a son pic à la fin de la nuit circadienne. *Dec* (differentially expressed in chondrocytes) est une protéine à domaine basique hélice-boucle-hélice qui inhibe la transcription du messager de *Per1* en liant le « E-box » de son promoteur (199). *Clock-Bmal1* activent la transcription d'autres gènes cibles ce qui entraîne leur rythmicité. En plus de ce contrôle transcriptionnel, d'autres niveaux de régulation permettent d'établir et de maintenir le rythme circadien : régulation post-transcription (200;201), modifications post-traductionnelles (202), remodelage de la chromatine (203;204), disponibilité et stabilité des protéines du cycle circadien et régulation de la localisation intracellulaire (205;206).

Figure 2 : Représentation schématique du processus moléculaire constituant l'oscillateur circadien au niveau du NSC chez les mammifères.



Tirée de Hastings MH, Herzog ED. J Biol Rhythms 2004;19:400-13. (207)

L'oscillation sur environ 24 heures est possiblement due au délai entre la transcription, la traduction et la répression transcriptionnelle, mais ce mécanisme n'est toutefois pas entièrement compris. Il fut noté chez l'animal et chez l'humain qu'une augmentation de la dégradation du messager ou de la protéine Per entraîne un raccourcissement de la période circadienne (208-210).

3.1.2 Cycle circadien et pathologie cardiovasculaire

Le cycle circadien module plusieurs processus physiologiques. Durant la nuit, lorsque la concentration de mélatonine est élevée, la TA, le rythme cardiaque et le débit cardiaque sont diminués et la résistance vasculaire périphérique est augmentée (211). Plusieurs incidents cardiovasculaires (incluant l'infarctus du myocarde, l'arythmie cardiaque, la mort subite, et l'AVC) ont une incidence plus élevée le matin entre 6h00 et 12h00 que le soir. Des études ont démontré que les corticostéroïdes activent les leucocytes et la fonction endothéliale de façon différentielle en fonction du cycle circadien, ce qui pourrait jouer un rôle critique dans la pathophysiologie des événements thrombotiques et autres troubles inflammatoires (212). La présence de récepteur MT1 sur les artères coronaires a été démontrée, ce qui serait compatible avec un effet direct de la mélatonine sur le système vasculaire. Plusieurs facteurs physiologiques qui ont un effet sur la fonction vasculaire sont modulés directement ou indirectement par l'oscillation circadienne : l'adrénaline plasmatique, l'activateur tissulaire du plasminogène (PA-1), l'agrégation plaquettaire et la fibrinolyse.

Il fut démontré que chez les hommes en santé, la vasodilatation dépendante de l'endothélium varie selon l'oscillation circadienne. Ce phénomène semble être cardioprotecteur puisqu'il permet de compenser pour les changements au niveau des paramètres hémodynamiques dépendants du temps. Toutefois, les patients présentant une maladie coronarienne ont perdu ce rythme circadien au niveau de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et donc son effet cardioprotecteur, ce qui pourrait contribuer à la progression de l'athérosclérose (213).

De plus, la mélatonine pourrait directement affecter la réponse biologique aux estrogènes. En effet, une étude sur des cellules en culture a établi que la mélatonine supprime la transcription génique dépendante du récepteur ER α et réprime sa réponse biologique (214).

3.1.3 Effets des estrogènes sur le rythme circadien

Il fut démontré que des récepteurs ER α et ER β se retrouvent au niveau du NSC (215;216) et que les estrogènes ont un impact sur le cycle circadien (217). L'activation de ces récepteurs semblerait modifier la sécrétion de neurotransmetteurs au niveau du NSC et ainsi modifier l'oscillation circadienne (218). Toutefois, aucune étude n'a démontré un effet similaire des phytoestrogènes sur le cycle circadien.

4. Implication du cycle cellulaire dans l'HVG

4.1 Cycle cellulaire

Les cellules qui ne sont pas en division se retrouvent en phase G₀ du cycle cellulaire. Ces cellules doivent entrer dans la phase G₁ afin d'éventuellement pouvoir se répliquer. L'initiation de la réplication de l'ADN a lieu à la phase S du cycle, ensuite il y aura la phase G₂ et mitose à la phase M du cycle cellulaire. Les cyclines, les kinases cyclines-dépendantes (CDKs) et leurs inhibiteurs sont des molécules clés dans le contrôle du cycle cellulaire. Chaque cycline et ses CDKs partenaires sont importants pour une phase précise du cycle cellulaire. La phosphorylation de protéines cibles par les CDKs permet la progression de la cellule vers la phase suivante du cycle cellulaire. Les CDKs sont exprimées de façon constitutive sous formes inactives. Pour leur part, les cyclines sont synthétisées en réponse à des facteurs de croissance à des stades précis du cycle cellulaire et ont pour rôle d'activer les CDKs (219).

La cycline D1 et CDK4 ou CDK6 sont impliqués précocement dans la phase G₁. La principale molécule cible de ce complexe est le rétinoblastome (Rb). La

phosphorylation de Rb par la cycline D1/CDK4 permet de libérer le facteur de transcription E2F et ainsi permettre la transcription de gènes dont la protéine est nécessaire à la transition G₁/S (219;220) (figure 3A). La cycline E, dont la transcription fut activée par E2F, en association avec CDK2 permet de faire la transition G₁/S. Le prochain point de transition du cycle cellulaire est la transition entre les phases G₂/M (221). La transcription de la cycline A est médiée par E2F. Le complexe cycline A/CDK2 régule la prophase mitotique. Le médiateur principal de la transition G₂/M est le complexe cycline B/CDK1 qui cause le bris de l'enveloppe nucléaire et initie la mitose (222).

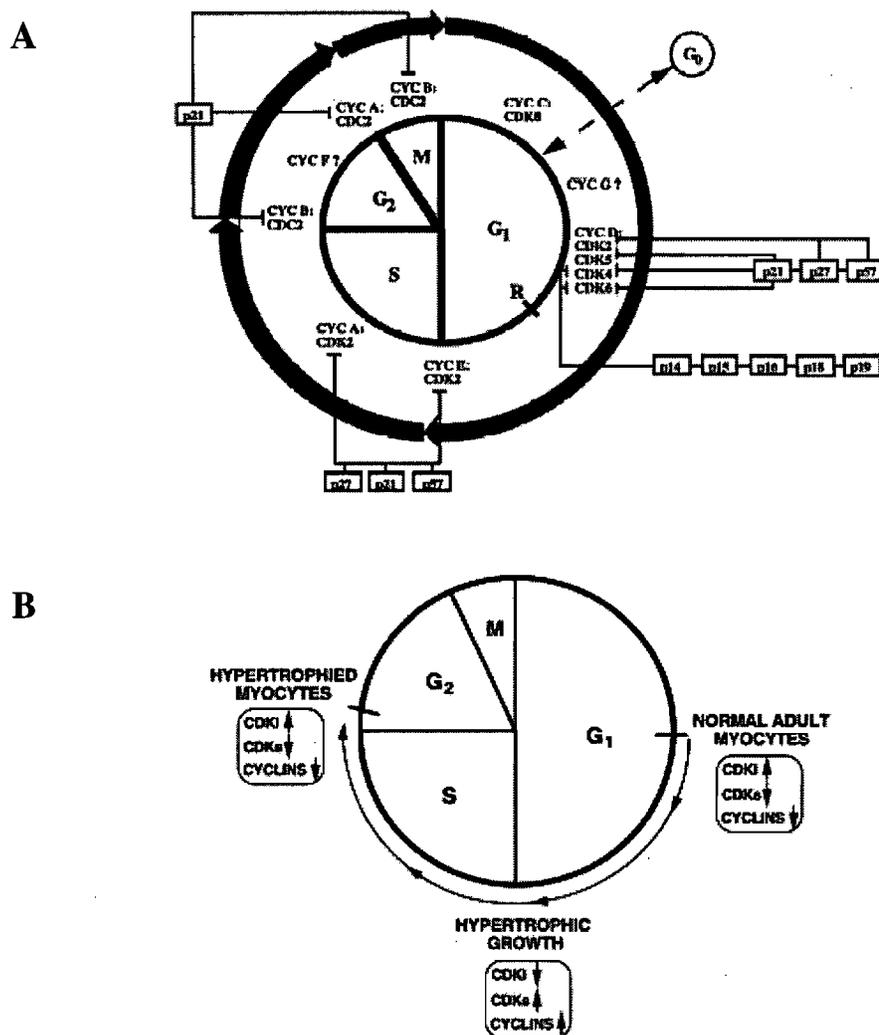
L'activité des complexes cycline/CDK est régulée par les inhibiteurs de CDKs (CDKI). Il existe deux classes principales d'inhibiteurs : la famille des Cip/Kip et des INK4/ARF. La famille des Cip/kip est composée de p21, p27 et p57. Ces protéines lient et inhibent les complexes cyclines/CDKs. La famille INK4/ARF est composée de p16INK4 et de p14ARF. L'activation de la transcription de p21 est sous le contrôle de p53, un suppresseur de tumeur. Le rôle de p53 dans le cycle cellulaire est de surveiller et d'amorcer les points de restriction qui ralentissent ou arrêtent la progression dans le cycle cellulaire des cellules endommagées ou d'induire l'apoptose (223).

4.1.1 Implication des molécules régulatrices du cycle cellulaire dans la croissance hypertrophique des cardiomyocytes

Rapidement après la naissance, les cardiomyocytes n'ont plus la possibilité de se diviser. Toutefois, la synthèse d'ADN se poursuit durant la période néonatale ce qui contribue à la binucléation des cardiomyocytes. Dans un cœur adulte, 85% des cardiomyocytes sont bloqués à la phase G₀ ou G₁ et 15% sont bloqués à la phase G₂/M du cycle cellulaire (224). Les éléments inhibiteurs du cycle cellulaire, spécialement p21 et p27 sont cruciaux dans cet arrêt du cycle cellulaire. Une étude a démontré que lors du développement de l'HVG induite par une surcharge systolique, on retrouve une diminution significative mais transitoire de l'expression de l'ARNm et de la protéine des deux CDKIs, p21 et p27, entre 3 et 14 jours après la constriction aortique

comparativement aux animaux contrôles et ce taux retourne au même niveau que les contrôles 21 jours après l'opération induisant la surcharge systolique. Des analyses immunohistochimiques sur des coupes de VG ont permis de constater que la diminution de la concentration des protéines p21 et p27 lors d'HVG a lieu spécifiquement dans le noyau des myocytes (225). L'expression et l'activité de CDK4 et CDK6 sont augmentées 7 jours après la constriction aortique et reviennent au même niveau que les contrôles 6 semaines post-opératoires. Donc, lors d'HVG, la diminution de CDKIs permettrait aux cardiomyocytes d'entrer dans le cycle cellulaire et de passer jusqu'à la phase G2 étant donné que les cardiomyocytes ne peuvent pas entrer en mitose (figure 3B). Cette diminution dans la concentration de p21 et p27 permettrait l'hypertrophie des cardiomyocytes (224).

Figure 3 : Schéma démontrant l'implication possible des molécules régulatrices du cycle cellulaire dans le développement de cardiomyocytes hypertrophiés.



Brooks G et al. Cardiovasc Res 1998;39:301-11. (224)

6.1 Projet de recherche

Le laboratoire pour lequel j'ai travaillé a démontré que lorsqu'une rate est nourrie durant la période de gestation et de lactation avec une nourriture à base de soya, riche en phytoestrogènes, ses rejetons à l'âge adulte ont des cardiomyocytes plus courts que les rejetons dont la mère a reçu une alimentation à base de caséine dépourvue de phytoestrogènes (169).

Nous avons donc été intéressés à en savoir plus sur les mécanismes moléculaires à l'origine de ces observations. Une micropuce Affymetrix a été générée afin de nous permettre d'analyser à grande échelle les différences transcriptionnelles entre les rats dont la mère a reçu une alimentation riche en phytoestrogènes (PE+) et ceux dont la mère n'a pas ingéré de phytoestrogènes (PE-). Les résultats de l'analyse de cette puce nous ont permis d'observer de nombreuses différences entre les deux groupes au niveau de leur transcriptome.

Notre premier objectif fut de confirmer par des techniques supplémentaires certains des résultats obtenus à partir de l'analyse des micropuces Affymetrix. Parmi les gènes montrant une expression différentielle, nous avons privilégié ceux qui : 1) montraient les plus fortes différences d'expression ; 2) appartenaient à une classe de gènes dont plusieurs membres montraient une expression différentielle; 3) pouvaient avoir du point de vue fonctionnel une implication dans la régulation de la masse et/ou la géométrie du cœur ; et/ou 4) étaient connus pour être régulés par des mécanismes de méthylation du promoteur.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux

Toutes les procédures animales ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Institut de recherche clinique de Montréal (IRCM) selon les recommandations du Conseil canadien de la santé animale. La nomenclature des souches se plie aux recommandations de *International Rat Genetic Nomenclature Committee*. Les rats WKY/Cfd proviennent d'une colonie gérée à l'IRCM et sont les descendants de parents WKY/Cr en provenance de Charles River (St. Constant, Québec, Canada). Les animaux adultes ont été regroupés (2 à 3 par cage); leur accès à l'eau et à la nourriture est illimité. Les souches WKY sont maintenues sur deux alimentations différentes; l'une contenant du soya et donc des PE : Ralston Purina 5012 (Agribands, Canada), l'autre dont la source de protéine est remplacée par de la caséine et qui ne contient pas de PE : « *Testdiet's casein based 5K96 diet* » (Ren's Feed, Oakville, ON, Canada). Tous les rats ont été maintenus sur un cycle de lumière 12 :12 h, les lumières étant allumées à 6 :00 AM. Les rats WKY ont été sacrifiés à l'âge de 3 semaines et ont été séparés de leur mère qu'au moment de l'expérimentation. Les deux sexes ont été utilisés sans faire de distinction. Pour les expérimentations portant sur le cycle circadien, les animaux ont été sacrifiés à différents temps de la journée : 2 :00, 6 :00, 10 :00, 14 :00, 18 :00, 22 :00. Les animaux sacrifiés entre 18 :00 et 6 :00 ont été cachés de la lumière jusqu'au moment du sacrifice. Les animaux ayant servi pour les constrictions aortiques étaient des rats WKY âgés de 12 semaines.

2. Prélèvement des tissus

Les animaux utilisés pour les expérimentations de micropuces et du cycle circadien ont été tués par décapitation. Le cœur a été prélevé et disséqué de façon à séparer les oreillettes des ventricules et ensuite, séparer le ventricule droit du gauche. Le ventricule gauche inclut le septum inter-ventriculaire. Les ventricules gauches ont été

broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans de l'azote liquide et gardés à -80°C pour usage futur.

3. Extraction de l'ARN total

Les tissus congelés furent homogénéisés dans une solution dénaturante (4 M guanidium-isothiocyanate, 25 mM citrate de sodium, 0,5% N-Lauroylsarcosine, 0,7% β -mercaptoéthanol à l'aide d'un Polytron (Brinkmann instruments co.). L'ARN total a été extrait selon une modification de la méthode guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme (226). L'ARN a été extrait avec 0,1 volume de citrate de sodium, 1 volume de phénol saturé en citrate, 0,2 volume de chloroforme/alcool isoamyl (49:1) suivi d'une centrifugation à 10 000g durant 15 minutes. L'ARN qui se trouve dans la phase aqueuse fut précipité avec un volume égal d'isopropanol. Ensuite, l'ARN fut nettoyé avec 4 M LiCl et centrifugé à 14 000g. Le culot d'ARN a été dissous dans du TES (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) et nettoyé à l'aide d'un volume égal de chloroforme. L'ARN contenu dans la phase supérieure a été précipité durant 16 heures à -80°C dans de l'éthanol 100% et 0,1 volume de 3M d'acétate de sodium. L'ARN total fut dissous dans de l'eau traité DEPC (sans pyrogène, certifié sans DNase et RNase) (Invitrogen, Carlsbad, CA) et la concentration des échantillons a été mesurée par spectrométrie à 260/280 λ . L'ARN fut conservé à -80°C pour usage futur.

4. Micropuces Affymetrix

L'ARN de 3 VG de rats dans chacun des 2 groupes (PE+ et PE-) a été hybridé sur 6 micropuces « GeneChip rat genome 230 2.0 arrays ». La micropuce contient 30 000 transcrits provenant du génome du rat. Le principe de fabrication des puces à ADN Affymetrix est la synthèse *in situ* de séquences distinctes d'oligonucléotides sur une matrice de verre, fixées par photolithographie et chimie combinatoire. Onze oligonucléotides ont été employés pour mesurer le niveau de transcription de chacune des différentes séquences. Toutes les séquences utilisées sur cette micropuce ont été sélectionnées dans GenBank, dbEST et RefSeq. Les ARNs qui font l'objet de l'analyse sont transcrits en ADNc par transcriptase inverse, puis une transcription *in vitro* est

effectuée pour créer de l'ARN marqué à la biotine pour l'hybridation. L'ARN à analyser est hybridé est coloré à la streptavidine-phycoérythrine. Les micropuces sont analysées avec un module de criblage GeneArray à une longueur d'onde de 488 nm. L'émission de lumière à une longueur d'onde de 570 nm est proportionnelle à la quantité d'ARN marqué lié à chaque position des oligonucléotides sur la puce. L'hybridation et le recueil de données des micropuces ont été effectués par le Centre d'innovation Génome Québec et Université Mc Gill. Ensuite, nous avons analysé les résultats obtenus. Afin de définir une mesure de l'expression qui représente la quantité d'ARNm pour le gène correspondant, il est nécessaire de normaliser l'intensité des amorces dans chaque groupe d'amorces. La normalisation a été faite à l'aide de la méthode RMA (Robust Multi-Array Analysis) à l'aide du logiciel Bioconductor. L'analyse subséquente a été effectuée à partir du logiciel Genespring 5.0. Ce logiciel nous a permis de comparer les deux groupes et de faire ressortir, dans une première analyse, les gènes dont le ratio expérimental/contrôle (ou contrôle/expérimental) était $\geq 1,4$ et dans une deuxième analyse, les gènes dont le « T-test » avait une valeur de $p < 0,05$. Ensuite, nous avons distingué les gènes qui sont ressortis dans nos deux analyses. Les expérimentations subséquentes ont été menées à partir de ces résultats.

5. RT-PCR semi-quantitative

5.1 Transcriptase inverse

Les transcriptases inverses ont été effectuées selon les recommandations du fabricant (Invitrogen). L'ARN (2,5 μg) fut dénaturé par une incubation de 10 minutes à 65 °C en présence de 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'oligo(DT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen). L'ARN dénaturé a ensuite été rétrotranscrit par 200 unités de la rétrotranscriptase Superscript II (Invitrogen) en présence de 1 μL de 10mM de dNTP et de 39 unités de RNAGuard (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) dans un volume total de 10 μL à 42 °C durant une heure. L'enzyme fut dénaturée par une incubation de 15 minutes à 70 °C. L'ADNc ainsi obtenu fut conservé à 4 °C.

5.2 PCR

Pour tous les échantillons, 1 μ L d'ADNc a été utilisé pour l'amplification par PCR. Les amorces ont été conçues de façon à ce qu'elles soient spécifiques à chacun des gènes. L'amplification a été effectuée à l'aide de la Taq polymérase (Quiagen, Mississauga, CA) selon les indications fournies par le manufacturier. Pour chacune des paires d'amorces les conditions optimales d'amplification ont été déterminées (voir tableau II). Afin que l'analyse par PCR soit semi-quantitative, des expériences préliminaires furent menées pour déterminer le nombre de cycles optimal. Pour chaque paire d'amorces, nous avons testé un nombre croissant de cycles d'amplification et nous avons choisi un nombre de cycles se situant dans la phase linéaire d'amplification (voir Annexe 1).

Tableau I : Amorces utilisées pour les différentes réactions PCR.

PRODUIT	AMORCE «FORWARD»	AMORCE «REVERSE»	GENBANK
p21	5'-AGCAAAGTATGCCGTCGTCT-3'	5'-GAGTGCAAGACAGCGACAAG-3'	NM_017198
Bmal1	5'-CCGTGGACCAAGGAAGTAGA-3'	5'-GGGAGGCGTACTTGTGATGT-3'	AB012600
Per2	5'-CATCTGCCACCTCAGACTCA-3'	5'-AGCAGCTTCAGTTCTCCTGT-3'	NM_031678
Dec	5'-AGCCACACGGAACCAAGTTAG-3'	5'-GCAATGGCATCCTCACTTCT-3'	NM_133303
Reverb α	5'-TAGACTCCAACAACAACACAGGT-3'	5'-CATGGCCACTTGTAGACTTCC-3'	NM_145775
Clock	5'-TTGACCAAAGGACAGCAGTG-3'	5'-GTGCGAGGACTTCTTGAGC-3'	NM_021856
Dbp	5'-ACCGTGGAGGTGCTAATGAC-3'	5'-AGCCACACGGAACCAAGTTAG-3'	AI230048
Tef	5'-TCCCTGATGAGCAGAAGGAT-3'	5'-ACACGATGGTCTTGCACTTG-3'	NM_019194
ERR α	5'-CCAGGCTTCTCCTCACTGTC-3'	5'-CACAGCCTCAGCATCTTCAA-3'	AY280663
gapdh	5'-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3'	5'-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3'	NM_017008
TBP	5'-GACTCCTGTCTCCCCTACCC-3'	5'-AGCACAGAGCAAGCAACTCA-3'	AB005895
β -actine	5'-CTTCCTCCCTGGAGAAGAGC-3'	5'-GCACTGTGTTGGCATAGAGG-3'	BC063166
p21-p53	5'-GTGATTTATTGTGATAAGGAGATTT-3'	5'-ATTCCCTAAAAACATACTATACCC-3'	AABR03116894

Tableau II: Paramètres des amplifications PCR selon les différentes amorces.

PAIRE D'AMORCES	AMORCES	TEMPÉRATURE D'HYBRIDATION	NOMBRE DE CYCLES
p21	5 μ M	60°C	27
Bmal1	5 μ M	60°C	28
Per2	5 μ M	60°C	27
Dec	5 μ M	60°C	28
Reverb α	5 μ M	60°C	28
Clock	5 μ M	60°C	30
Dbp	5 μ M	60°C	27
Tef	5 μ M	60°C	27
ERR α	5 μ M	55°C	28
gapdh	5 μ M	60°C	17
TBP	5 μ M	60°C	28
β -actine	5 μ M	60°C	20
p21-p53	5 μ M	60°C	35

5.3 Migration et quantification des produits PCR

La migration des produits PCR a été faite sur un gel 1% agarose (Invitrogen) contenant 1% de bromure d'éthidium. Le gel a été visualisé sur une lumière UV et photographié à l'aide de l'AlphaImager. La quantification des bandes obtenues a été exécutée à l'aide du logiciel AlphaEase FC version 4.0. Toutefois, les résultats n'ont pu être normalisés à l'aide de gapdh, TBP (protéine liant la boîte TATA) ou β -actine étant donné que ces gènes présentaient également une expression circadienne.

6. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir de 25 mg de tissus congelés à l'aide du « DNeasy Tissue kit » (Quiagen) selon les recommandations du fabricant. La concentration

des échantillons a été mesurée par spectrométrie à 260/280 λ . L'ADN fut ensuite conservé à 4 °C pour usage futur.

7. Traitement au bisulfite de sodium de l'ADN

La technique utilisée pour la détection et la quantification de la méthylation de l'ADN est la méthode du bisulfite de sodium. Cette technique consiste à traiter l'ADN avec du bisulfite de sodium, ce qui entraîne la conversion des cytosines non méthylées en uracile alors que les cytosines méthylées demeurent inchangées (227;228).

Le traitement au bisulfite et la purification de l'ADN traité ont été effectués à l'aide du « EZ DNA Methylation kit » (Zymo research, Californie, É-U) à partir de 2 ug d'ADN selon les recommandations du manufacturier. À partir de l'ADN traité, une amplification PCR de l'élément de réponse à p53 du promoteur du gène de p21 fut exécutée comme décrit ci-dessus avec les amorces p21-p53 indiquées dans le tableau I. Une partie des produits PCR fut visualisée sur gel d'agarose comme décrit précédemment afin de s'assurer que l'amplification avait bien fonctionné.

8. Séquençage

Les produits PCR ont été purifiés et séquencés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

9. Constriction aortique

L'HVG a été induite chirurgicalement chez des rats mâles de 12 semaines par une constriction aortique. Chacun des deux groupes (constrictions aortiques et contrôles) contenaient 5 animaux. Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane 5% à un débit de 1 L/min d'O₂ puis maintenus sous isoflurane 2%. Une aiguille de calibre 26G a été positionnée sur le dessus de l'aorte abdominale (en rostrale aux artères rénales). Une suture a été faite autour de l'aiguille et de l'aorte avec un fils de nylon 6-0 et ensuite

l'aiguille fut retirée. La cavité abdominale fut remplie avec 1 mL de saline stérile avant d'être refermée. Les chirurgies contrôles ont été effectuées de la même manière à l'exception des sutures qui n'ont pas été faites autour de l'aorte. Le cœur a été retiré rapidement des animaux anesthésiés (0,18 cc de Ketaset + 0,08 cc Xylasine) 3 jours après la chirurgie. La dissection des cœurs et leur conservation ont été effectuées comme décrit plus haut.

10. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel *GraphPad Prism 4* (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA). Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. Le test « two-way ANOVA » a été utilisé afin de déterminer l'effet des variables temps et alimentation sur l'expression des gènes circadiens ainsi que l'interaction entre ces deux variables. Le post-test de Bonferroni a ensuite été utilisé pour examiner les différences statistiquement significatives observées avec « two-way ANOVA » $p \leq 0.05$ est considéré significatif.

CHAPITRE III: RÉSULTATS

1. Résultats de l'analyse de la micropuce Affymetrix

L'analyse des résultats obtenus à partir des puces Affymétrie hybridées avec l'ADNc de 6 rats WKY de 3 semaines nous a permis d'identifier 108 gènes dont l'expression est modifiée de façon significative en présence de phytoestrogènes : 70 gènes dont l'expression est diminuée (tableau III) et 37 gènes dont l'expression est augmentée (tableau IV). Une analyse plus approfondie nous a permis de diviser certains de ces gènes en 3 principaux groupes, soient les gènes circadiens et leurs cibles, les gènes reliés au cycle cellulaire et les gènes reliés à la kinésine et au cytosquelette.

Tableau III : Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrie présentant les gènes dont l'expression est significativement diminuée en présence de phytoestrogènes.

Systématique	FC	P-value	Genbank	Common	Description
1370510_a_at	0,28	0,0367	AB012600	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (=BMAL1)
1376831_at	0,37	0,0483	AI712694	---	---
1387391_at	0,37	0,0227	U24174	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
1374775_at	0,38	0,0164	AI714002	---	Similar to Ki-67 (LOC291234)
1372516_at	0,40	0,0123	AI317842	---	Similar to kinesin family member 22
1389566_at	0,40	0,0268	AW253821	---	Similar to cyclin B2 (LOC309558)
1392899_at	0,41	0,0357	BI284262	---	Similar to Protein regulator of cytokinesis 1 (LOC308761)
1392939_at	0,41	0,0215	BM388933	---	---
1383439_at	0,42	0,0385	BI278550	---	---
1367776_at	0,42	0,0218	NM_019296	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
1379582_a_at	0,42	0,0271	AA998516	Ccna2	cyclin A2
1388674_at	0,43	0,0215	AI010427	---	---
1372685_at	0,45	0,0352			
1390891_at	0,46	0,0122	BE116384	---	---
1378423_at	0,47	0,0225	AI639060	---	---
1389756_at	0,48	0,0235	BM390710	---	Similar to protein kinase PK38 (LOC362510)
1373658_at	0,48	0,0235	AI409259	---	---
1368637_at	0,48	0,0279	NM_022303	LOC64171	caspase recruitment domain protein 9
1388340_at	0,48	0,0461	BF281153	Ns5atp9	Ns5atp9 protein
1391063_at	0,49	0,0352	BE113443	---	---
1392732_at	0,52	0,0367	AI711233	---	Similar to nucleolar protein ANKT (LOC311336)
1367780_at	0,53	0,0397	NM_022391	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1
1372903_at	0,53	0,0492	AI410054	---	Similar to 3000004C01Rik protein (LOC303575)
1373722_at	0,54	0,0299	BE111697	---	Similar to rabkinesin-6 (LOC361308)
1384068_at	0,54	0,0339	BI295150		Similar to cytoskeleton associated protein 2

1393848_at	0,54	0,046	AA957260	---	Similar to M2 ribonucleotide reductase (LOC304657)
1392950_at	0,55	0,0396	BF552973	---	Similar to myotilin (LOC291605)
1384280_at	0,56	0,0268	AA964152	---	---
1370847_at	0,57	0,0285	AA801238	LOC171569	F-spondin
1382493_at	0,57	0,0339	BG377427	---	---
1370269_at	0,58	0,0299	X00469	Cyp1a1	cytochrome P450
1368260_at	0,59	0,0136	NM_053749	Aurkb	aurora kinase B
1383940_at	0,60	0,0352	BG375704	---	Similar to NUF2R protein (LOC304951)
1385086_at	0,60	0,0483	BF388785	---	Similar to Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (LOC296137)
1390137_at	0,60	0,043	BM388478	---	Similar to TRAF4 associated factor 1 homolog (LOC311325)
1380129_at	0,60	0,00773	AA818937	---	---
1370345_at	0,61	0,0459	L11995	Ccnb1	cyclin B1
1372665_at	0,61	0,0122	AI230228	---	---
1373026_at	0,61	0,0326	BI303598	---	Similar to RIKEN cDNA 2410030K01 (LOC363028)
1376185_at	0,61	0,0339	AW253880	Kifc1	kinesin family member C1
1376736_at	0,61	0,0123	BG375419	---	---
1384762_at	0,61	0,0217	BE103873	---	---
1372681_at	0,62	0,0367	BI294716	---	Similar to amisyn (LOC362734)
1368603_at	0,62	0,046	NM_012491	Add2	adducin 2 (beta)
1385619_at	0,62	0,0417	BF562797	Knsl1	kinesin-like 1
1376645_at	0,63	0,0164	AW916327	---	---
1371078_at	0,64	0,0123	AI500830	RT1-Aw2	RT1 class Ib
1371209_at	0,64	0,0367	AJ243338	RT1-CE5	RT1 class I
1373897_at	0,64	0,0123	AI103106	---	---
1387124_at	0,64	0,0386	NM_012590	Inha	inhibin alpha
1397341_at	0,65	0,0298	BG663837	---	---
1386857_at	0,65	0,0279	NM_017166	Stmn1	stathmin 1
1370346_at	0,65	0,0164	X64589	Ccnb1	cyclin B1
1388901_at	0,66	0,0327	AW534837	---	---
1391317_at	0,66	0,0367	BE109802	---	Similar to RIKEN cDNA 2810433K01 (LOC291441)
1379416_at	0,66	0,0227	AW535897	---	---
1379479_at	0,66	0,0478	AA859926	Kif4	kinesin heavy chain member 4
1374893_at	0,68	0,0268	BG380384	---	---
1380098_at	0,68	0,0271	AW535324	---	---
1395765_at	0,68	0,0327	BF546899	---	Similar to RIKEN cDNA 6330406I15 (LOC360757)
1370054_at	0,68	0,0339	NM_131902	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)
1380611_at	0,68	0,0122	BI284255	---	Similar to FKBP51 (LOC361810)
1370177_at	0,68	0,0367	AI548856	PVR	poliovirus receptor
1395844_at	0,69	0,0235	BF284064	---	---
1396205_at	0,69	0,0492	BI303419	---	---
1390405_at	0,69	0,0227	AA942765	---	---
1395697_at	0,69	0,0217	BF561171	---	Similar to mEnx-1 (LOC312299)
1376599_at	0,70	0,0463	AW915567	---	---
1378296_at	0,70	0,0367	AI012651	---	Similar to RIKEN cDNA A730011O11 (LOC296125)
1393451_at	0,71	0,0122	BI295149	---	---

Les résultats de ce tableau correspondent aux différences significatives d'expression obtenues lors de l'analyse par micropuces Affymétrie. Les paramètres employés lors de l'analyse sont un « fold change » (FC) PE-/PE+ $\geq 1,4$ (correspondant à un FC PE+/PE- $< 0,71$) ainsi que $p < 0,05$.

Tableau IV : Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrieux présentant les gènes dont l'expression est significativement augmentée en présence de phytoestrogènes.

Systématique	FC	P-value	Genbank	Common	Description
1379724_at	1,40	0,0227	BE103244	---	---
1388587_at	1,41	0,0497	AI176519	Ler3	immediate early response 3
1374531_at	1,41	0,0235	AA926305	---	---
1382809_at	1,41	0,0341	AW921084	Cirbp	cold inducible RNA binding protein
1392477_at	1,41	0,0227	AI059914	---	Similar to Ets transcription factor (LOC362733)
1391489_at	1,42	0,0459	AI407339	---	Similar to LRG-47 (LOC303090)
1374626_at	1,42	0,0432	BG371585	---	Similar to leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LOC367455)
1386873_at	1,43	0,0164	NM_017184	Tnni1	Troponin I
1369633_at	1,43	0,0113	AI171777	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
1372000_at	1,44	0,0273	AI180187	---	---
1383448_at	1,44	0,0459	AI029121	---	Similar to interferon stimulated gene factor 3 gamma (LOC305896)
1389908_at	1,44	0,0318	BE107167	---	---
1398942_at	1,45	0,0339	BI278885	---	---
1373911_at	1,48	0,0453	BM389026	---	Similar to osteoblast specific factor 2 precursor (LOC361945)
1392557_at	1,48	0,0386	BF389151	---	---
1378094_at	1,49	0,00825	BM389654	---	---
1370708_a_at	1,49	0,0216	M61937	LOC191574	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase
1388880_at	1,50	0,0327	BI278962	---	---
1386641_at	1,51	0,0461	BF546770	---	---
1367741_at	1,52	0,0164	NM_053523	Herpud1	homocysteine-inducible
1368511_at	1,52	0,0386	NM_133303	Bhlhb3	basic helix-loop-helix domain containing (dec)
1388525_at	1,53	0,0164	BE112999	---	---
1387116_at	1,54	0,0227	NM_012699	Dnajb9	DnaJ (Hsp40) homolog
1389783_s_at	1,56	0,0448	BI280865	---	Similar to Fc fragment of IgG binding protein
1381811_at	1,57	0,0271	BM385405	---	---
1389554_at	1,58	0,0217	AA956784	---	---
1387669_a_at	1,63	0,0299	NM_012844	Ephx1	epoxide hydrolase 1
1372752_at	1,63	0,0123	BF282632	---	Similar to transmembrane 4 superfamily member 7
1390024_at	1,65	0,0164	AI237685	---	---
1371298_at	1,66	0,0285	BF284168	H19	H19 fetal liver mRNA
1368865_at	1,66	0,0461	BG666364	Synpr	synaptoporin
1370541_at	1,80	0,0282	U20796	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1
1390430_at	1,89	0,0271	BF284190	---	---
1389632_at	1,90	0,0227	AA799294	---	---
1390819_at	2,18	0,0123	BF419374	---	---
1369919_at	2,52	0,00825	NM_019194	Tef	thyrotroph embryonic factor
1387874_at	2,89	0,0164	AI230048	Dbp	D site albumin promoter binding protein
1368303_at	3,36	0,00825	NM_031678	Per2	period homolog 2 (Drosophila)

Les résultats de ce tableau correspondent aux différences significatives d'expression obtenues lors de l'analyse par micropuces Affymétrieux. Les paramètres employés lors de l'analyse sont un « fold change » (FC) PE+/PE- $\geq 1,4$ ainsi que $p < 0,05$.

Tableau V : Tableau des principaux groupes de gènes isolés à partir de l'analyse des résultats des micropuces Affymétrie.

Systématique	FC	P-value	Genbank	Commun	DESCRIPTION
GÈNES DONT L'EXPRESSION EST DIMINUÉE EN PRÉSENCE DE PHYTOESTROGÈNES					
<i>GÈNE CIRCADIEN</i>					
1370510_a_at	0,21	0,0367	AB012600	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (=BMAL1)
<i>GÈNES RELIÉS AU CYCLE CELLULAIRE</i>					
1387391_at	0,18	0,0227	U24174	Cdkn1a	CDKI 1A (p21)
1367776_at	0,42	0,0218	NM_019296	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
1379582_a_at	0,42	0,0271	AA998516	Ccna2	cycline A2
1370346_at	0,65	0,0164	X64589	Ccnb1	cycline B1
1370345_at	0,61	0,0459	L11995	Ccnb1	cycline B1
1370054_at	0,68	0,0339	NM_131902	Cdkn2c	CDKI 2C (p18)
<i>GÈNES RELIÉS À LA KINÉSINE ET AU CYTOSQUELETTE</i>					
1376185_at	0,61	0,0339	AW253880	Kifc1	kinesin family member C1
1385619_at	0,62	0,0417	BF562797	Knsl1	kinesin-like 1
1379479_at	0,66	0,0478	AA859926	Kif4	kinesin heavy chain member 4
1368260_at	0,59	0,0136	NM_053749	Aurkb	aurora kinase B
1368603_at	0,62	0,046	NM_012491	Add2	adducin 2 (beta)
1386857_at	0,65	0,0279	NM_017166	Stmn1	stathmin 1
GÈNES DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTÉE EN PRÉSENCE DE PHYTOESTROGÈNES					
<i>GÈNES CIRCADIENS ET LEURS CIBLES</i>					
1368511_at	1,52	0,0386	NM_133303	Bhlhb3	basic helix-loop-helix domain containing (dec)
1369919_at	2,52	0,00825	NM_019194	Tef	thyrotroph embryonic factor
1387874_at	2,89	0,0164	AI230048	Dbp	D site albumin promoter binding protein
1368303_at	3,36	0,00825	NM_031678	Per2	period homolog 2 (Drosophila)

On note ainsi que le gène le plus réprimé par les phytoestrogènes est Bmal1, alors que les gènes Dec, Tef, Dbp et Per2 sont parmi ceux dont l'expression est la plus stimulée par l'ingestion de phytoestrogènes. Tous ces gènes appartiennent soit à la machinerie de l'horloge circadienne, ou sont des gènes cibles connus pour être régulés par ces derniers. Deux autres classes de gènes soient : les gènes du cycle cellulaire et les gènes reliés à la kinésine et au cytosquelette comprennent plusieurs membres dont l'expression est réprimée en présence de phytoestrogènes.

Pour nos expériences de validation subséquentes, nous avons concentré nos efforts sur les gènes appartenant aux deux premières classes. La première classe (gènes

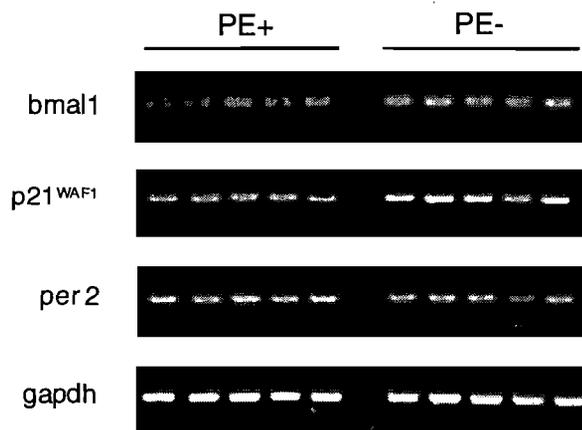
circadiens) fut sélectionnée en raison des plus fortes différences d'expression et de l'implication possible de ces gènes dans la régulation circadienne du système vasculaire. La deuxième classe (gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire) fut choisie en raison du grand nombre de gènes régulés à la baisse en présence de phytoestrogènes et de la littérature décrivant leur implication possible dans l'HVG. En particulier, nous avons focalisé sur p21, car p21 est connu pour : 1) être impliqué dans l'HVG et 2) connu pour avoir une expression régulée par la méthylation.

Nous avons également été intéressés à investiguer ce qu'il advenait de l'expression du gène *ERR α* qui est également un gène cible du cycle circadien au même titre que *Dbp* et *Tef*. Toutefois, *ERR α* n'était pas ressorti de notre analyse par micropuces parce que les niveaux étaient trop faibles pour être détectés. De plus, il est connu que *ERR α* est un récepteur potentiel des phytoestrogènes.

2. Validation des résultats obtenus par l'analyse des puces Affymétrie

Lors de l'analyse des résultats des micropuces, nous avons utilisé un « false discovery rate » de 0,05 suggérant qu'un résultat sur 20 pourrait être un faux positif. Nous avons donc voulu confirmer les résultats obtenus par une autre technique d'analyse de l'expression génique soit la PCR semi-quantitative. Nous avons vérifié à l'aide de cette technique 3 des gènes (*Bmal1*, *p21*, *per2*) pour lesquels les micropuces montraient une modification de l'expression. Pour chacun des deux groupes, trois des échantillons utilisés étaient les mêmes que ceux employés pour les expérimentations de micropuces et les deux autres échantillons provenaient d'animaux de la même portée que les animaux employés pour les micropuces.

Figure 4 : Validation par PCR semi-quantitative des résultats obtenus par les micropuces Affymétrie.



Le gène *gapdh* nous a servi de contrôle d'expression. Tous les résultats obtenus à partir de cette image ont été normalisés par *gapdh* avant que les analyses subséquentes de ces résultats soient effectuées.

Tableau VI : Comparaison entre les deux techniques utilisées des ratios PE+/PE- obtenus.

	Micropuces Affymétrie			RT-PCR semi-quantitative		
	Moyenne PE+	Moyenne PE-	Ratio PE+/PE-	Moyenne PE+	Moyenne PE-	Ratio PE+/PE-
Bmal1	149,355 ± 13,463	700,862 ± 135,592	0,213	0,143 ± 0,016	0,265 ± 0,021	0,540
p21	169,017 ± 125,0161	962,356 ± 378,907	0,176	0,334 ± 0,024	0,468 ± 0,050	0,714
Per2	1318,868 ± 98,166	393,033 ± 98,425	3,36	0,357 ± 0,028	0,265 ± 0,041	1,347

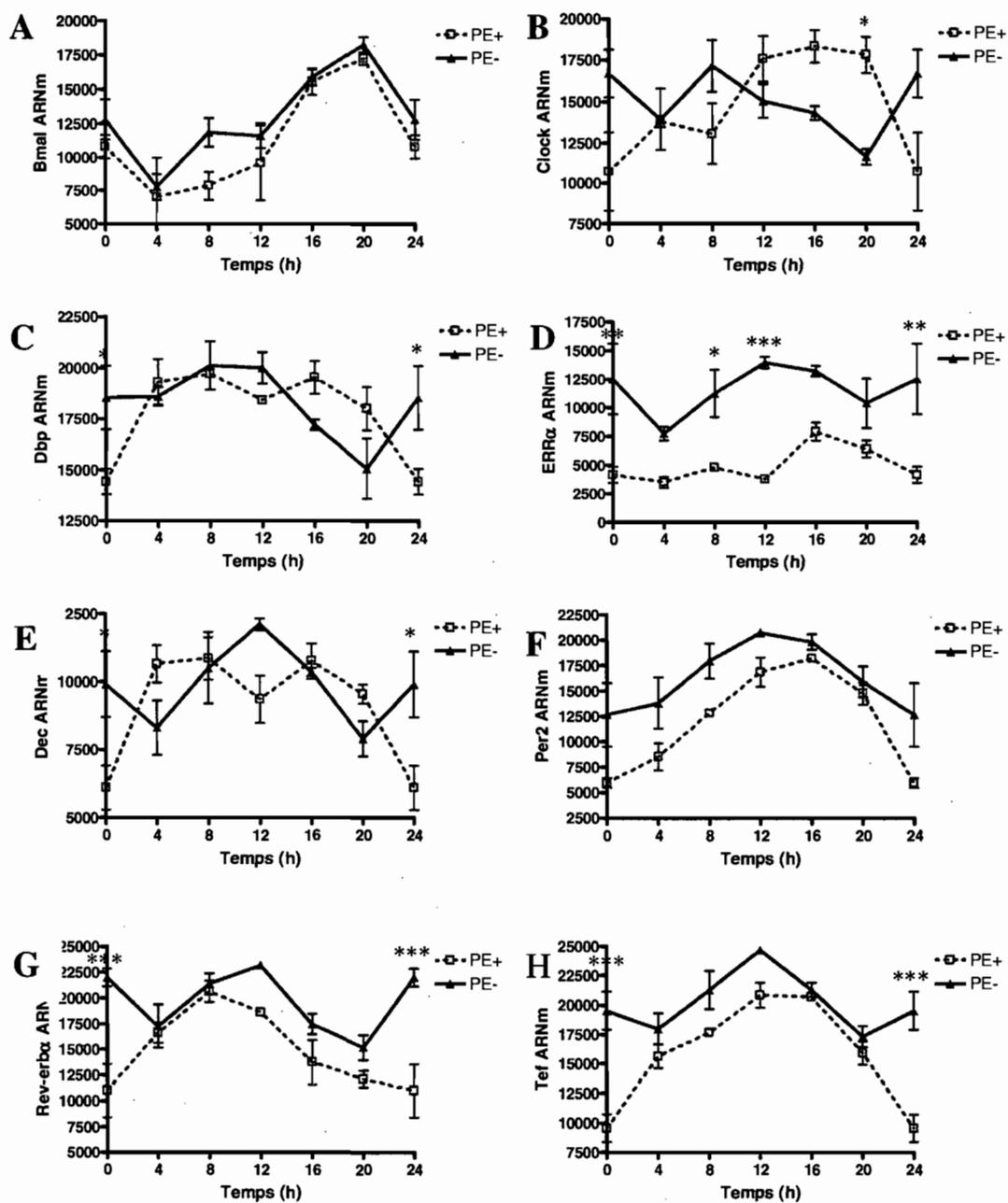
Les résultats qu'on retrouve dans la section RT-PCR semi-quantitative sont obtenus à partir des valeurs normalisées par le contrôle d'expression *gapdh*. Les valeurs de ce tableau sont exprimées en moyenne ± S.E.M.

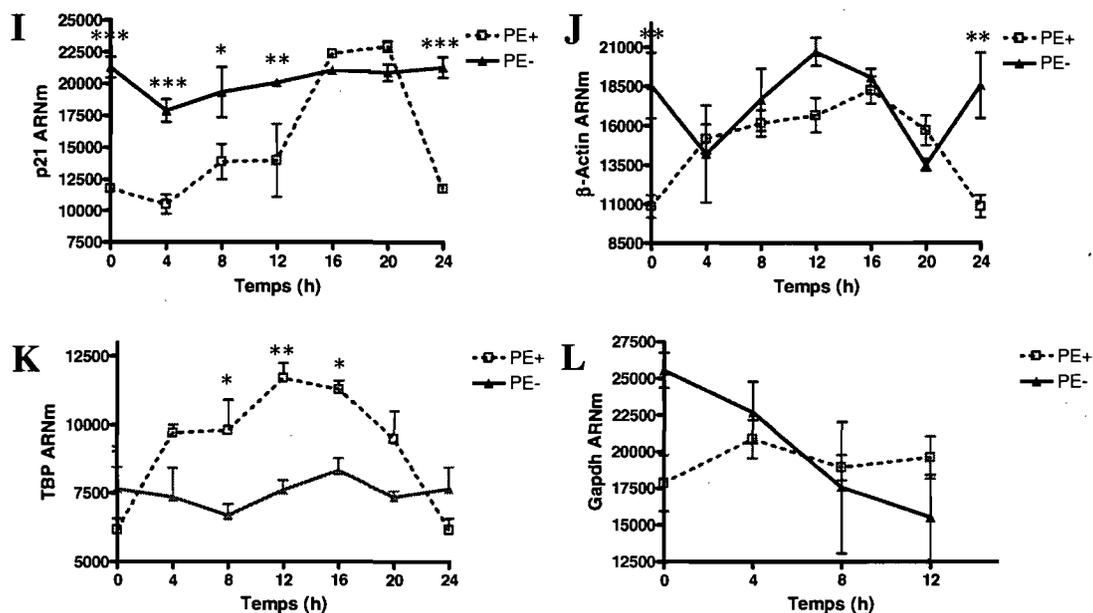
Les résultats que nous avons obtenus vont dans le même sens que les changements observés précédemment. Toutefois, les ratios PE+/PE- obtenus ne sont pas les mêmes à l'aide des deux techniques et les différences sont parfois assez importantes (Tableau VI).

3. Comparaison de l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles selon la diète PE+ et PE-

Étant donné que les gènes circadiens étaient ceux qui montraient les différences d'expression les plus importantes entre les deux types d'alimentation, nous avons voulu savoir si l'ingestion de phytoestrogènes modifie le profil d'expression des gènes circadiens et de leurs cibles et ce, pour les 24 heures que dure l'oscillation circadienne. Nous avons fait nos expérimentations à partir de 18 rats de 3 semaines provenant de mères recevant tout au long de la gestation et de la lactation de la nourriture à base de soya (PE+) (9 animaux) ou de la nourriture à base de caséine (PE-) (9 animaux). La diète PE+ a été remplacée par une diète PE- sur au moins deux générations pour éviter tout transfert de ces composés de la mère aux petits. Les rats ont été nourris de lait maternel jusqu'au moment du sacrifice. Les rats ont été sacrifiés à différentes heures de la journée comme décrit précédemment. Ensuite, à partir de l'ADNc des VG des rats, nous avons observé, à l'aide de RT-PCR semi-quantitative, l'expression de plusieurs gènes circadiens et de leurs cibles (figure 5). Nous avons été intéressés à analyser l'expression de 3 gènes étant connus comme importants pour la régularisation de l'oscillation circadienne ou pour avoir une expression circadienne soit *clock*, *ERR α* et *reverb α* . Ces gènes n'ont pas démontré une différence significative d'expression entre les deux types d'alimentation lors de l'analyse des micropuces Affymétrie, bien que des sondes correspondant à ces gènes soient présentes sur les micropuces. Les résultats des RT-PCR n'ont pas été normalisés par un contrôle d'expression étant donné que tous les gènes fréquemment utilisés comme contrôle (*gapdh*, *TBP* et β -actine) présentaient également une oscillation circadienne (figure 5 j,k,l).

Figure 5 : Impact des phytoestrogènes sur l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles chez les ratons de 3 semaines.





Les résultats correspondent au niveau de transcription des différents gènes circadiens et leur cibles soient a) Bmal1 b) clock c) DBP d) ERR α e) dec f) per2 g) rev-erba h) tef i) p21 et de 3 gènes contrôles d'expression j) β -actine k) TBP et l) gapdh pour les deux différents groupes (diète à base de soya (PE+) ou de caséine (PE-)). Le temps 0h correspond à 6 :00 soit l'heure d'ouverture des lumières de l'animalerie et le temps 12h correspond à 18 :00 soit l'heure de fermeture des lumières. Les valeurs sont exprimées en moyenne (n = 3) \pm S.E.M.

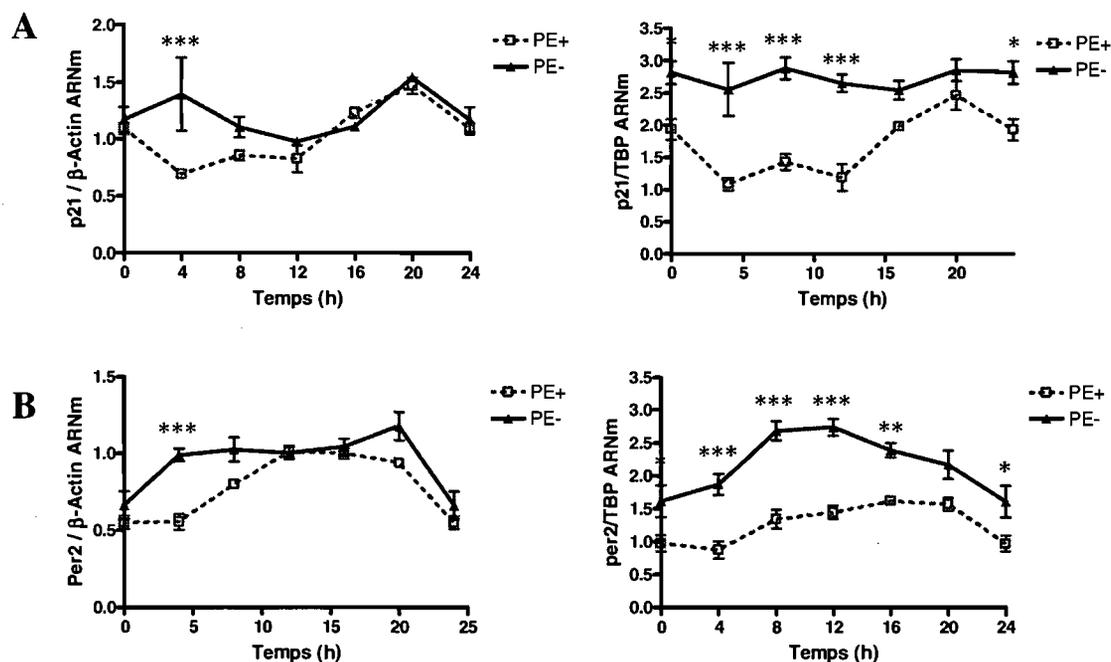
Tableau VII : Résultats d'une analyse par « two-way ANOVA » à partir des données de l'expression circadienne des différents gènes.

	Effet du temps sur l'expression génique (p-value)	Effet de l'alimentation sur l'expression génique (p-value)	Intéraction entre le temps et l'alimentation (p-value)
Bmal1	<0,0001 (S)	0,0622 (NS)	0,8981 (NS)
Clock	0,3242 (NS)	0,5964 (NS)	0,0008 (S)
Dbp	0,0005 (S)	0,5166 (NS)	0,0007 (S)
Dec	0,0046 (S)	0,1436 (NS)	0,0025 (S)
ERRα	0.0482 (S)	0.0065 (S)	0.1752 (NS)
p21	<0,0001 (S)	0,0013 (S)	<0,0001 (S)
per2	<0,0001 (S)	0,0265 (S)	0,3552 (NS)
reverbα	<0,0001 (S)	0,0102 (S)	0,0015 (S)
tef	<0,0001 (S)	0,0053 (S)	0,0001 (S)
β-actine	0,0074 (S)	0,0494 (S)	0,0052 (S)
TBP	<0,0001 (S)	0,0419 (S)	<0,0001 (S)

Dans ce tableau, les différences significatives (p<0,05) sont indiquées par (S) et les différences non significatives sont indiquées par (NS).

À l'exception du gène Clock, tous les gènes analysés ont une expression circadienne. De plus, les résultats obtenus démontrent que la composition de la diète modifie l'expression de la majorité des gènes circadiens et de leurs cibles. En effet, 5 (ERR α , p21, per2, reverba et tef) des 9 gènes analysés démontrent une expression significativement différente en présence de phytoestrogènes. On note que pour 3 des 4 gènes pour lesquels l'alimentation n'influence pas l'expression génique, on retrouve tout de même une interaction entre le temps et l'alimentation. On remarque également une oscillation circadienne au niveau de l'expression de gènes n'étant pas connus pour cycler (β -actine et TBP) et qui servent régulièrement de contrôle d'expression dans les études investiguant l'expression circadienne à l'aide de RT-PCR quantitative.

Figure 6 : Expression génique de p21 et per2 quantifiée par PCR semi-quantitative normalisée par β -actine et TBP.



Les résultats correspondent au niveau de transcription de deux gènes ayant une expression circadienne a) p21 et b) per2 normalisée par deux contrôles d'expression soient β -actine et TBP pour les deux différents groupes (diète à base de soya (PE+) ou de caséine (PE-)). Le temps 0h correspond à 6:00 soit l'heure d'ouverture des lumières de l'animalerie et le temps 12h correspond à 18:00 soit l'heure de fermeture des lumières. Les valeurs sont exprimées en moyenne ($n = 3$) \pm S.E.M.

Tableau VIII: Résultats d'une analyse par « two-way ANOVA » à partir des données normalisées par β -actine et TBP de l'expression circadienne de p21 et per2.

	Effet du temps sur l'expression génique (p-value)	Effet de l'alimentation sur l'expression génique (p-value)	Intéraction entre temps et alimentation (p-value)
p21/ β -actine	0.0003 (S)	0.058 (NS)	0.0282 (S)
p21/TBP	0.0038 (S)	0.0003 (S)	0.0359 (S)
per2/ β -actine	<0.0001 (S)	0.0157 (S)	0.0086 (S)
per2/TBP	<0.0001 (S)	0.0005 (S)	0.0765 (NS)

Les résultats qu'on retrouve à la figure 5 j,k,l démontrent que nos contrôles d'expression ne sont pas valides puisqu'ils ont également une expression circadienne. Tout dépendant du gène contrôle utilisé, on obtient des résultats différents (figure 6 et tableau VI). Ainsi, nos analyses subséquentes ont été faites à partir de données non normalisées.

Tableau IX : Comparaison des résultats obtenus par micropuces Affymétrie et RT-PCR semi-quantitatif sur l'impact des phytoestrogènes sur l'expression de différents gènes.

	Affymétrie	RT-PCR circadien
Expression en présence de PE		
Bmal1	↓	↔
Dbp	↑	↔
Dec	↑	↔
p21	↓	↓
per2	↑	↓
tef	↑	↔

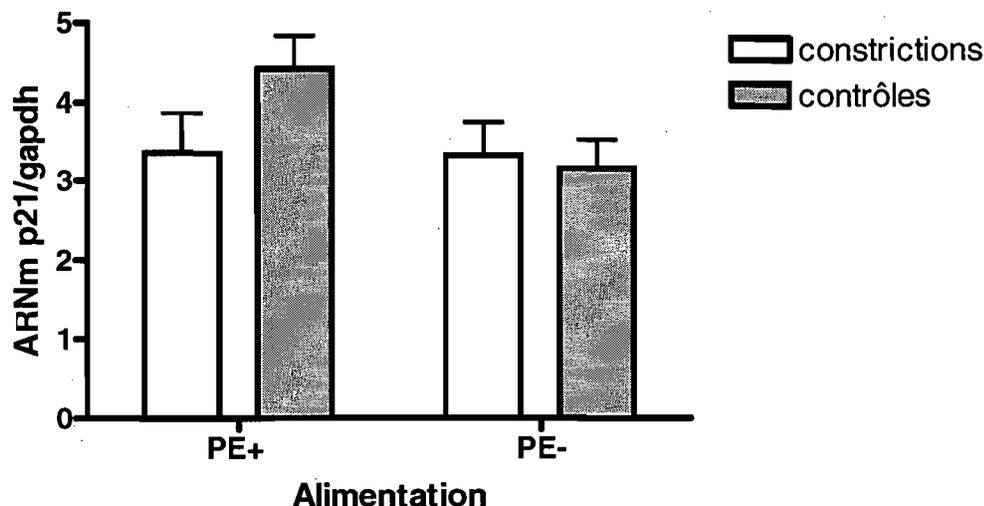
Les différences d'expression qu'on obtient avec la technique de RT-PCR semi-quantitative ne vont pas toujours dans le même sens que les résultats provenant de l'analyse des micropuces. Les micropuces indiquent une augmentation de l'expression de per2 en présence de phytoestrogènes. L'analyse de l'expression circadienne de per2 par RT-PCR nous indique une régulation à la baisse de l'expression de ce gène en présence de phytoestrogènes. Le gène p21 est le seul pour lequel les résultats des micropuces et du RT-PCR concordent. En effet, ces deux techniques démontrent une

diminution significative de l'expression de p21 en présence de phytoestrogènes. Pour ce qui est des gènes Bmal1, Dbp Dec et tef, aucune différence significative d'expression ne fut démontrée par RT-PCR semi-quantitative.

4. Effet de la constriction aortique sur l'expression de p21 chez des rats adultes dont la mère a reçu une diète PE+ ou PE-

Nous avons été intéressés à savoir si l'induction de l'HVG par constriction aortique entraîne un changement d'expression de p21 similaire chez les rats ingérant des phytoestrogènes par rapport à ceux qui n'en n'ingèrent pas. Nous avons donc fait une constriction aortique à des rats mâles de 12 semaines, 5 ayant reçu une diète PE+ et 5 ayant reçu une diète PE- comme décrit ci-dessus ainsi que le même nombre de contrôles dans chaque groupe. Les animaux ayant reçu une diète PE+ sont des rats dont la mère fut nourrie avec de la nourriture à base de soya durant la période de gestation et de lactation. Toutefois, par la suite, ces rats ont reçu une alimentation exempte de phytoestrogènes. Ce type d'alimentation fut utilisée précédemment dans le laboratoire et avait démontré des effets cardioprotecteurs chez les rats adultes. Une analyse par RT-PCR semi-quantitative nous a permis d'analyser l'expression de p21.

Figure 7 : Comparaison de l'expression de p21 entre les animaux ayant subi une constriction aortique et leurs contrôles selon le type de diète administrée (PE+ et PE-).



Les résultats correspondent au niveau de transcription du gène p21 normalisé par gapdh. L'alimentation PE+ correspond à une diète à base de soya que les animaux ont reçu durant la période de gestation et de lactation uniquement et l'alimentation PE- correspond à une diète à base de caséine. Tous les résultats présentés dans ce graphique ont des différences non significatives avec un $p > 0,05$.

Les résultats obtenus n'indiquent aucune différence significative au niveau de l'expression de p21 entre les animaux ayant subi une constriction aortique et leurs contrôles et ce, pour les deux types d'alimentation. De plus, on ne retrouve pas de différence significative d'expression de p21 entre les deux types d'alimentation pour ce qui est des contrôles et également chez les animaux ayant subi la constriction aortique.

5. Méthylation du promoteur du gène de p21

Nous avons analysé la méthylation de l'élément de réponse à p53, une séquence importante dans la régulation de l'expression de p21. Le traitement au bisulfite de sodium de l'ADN de 3 rats de 3 semaines pour chaque type d'alimentation (PE+ et PE-) et le séquençage subséquent de cet ADN traité nous a permis de constater aucun changement au niveau de la méthylation de l'élément de réponse à p53. Tous les sites de méthylation étaient identiques chez tous les animaux analysés.

Chapitre IV : Discussion

1. Résultats de l'analyse des micropuces Affymétrie

Les phytoestrogènes sont des composés connus pour avoir divers effets physiologiques. Plusieurs études ont démontré que ces molécules ont un impact sur plusieurs pathologies ou prédisposent à certaines maladies comme le cancer, l'ostéoporose, la dyslipidémie, l'athérosclérose, l'hypertension, les symptômes de la ménopause (137;158;224;229;230). Il fut récemment démontré que les phytoestrogènes avaient un effet antihypertrophique sur le cœur des rats (165;169) et qu'une exposition aux phytoestrogènes durant la période de gestation et de lactation protégeait les rats contre HVG à l'âge adulte (169). Nous nous sommes donc intéressés à éclaircir les mécanismes moléculaires sous-jacents à cet effet cardioprotecteur que procurent les phytoestrogènes. Pour ce faire, les rats utilisés (mâles et femelles WKY) ont reçu deux alimentations différentes : l'une dont la source de protéines est le soya qui contient des phytoestrogènes en grande quantité (PE+) et l'autre dont la source de protéines a été remplacée par la caséine et qui se trouve exempte de phytoestrogènes (PE-). Des rats de 3 semaines ont été employés lors de ces expérimentations étant donné que l'effet des phytoestrogènes semble être périnatal. Les animaux consommant la diète PE- ont reçu cette alimentation depuis au moins deux générations afin d'éviter toute transmission de phytoestrogènes de la mère à sa progéniture. Nous avons commencé notre investigation en faisant une analyse de l'expression génique à l'aide de micropuces Affymétrie, étant donné que cette technique nous permettait d'analyser l'expression de milliers de gènes simultanément. Ce type d'analyse nous a permis d'observer chez des rats WKY de 3 semaines les différences de transcriptome entre les deux types d'alimentation. Parmi les résultats obtenus, trois groupes de gènes sont ressortis : les gènes circadiens et leurs cibles, les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et les gènes reliés à la kinésine et au cytosquelette (tableau III).

1.1 Gènes circadiens

Pour ce qui est de l'analyse par micropuces Affymétrie des gènes circadiens et de leurs cibles, on note lors d'ingestion de phytoestrogènes, une diminution de l'expression d'un des principaux gènes impliqués dans le contrôle du cycle circadien soit, *Bmal1*. Par ailleurs, on remarque à l'aide de la technique Affymétrie une augmentation, en présence d'une alimentation PE+, de trois gènes contenant des « E-box » et dont l'expression est induite par l'hétérodimère *Bmal1-Clock*, soient *Per2*, *Tef* et *Dbp*. On remarque également une surexpression de la protéine à domaine basique hélice-boucle-hélice *dec* qui permet d'inhiber l'expression de *Per1* en liant son « E-box » (199). L'expression de *dec* est également induite par l'hétérodimère *Clock-Bmal1* (231). Ces résultats sont consistants avec la théorie connue du cycle circadien. En effet, il est bien établi que lorsque la concentration de *per2* augmente, cette protéine s'hétérodimérise avec la protéine *Cry* et que le dimère ainsi formé se transloque au noyau, inhibent la transcription de *Bmal* et *Clock* (194). Il est donc logique qu'on retrouve dans les résultats des micropuces une diminution de l'expression de *Bmal* conjointement à une augmentation de l'expression de *per2*. De plus, étant donné que l'expression des gènes *Tef*, *Dbp* et *dec* est induite au même moment que l'expression de *per2* (197;231), il n'est donc pas surprenant d'observer l'augmentation de l'expression de ces gènes dans les mêmes conditions que *per2*. Toutefois, ces différences d'expression entre les deux types d'alimentation (PE+ et PE-) ne sont que des observations et ne peuvent en rien expliquer directement l'impact de l'alimentation sur la physiologie et la morphologie du cœur.

1.2 Gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire

Pour ce qui est des gènes reliés au cycle cellulaire, nous notons en présence de phytoestrogènes une diminution de l'expression de deux gènes dont la protéine inhibe le cycle cellulaire (*p21* et *p18*) et de trois gènes dont le produit permet de progresser dans le cycle cellulaire (*cycline A2*, *cycline B1* et *cdc2a*). Les résultats obtenus pour *p21* ont également été confirmés par l'analyse circadienne de l'expression de *p21* (figure 6i). Lors d'HVG induite par constriction aortique, la diminution de CDKIs permettrait aux

cardiomyocytes d'entrer dans le cycle cellulaire et d'induire leur hypertrophie. Étant donné que les phytoestrogènes protègent contre le développement de l'hypertrophie cardiaque, on se serait attendu à retrouver une augmentation de l'expression des CDKIs et une diminution des CDKs. Toutefois, seulement une diminution des CDKs a été observée. Par contre, on peut faire l'hypothèse que le niveau de CDKs pourrait être plus bas de façon constitutive chez les animaux consommant des phytoestrogènes. Ainsi le niveau de CDKIs serait plus bas chez les animaux recevant une alimentation PE+ en comparaison à l'alimentation PE- puisqu'une quantité moindre serait nécessaire à l'inhibition des CDKs.

2. Différences au niveau de l'expression des gènes circadiens et de leurs cibles selon la diète PE+ et PE-

Il est bien établi que plusieurs incidents cardiovasculaires: infarctus du myocarde, arythmie cardiaque, mort subite et AVC ont une incidence plus élevée le matin que le soir. De plus, tout au long des 24 heures que dure le cycle circadien, on retrouve des variations significatives de la TA, du rythme cardiaque, du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique (211). Ces observations démontrent que l'oscillation circadienne aurait un impact important sur la physiologie cardiovasculaire.

Étant donné que plusieurs gènes du cycle circadien ainsi que les gènes dont l'expression est contrôlée par des gènes circadiens sont ressortis dans notre analyse de micropuces Affymétrie, nous nous sommes demandés s'il existait une différence au niveau de l'expression de ces gènes entre les deux types d'alimentation (PE+ et PE-) et ce sur 24 heures. Pour ce faire, nous avons sacrifié, à différents temps de la journée, des rats WKY de 3 semaines ayant reçu soit une alimentation PE+ ou PE-. Nous avons ensuite analysé l'expression de ces gènes circadiens et de leurs cibles par RT-PCR semi-quantitative. Toutefois, on n'a pas retrouvé les mêmes différences d'expression pour les gènes *per2* au niveau de l'analyse faite par micropuces ou par PCR semi-quantitative de l'expression circadienne de ces gènes. En effet, à partir de l'analyse des micropuces, les résultats indiquaient une augmentation de l'expression de ces gènes en présence de

phytoestrogènes alors que le contraire a été observé pour la majorité des temps de l'analyse de l'expression circadienne de ces gènes par RT-PCR. Ces différences peuvent être rationalisées par différentes hypothèses. En effet, étant donné que nos résultats obtenus par RT-PCR n'ont pas pu être normalisés par un contrôle de chargement, un biais a pu ainsi être engendré et contribué à la divergence des résultats obtenus par les deux différentes techniques d'analyse de l'expression génique. De plus, nous savons que les rats sacrifiés pour effectuer l'analyse par micropuces ont été tués dans l'avant-midi entre 7 :00 et 11 :30, toutefois l'heure exacte n'est pas connue étant donné que le laboratoire ne s'intéressait pas aux gènes circadiens avant l'analyse des résultats des micropuces. On remarque qu'à certains temps de l'analyse par RT-PCR les différences entre les 2 groupes (PE+ et PE-) sont moins importantes entre autres durant les temps où les animaux ont pu être sacrifiés pour l'analyse par micropuces, soit entre 7 :00 et 11 :30. Ainsi, la normalisation de ces résultats aurait pu modifier de façon significative et même inverser le rapport de l'expression de PE+/PE-. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer cette divergence de résultats est que les animaux utilisés provenaient de la même portée pour l'analyse par micropuces ainsi que pour la validation des résultats par RT-PCR semi-quantitative (figure 5) pour laquelle on a obtenu des résultats convergents avec ceux obtenus par micropuces. Toutefois, les animaux employés pour l'analyse de l'expression circadienne des différents gènes provenaient de portées différentes de celle utilisée pour les micropuces et leur validation. Il est connu que le comportement de la mère (232) ainsi que la grosseur de la portée (233) peuvent influencer le cycle circadien chez ses rejetons. Ainsi, on a pu retrouver les mêmes différences au niveau de l'analyse par micropuces et sa validation par RT-PCR étant donné que les animaux provenaient de la même portée. Toutefois, l'utilisation de portées différentes pour l'analyse de l'expression circadienne par RT-PCR pourrait expliquer les différences des résultats obtenus par cette technique comparativement à la technique de micropuces.

On remarque toutefois que pour la majorité des gènes ayant une oscillation circadienne, on retrouve pour au moins un temps une différence significative entre les deux types d'alimentation (PE+ et PE-) pour ce qui est de l'expression de ces gènes. Ceci laisse supposer qu'au moins un composé contenu dans l'une des deux nourritures

modifie l'expression de ces gènes. Les phytoestrogènes sont possiblement responsables de cette modification de l'expression génique étant donné que ces composés ont la capacité d'activer les récepteurs ER α et ER β (130). Ces récepteurs ont été démontrés comme étant présents au niveau du NSC (215;216). De plus, il est connu que l'activation de ces récepteurs par les estrogènes module la relâche de neurotransmetteurs par le NSC et ainsi entraîne une modification de l'oscillation circadienne au niveau de la glande pinéale et peut ainsi altérer le cycle circadien périphérique donc possiblement au niveau du cœur (218). Il serait donc possible que les phytoestrogènes aient un effet similaire au niveau du NSC ce qui pourrait expliquer cette différence d'expression des gènes ayant une expression circadienne entre les deux types d'alimentation. La perturbation du cycle circadien pourrait entraîner des changements de l'expression de plusieurs gènes et ainsi entraîner une prédisposition à l'HVG.

Lors de l'analyse de l'expression circadienne des gènes, on remarque que le seul gène pour lequel on retrouve une importante différence d'expression à tous les temps entre les deux types d'alimentation est ERR α . Toutefois, ce gène n'était pas ressorti de notre analyse par micropuces parce que les niveaux étaient trop faibles pour être détectés. Nous étions intéressés à savoir ce qui en était de l'expression de ce gène qui était connu pour avoir une oscillation circadienne au niveau de plusieurs tissus (234). Par contre, l'expression circadienne d'ERR α n'était pas connue au niveau du cœur. De plus, ERR α est connu comme étant un récepteur possible des phytoestrogènes. L'analyse par RT-PCR semi-quantitative semble démontrer une oscillation circadienne de l'expression de ce gène au niveau des cœurs des rats WKY (figure 6d). Le récepteur qui est codé par ce gène a une activité constitutive qui est augmentée, comme le propose une étude, par son agoniste, les phytoestrogènes (235). Ce récepteur contrôle l'expression de plusieurs gènes dont la majorité ont un rôle au niveau du métabolisme énergétique (236;237). Il fut suggéré qu'ERR α pourrait jouer un rôle protecteur contre l'athérosclérose et ce, possiblement en contrôlant l'expression de eNOS et en stimulant la production de NO par les cellules endothéliales (238). Le promoteur d'ERR α contient plusieurs éléments de réponse aux hormones stéroïdiennes et il fut démontré chez la souris que les estrogènes stimulent l'expression d'ERR α (234). Toutefois, lors de la comparaison par RT-PCR de

l'expression selon les types d'alimentation (figure 6d), on retrouve une diminution de l'expression d'ERR α en présence de phytoestrogènes. Il serait donc possible que les phytoestrogènes aient un effet opposé à celui des estrogènes comme il fut précédemment observé dans d'autres circonstances (239;240).

3. Effet de la constriction aortique sur l'expression de p21 chez des rats recevant une diète PE+ ou PE-

Il fut démontré précédemment que l'induction d'une HVG par constriction aortique entraîne transitoirement une diminution des CDKIs et une augmentation des CDKs. Ceci permet aux cardiomyocytes d'entrer dans le cycle cellulaire et de progresser jusqu'à la phase G2 et ainsi entraîner une hypertrophie des cardiomyocytes (224). Nous avons donc été intéressés à savoir si l'induction de l'HVG par constriction aortique entraîne un changement d'expression de p21 similaire chez les rats ingérant des phytoestrogènes par rapport à ceux qui n'en n'ingèrent pas. De plus, des expérimentations ayant été menées antérieurement dans le laboratoire ont démontré que les rats dont la mère avait reçu une alimentation riche en phytoestrogènes durant la période de gestation et de lactation étaient protégés contre l'HVG à l'âge adulte (169). Notre expérimentation a donc été menée sur 2 groupes de rats mâles WKY adultes de 12 semaines. Le premier groupe était composé d'animaux ayant reçu une diète PE + durant leur période de gestation et de lactation. Toutefois, par la suite, ces rats ont reçu une alimentation exempte de phytoestrogènes. Le deuxième groupe était composé de rats ayant toujours reçu une alimentation PE-.

Premièrement, en observant les résultats obtenus (figure 7), on remarque qu'au niveau des contrôles (avec laparotomie mais sans constriction aortique) on retrouve une expression de p21 qui ne change pas de façon significative chez les animaux recevant une alimentation PE- par rapport à ceux recevant une alimentation PE+. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par l'analyse des micropuces et l'analyse de l'expression circadienne de p21. Toutefois, il est possible que cette différence soit due au fait que les animaux employés pour l'analyse par micropuces et leur validation

subséquente étaient des rats âgés de 3 semaines alors que les rats employés pour les expérimentations d'induction d'HVG par constriction aortique étaient des rats adultes de 12 semaines. Il serait donc possible que des différences d'expression entre les deux types d'alimentation qu'on retrouve à l'âge de 3 semaines ne soient pas maintenues à l'âge adulte. De plus, étant donné que les animaux du groupe PE+ ont reçu une alimentation riche en phytoestrogènes seulement lors de la période de gestation et de lactation, il est possible que cela ne suffise pas à maintenir à l'âge adulte le même profil d'expression qu'à 3 semaines.

Deuxièmement, pour les animaux ayant une alimentation riche en phytoestrogènes, les résultats obtenus n'ont révélé aucun changement significatif de l'expression de p21 lors de la constriction aortique en comparaison aux contrôles. Ces résultats ne coïncident pas avec la littérature, puisque l'étude précédente indique qu'on retrouve une diminution de l'expression de p21 lors de la constriction aortique a été effectuée à partir de rats recevant une alimentation standard, donc riche en phytoestrogènes (225). Toutefois, notre expérimentation diverge de l'expérimentation effectuée antérieurement puisque la nourriture PE+ n'a été administrée que lors de la période de gestation et de lactation. Cette différence pourrait expliquer la divergence obtenue entre nos résultats et les données de la littérature. Pour les animaux ayant une alimentation pauvre en phytoestrogènes, on ne remarque pas non plus de différence significative au niveau de l'expression de p21 entre les animaux ayant subi une constriction aortique et leurs contrôles. Quelque soit le type de régime alimentaire, nous n'avons donc pas pu reproduire le résultat précédemment rapporté concernant l'effet de la constriction aortique sur l'expression cardiaque de p21.

4. Analyse de la méthylation du promoteur de p21

La méthylation du promoteur est un changement épigénétique, ce qui signifie qu'on retrouve un changement au niveau de l'expression génique sans modification de la séquence primaire d'ADN (241). La méthylation est une modification qui ajoute un groupement méthyl sur une cytosine. La réaction utilise le S-adénosyl-méthionine comme

donneur de méthyle et est catalysée par l'ADN méthyltransférase (DNMT) (242). Il existe 2 types de DNMT : celles qui agissent *de novo* et celles impliquées dans la maintenance des sites de méthylation (243). La déméthylation est possible et semble se produire de manière passive ou active (244). Ces mécanismes ne sont toutefois pas bien compris. Chez les mammifères, la méthylation a lieu seulement au niveau des cytosines qui précèdent une guanine dans la séquence d'ADN (dinucléotides CpG). Ces dinucléotides sont parfois regroupés en petit groupe et forment des îlots CpG (245). On retrouve peu ou pas de méthylation au niveau des organismes simples comme la drosophile ou la levure. Chez les mammifères, la méthylation dans la région du promoteur a lieu au niveau de gènes silencieux (246). Ce mécanisme empêche la transcription de gène dont l'activité n'est pas requise dans un type cellulaire donné (246). Environ la moitié de nos gènes contiennent des régions riches en CpGs dans leur promoteur. La majorité des CpGs méthylés se retrouvent dans les éléments répétitifs incluant les répétitions centromériques, les séquences satellites et les gènes répétitifs qui codent pour les ARNs ribosomiaux (247).

La méthylation de l'ADN entraîne la liaison d'une famille de protéines connue sous le nom de protéines à domaine de liaison des méthyles (MBD protein). Cette famille est composée de 5 protéines qui possèdent la capacité de lier les sites CpGs méthylés. Il fut démontré que 3 membres de cette famille, soit MeCP2, MBD2, MBD3, s'associent à un complexe de protéines contenant des histones déacétylases et des protéines entraînant le remodelage de la chromatine. Donc, les protéines MBD conjointement avec d'autres protéines ayant une activité de remodelage de la chromatine produiraient une chromatine compactée réfractaire à la transcription (248;249).

Nous nous sommes demandés si la différence d'expression de p21 chez les rats provenant de mères nourries avec une nourriture riche en phytoestrogènes était due à une différence de méthylation au niveau du promoteur de p21. En effet, il fut démontré que l'expression de p21 est modulée par la méthylation de son promoteur (250). Il est également connu que les phytoestrogènes altéraient le profil de méthylation de certains gènes (251-254). L'élément de réponse à p53 contenu dans le promoteur du gène de p21

est un site important de régulation de l'expression de ce gène (255). Nous avons donc commencé notre investigation par l'analyse de la méthylation de cette séquence. La comparaison de la méthylation de cette séquence chez 3 rats de 3 semaines dans chacun des groupes (alimentation PE+ et PE-) ne nous a permis de trouver aucune différence de méthylation au niveau de l'élément de réponse à p53 dans le promoteur de p21. Il est toutefois possible que les différences d'expression de p21 entre les deux types d'alimentation soient dues à la méthylation différentielle d'une autre séquence du promoteur de p21. Il serait également possible que les deux types d'alimentation induisent une expression différentielle de molécules modulant l'expression de p21. Donc, plusieurs pistes restent à être investiguées afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux différences d'expression de p21 entre les deux types d'alimentation.

5. Limitations

Les observations faites à partir de nos expérimentations nous ont permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression est modifiée en présence de phytoestrogènes. Toutefois, à partir de nos expérimentations, il nous est impossible d'affirmer que ces gènes sont responsables de l'effet cardioprotecteur des phytoestrogènes. Les observations faites nous permettent simplement de nous orienter vers des pistes intéressantes d'investigation afin de démystifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'effet cardioprotecteur des phytoestrogènes. Donc, plusieurs expérimentations seront requises afin de vérifier si les gènes circadiens et leurs cibles ainsi que les gènes régulateurs du cycle cellulaire sont effectivement impliqués dans le mécanisme moléculaire qui procure les effets bénéfiques des phytoestrogènes.

6. Expérimentations futures

Il serait intéressant de faire une analyse par RT-PCR quantitative de l'expression circadienne des différents gènes puisque cette technique est beaucoup plus précise que la RT-PCR semi-quantitative. Cette technique n'a pas été employée lors de nos

expérimentations antérieures étant donné qu'on désirait, pour commencer, avoir une idée générale du potentiel de cette voie d'investigation.

De plus, les expérimentations sur l'expression de p21 lors d'HVG induite par constriction aortique pourraient être répétées, mais cette fois en utilisant des rats de 12 semaines ayant reçu une alimentation riche en phytoestrogènes tout au long de leur vie plutôt que seulement lors de la période de gestation et de lactation. Ainsi, on pourrait possiblement retrouver un profil d'expression de p21 différent entre les deux types d'alimentation.

Le récepteur nucléaire orphelin $ERR\alpha$ a suscité notre intérêt puisqu'on note une diminution marquée de l'expression ce gène en présence de phytoestrogènes et que les phytoestrogènes sont un agoniste de ces récepteurs. Il serait intéressant pour commencer de vérifier si le type de diète a un impact sur l'activité d' $ERR\alpha$. En effet, on remarque une diminution de l'expression de l'ARNm du gène codant pour $ERR\alpha$ lors de l'ingestion de phytoestrogènes, toutefois cette diminution ne signifie pas que l'activité du récepteur est moindre en présence de phytoestrogènes. Il serait également possible de faire des études *in vitro* afin d'explorer l'effet qu'entraîne une surexpression de ce récepteur nucléaire au niveau des cardiomyocytes et ce, en présence de différentes concentration de phytoestrogènes.

Conclusion

Une alimentation riche en phytoestrogènes entraîne une modification de l'expression génique cardiaque. Nous avons identifié 3 groupes de gènes possédant d'importants changements au niveau de leur expression : des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, des gènes ayant une expression circadienne ainsi que des gènes reliés à la kinésine et au cytosquelette. Nous avons démontré qu'une alimentation riche en phytoestrogènes modifiait le profil d'expression circadienne des gènes *ERR α* , *p21*, *per2*, *reverba*, *tef*, β -actine et *TBP*. Étant donné que certains de ces gènes sont connus comme étant importants au niveau cardiovasculaire, la modification de l'expression de certains de ces gènes pourrait faire partie du mécanisme moléculaire sous-jacent à l'effet cardioprotecteur des phytoestrogènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Devereux RB, de Simone G, Ganau A, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J Hypertens Suppl* 1994;12:S117-S127.
2. de Simone G, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, Maggioni AP. Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study. *Hypertension* 2002;40:470-6.
3. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-6.
4. Muiesan ML, Salvetti M, Rizzoni D, Castellano M, Donato F, Agabiti-Rosei E. Association of change in left ventricular mass with prognosis during long-term antihypertensive treatment. *J Hypertens* 1995;13:1091-5.
5. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* 1998;97:48-54.
6. Barbier J, Lebillier E, Ville N, Rannou-Bekono F, Carre F. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006;13:115-21.
7. Vargo DL, Kramer WG, Black PK, Smith WB, Serpas T, Brater DC. Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide and furosemide in patients with congestive heart failure. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:601-9.
8. Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* 1993;55:77-95.
9. Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1993;55:55-75.
10. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997;59:551-71.
11. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975;56:56-64.
12. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail* 2002;8:S264-S268.

13. Poliac LC, Barron ME, Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Anesthesiology* 2006;104:183-92.
14. Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 2003;24:883-96.
15. Palta S, Gill KS, Pai RG. Role of inadequate adaptive left ventricular hypertrophy in the genesis of mitral regurgitation in patients with severe aortic stenosis: implications for its prevention. *J Heart Valve Dis* 2003;12:601-4.
16. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation* 2003;108:560-5.
17. Patel MB, Stewart JM, Loud AV, Anversa P, Wang J, Fiegel L, Hintze TH. Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine. *Circulation* 1991;84:2091-100.
18. Kelm M, Schafer S, Mingers S, Heydthausen M, Vogt M, Motz W, Strauer BE. Left ventricular mass is linked to cardiac noradrenaline in normotensive and hypertensive patients. *J Hypertens* 1996;14:1357-64.
19. Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest* 1983;72:732-8.
20. Schmieder RE, Langenfeld MR, Friedrich A, Schobel HP, Gatzka CD, Weihprecht H. Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation* 1996;94:1304-9.
21. Mukawa H, Toki Y, Miyazaki Y, Matsui H, Okumura K, Ito T. Angiotensin II type 2 receptor blockade partially negates antihypertrophic effects of type 1 receptor blockade on pressure-overload rat cardiac hypertrophy. *Hypertens Res* 2003;26:89-95.
22. Brede M, Roell W, Ritter O, Wiesmann F, Jahns R, Haase A et al. Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. *Hypertension* 2003;42:1177-82.
23. Gross V, Obst M, Kiss E, Janke J, Mazak I, Shagdarsuren E et al. Cardiac hypertrophy and fibrosis in chronic L-NAME-treated AT2 receptor-deficient mice. *J Hypertens* 2004;22:997-1005.
24. Oishi Y, Ozono R, Yano Y, Teranishi Y, Akishita M, Horiuchi M et al. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension* 2003;41:814-8.

25. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Lorell BH. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation* 1999;99:22-5.
26. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension* 2005;46:1347-54.
27. Yan X, Price RL, Nakayama M, Ito K, Schuldt AJ, Manning WJ et al. Ventricular-specific expression of angiotensin II type 2 receptors causes dilated cardiomyopathy and heart failure in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2179-H2187.
28. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 2000;106:R25-R29.
29. Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez BD. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. *Circulation* 1988;78:951-6.
30. Daniels SD, Meyer RA, Loggie JM. Determinants of cardiac involvement in children and adolescents with essential hypertension. *Circulation* 1990;82:1243-8.
31. Schlaich MP, Schobel HP, Langenfeld MR, Hilgers K, Schmieder RE. Inadequate suppression of angiotensin II modulates left ventricular structure in humans. *Clin Nephrol* 1998;49:153-9.
32. Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 1998;98:2621-8.
33. Nunez DJ, Clifford CP, al-Mahdawi S, Dutka D. Hypertensive cardiac hypertrophy--is genetic variance the missing link? *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:107-17.
34. Devereux RB, Roman MJ, de SG, O'Grady MJ, Paranicas M, Yeh JL et al. Relations of left ventricular mass to demographic and hemodynamic variables in American Indians: the Strong Heart Study. *Circulation* 1997;96:1416-23.
35. Sharma P, Middelberg RP, Andrew T, Johnson MR, Christley H, Brown MJ. Heritability of left ventricular mass in a large cohort of twins. *J Hypertens* 2006;24:321-4.
36. Mayosi BM, Keavney B, Kardos A, Davies CH, Ratcliffe PJ, Farrall M, Watkins H. Electrocardiographic measures of left ventricular hypertrophy show greater heritability than echocardiographic left ventricular mass. *Eur Heart J* 2002;23:1963-71.

37. Bella JN, MacCluer JW, Roman MJ, Almasy L, North KE, Best LG et al. Heritability of left ventricular dimensions and mass in American Indians: The Strong Heart Study. *J Hypertens* 2004;22:281-6.
38. Post WS, Larson MG, Myers RH, Galderisi M, Levy D. Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 1997;30:1025-8.
39. Swan L, Birnie DH, Padmanabhan S, Inglis G, Connell JM, Hillis WS. The genetic determination of left ventricular mass in healthy adults. *Eur Heart J* 2003;24:577-82.
40. Llamas B, Deschepper CF. Identification and validation of Loci and candidate genes linked to cardiac hypertrophy. *Methods Mol Med* 2005;112:321-37.
41. Arnett DK, de las FL, Broeckel U. Genes for left ventricular hypertrophy. *Curr Hypertens Rep* 2004;6:36-41.
42. Leibowitz D, Dresner-Pollak R, Dvir S, Rokach A, Reznik L, Pollak A. Association of an estrogen receptor-alpha gene polymorphism with left ventricular mass. *Blood Press* 2006;15:45-50.
43. Patel DA, Li S, Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS. G-6A polymorphism of the angiotensinogen gene and its association with left ventricular mass in asymptomatic young adults from a biethnic community: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens* 2005;18:1437-41.
44. Tang W, Arnett DK, Devereux RB, Panagiotou D, Province MA, Miller MB et al. Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B (PPP3R1) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 2005;150:845-51.
45. Masciotra S, Picard S, Deschepper CF. Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ Res* 1999;84:1453-8.
46. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002;82:945-80.
47. Cohen N, Muntoni F. Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy. *Heart* 2004;90:835-41.
48. Razeghi P, Essop MF, Huss JM, Abbasi S, Manga N, Taegtmeier H. Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain iso-gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:1024-7.
49. Molkenin JD, Markham BE. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1993;268:19512-20.

50. Takahashi M, Tsutsui H, Tagawa H, Igarashi-Saito K, Imanaka-Yoshida K, Takeshita A. Microtubules are involved in early hypertrophic responses of myocardium during pressure overload. *Am J Physiol* 1998;275:H341-H348.
51. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1990;85:507-14.
52. Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, Gick G, El-Sherif N. Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:627-37.
53. Rozich JD, Barnes MA, Schmid PG, Zile MR, McDermott PJ, Cooper G. Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:485-99.
54. Kurabayashi M, Yazaki Y. [Regulation of the myosin heavy chain gene expression during cardiac hypertrophy induced by pressure-overload]. *Nippon Rinsho* 1993;51:1435-40.
55. Katoh Y, Komuro I, Yamaguchi H, Yazaki Y. Molecular mechanism of hypertrophied failing heart--abnormalities of the diastolic properties and contractility. *Jpn Circ J* 1992;56:694-700.
56. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-23.
57. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1994;269:1110-9.
58. Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1142-6.
59. Parker TG, Chow KL, Schwartz RJ, Schneider MD. Positive and negative control of the skeletal alpha-actin promoter in cardiac muscle. A proximal serum response element is sufficient for induction by basic fibroblast growth factor (FGF) but not for inhibition by acidic FGF. *J Biol Chem* 1992;267:3343-50.
60. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1990;85:507-14.

61. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M et al. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 1993;87:1715-21.
62. Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL et al. Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 1988;82:189-97.
63. Dorn GW, Tepe NM, Wu G, Yatani A, Liggett SB. Mechanisms of impaired beta-adrenergic receptor signaling in G(alphaq)-mediated cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction. *Mol Pharmacol* 2000;57:278-87.
64. D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8121-6.
65. Murphy S, Frishman WH. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* 2005;13:3-12.
66. Braun MU, LaRosee P, Simonis G, Borst MM, Strasser RH. Regulation of protein kinase C isozymes in volume overload cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 2004;262:135-43.
67. Dorn GW. Adrenergic pathways and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002;8:S370-S373.
68. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006;98:322-34.
69. Vahebi S, Solaro RJ. Cardiac sarcomeric function, small G-protein signaling, and heart failure. *Panminerva Med* 2005;47:133-42.
70. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD et al. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1637-48.
71. Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB et al. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10140-5.
72. Miyamoto T, Takeishi Y, Takahashi H, Shishido T, Arimoto T, Tomoike H, Kubota I. Activation of distinct signal transduction pathways in hypertrophied hearts by pressure and volume overload. *Basic Res Cardiol* 2004;99:328-37.
73. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000;19:6341-50.

74. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1429-34.
75. Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P et al. Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension* 2001;37:1222-8.
76. Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2001;20:2757-67.
77. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000;19:6341-50.
78. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1429-34.
79. Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P et al. Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension* 2001;37:1222-8.
80. Sugden PH. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res* 1999;84:633-46.
81. Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1178-91.
82. Malcolm DD, Burns TL, Mahoney LT, Lauer RM. Factors affecting left ventricular mass in childhood: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1993;92:703-9.
83. de SG, Devereux RB, Daniels SR, Meyer RA. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension* 1995;26:979-83.
84. Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 2003;112:302-7.
85. De MR, Gavazzi A, Recalcati F, Baroldi G, De VC, Camerini F. Comparison of clinical findings in idiopathic dilated cardiomyopathy in women versus men. The Italian Multicenter Cardiomyopathy Study Group (SPIC). *Am J Cardiol* 1993;72:580-5.
86. Ghali JK, Krause-Steinrauf HJ, Adams KF, Khan SS, Rosenberg YD, Yancy CW et al. Gender differences in advanced heart failure: insights from the BEST study. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2128-34.

87. Douglas PS, Otto CM, Mickel MC, Labovitz A, Reid CL, Davis KB. Gender differences in left ventricle geometry and function in patients undergoing balloon dilatation of the aortic valve for isolated aortic stenosis. NHLBI Balloon Valvuloplasty Registry. *Br Heart J* 1995;73:548-54.
88. Aurigemma GP, Gaasch WH. Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology* 1995;86:310-7.
89. Kimmelstiel CD, Konstam MA. Heart failure in women. *Cardiology* 1995;86:304-9.
90. Legget ME, Kuusisto J, Healy NL, Fujioka M, Schwaegler RG, Otto CM. Gender differences in left ventricular function at rest and with exercise in asymptomatic aortic stenosis. *Am Heart J* 1996;131:94-100.
91. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev* 2003;24:313-40.
92. Sica DA, Wood M, Hess M. Gender and its effect in cardiovascular pharmacotherapeutics: recent considerations. *Congest Heart Fail* 2005;11:163-6.
93. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S116-S124.
94. Yu HP, Shimizu T, Choudhry MA, Hsieh YC, Suzuki T, Bland KI, Chaudry IH. Mechanism of cardioprotection following trauma-hemorrhagic shock by a selective estrogen receptor-beta agonist: up-regulation of cardiac heat shock factor-1 and heat shock proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:185-94.
95. Rawn J.D. Biosynthèse et transport des lipides membranaires et formation de la familles des stérols. *Traité de biochimie. De Boeck-Wesmael*, 1990:537-80.
96. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986;46:1053-61.
97. Levin ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001;91:1860-7.
98. Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 2001;410:380-3.
99. Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 1991;254:1636-9.

100. Karas RH, Gauer EA, Bieber HE, Baur WE, Mendelsohn ME. Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Clin Invest* 1998;101:2851-61.
101. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561-70.
102. Sullivan JM, Vander ZR, Lemp GF, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW et al. Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1988;108:358-63.
103. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997;416:107-12.
104. Schock HW, Herbert Z, Sigusch H, Figulla HR, Jirikowski GF, Lotze U. Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. *Horm Metab Res* 2006;38:225-9.
105. FURMAN RH, HOWARD RP, NORCIA LN, KEATY EC. The influence of androgens, estrogens and related steroids on serum lipids and lipoproteins. *Am J Med* 1958;24:80-97.
106. OLIVER MF, BOYD GS. Effect of bilateral ovariectomy on coronary-artery disease and serum-lipid levels. *Lancet* 1959;2:690-4.
107. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-11.
108. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-33.
109. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:1701-12.
110. Koh KK, Shin MS, Sakuma I, Ahn JY, Jin DK, Kim HS et al. Effects of conventional or lower doses of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1516-21.
111. Eilertsen AL, Qvigstad E, Andersen TO, Sandvik L, Sandset PM. Conventional-dose hormone therapy (HT) and tibolone, but not low-dose HT and raloxifene, increase markers of activated coagulation. *Maturitas* 2006.

112. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999;100:717-22.
113. Liew R, Stagg MA, MacLeod KT, Collins P. Raloxifene acutely suppresses ventricular myocyte contractility through inhibition of the L-type calcium current. *Br J Pharmacol* 2004;142:89-96.
114. Meyer R, Linz KW, Surges R, Meinardus S, Veas J, Hoffmann A et al. Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol* 1998;83:305-21.
115. Du XJ. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res* 2004;63:510-9.
116. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000;407:538-41.
117. Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1997-H2003.
118. Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle* 2003;2:220-3.
119. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E et al. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 2001;88:1020-7.
120. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:4008-18.
121. Han J, Molkenin JD. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:19-22.
122. van EM, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001;104:1419-23.
123. Axelson M, Sjoval J, Gustafsson BE, Setchell KD. Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 1984;102:49-56.
124. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 2004;65:995-1016.

125. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000;66:663-73.
126. Franke AA, Custer LJ, Wang W, Shi CY. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:263-73.
127. Setchell KD, Lawson AM, Borriello SP, Harkness R, Gordon H, Morgan DM et al. Lignan formation in man--microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 1981;2:4-7.
128. Saxena VK, Bhadoria BK. 3'-prenyl-4'-methoxy-isoflavone-7-O-beta-D-(2''-O-p-coumaroyl) glucopyranoside, a novel phytoestrogen from *Sopubia delphinifolia*. *J Nat Prod* 1990;53:62-5.
129. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998;436:71-5.
130. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
131. Ricketts ML, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *J Nutr Biochem* 2005;16:321-30.
132. Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Finnerty CC. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* 2005;70:364-71.
133. Nagata C, Kabuto M, Kurisu Y, Shimizu H. Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women. *Nutr Cancer* 1997;29:228-33.
134. Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, Franke AA. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer* 1999;33:82-7.
135. Horn-Ross PL, John EM, Lee M, Stewart SL, Koo J, Sakoda LC et al. Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol* 2001;154:434-41.
136. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997;29:95-120.

137. Erdman JW, Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation* 2000;102:2555-9.
138. Crouse JR, III, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* 1999;159:2070-6.
139. Cassidy A, Bingham S, Setchell K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr* 1995;74:587-601.
140. Tikkanen MJ, Adlercreutz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol* 2000;60:1-5.
141. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr* 1998;128:728-32.
142. Wiseman H, Casey K, Bowey EA, Duffy R, Davies M, Rowland IR et al. Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2004;80:692-9.
143. Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000;36:27-32.
144. Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 2006;53:7-20.
145. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F, Gatti E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J Nutr* 1995;125:598S-605S.
146. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3392-8.
147. Dewell A, Hollenbeck CB, Bruce B. The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:118-21.
148. Nikander E, Tiitinen A, Laitinen K, Tikkanen M, Ylikorkala O. Effects of isolated isoflavonoids on lipids, lipoproteins, insulin sensitivity, and ghrelin in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3567-72.

149. Cruz MN, Luksha L, Logman H, Poston L, Agewall S, Kublickiene K. Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1969-H1975.
150. Li HF, Tian ZF, Qiu XQ, Wu JX, Zhang P, Jia ZJ. A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. *Physiol Res* 2005.
151. Colacurci N, Chiantera A, Fornaro F, de N, V, Manzella D, Arciello A et al. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause* 2005;12:299-307.
152. Lissin LW, Oka R, Lakshmi S, Cooke JP. Isoflavones improve vascular reactivity in post-menopausal women with hypercholesterolemia. *Vasc Med* 2004;9:26-30.
153. Squadrito F, Altavilla D, Crisafulli A, Saitta A, Cucinotta D, Morabito N et al. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med* 2003;114:470-6.
154. Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, McGrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3053-60.
155. Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajer DS. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2000;85:1297-301.
156. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:124-30.
157. Hendrich S, Lee KW, Xu X, Wang HJ, Murphy PA. Defining food components as new nutrients. *J Nutr* 1994;124:1789S-92S.
158. Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers* 2005;10 Suppl 1:S24-S29.
159. Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:999-1013.
160. Spiteller G. Is atherosclerosis a multifactorial disease or is it induced by a sequence of lipid peroxidation reactions? *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:355-66.
161. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 1995;125:790S-7S.

162. Raines EW, Ross R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* 1995;125:624S-30S.
163. Kondo K, Suzuki Y, Ikeda Y, Umemura K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* 2002;455:53-7.
164. Dobrydneva Y, Williams RL, Morris GZ, Blackmore PF. Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:399-410.
165. Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats. *J Appl Physiol* 2005;99:1378-83.
166. Degen GH, Janning P, Diel P, Michna H, Bolt HM. Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Arch Toxicol* 2002;76:23-9.
167. Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 2001;61:4325-8.
168. Irvine CH, Fitzpatrick MG, Alexander SL. Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:247-53.
169. Souzeau E, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H715-H721.
170. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006;114:567-72.
171. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARBeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* 2005;11:7033-41.
172. Day JK, Bauer AM, DesBordes C, Zhuang Y, Kim BE, Newton LG et al. Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* 2002;132:2419S-23S.
173. Lyn-Cook BD, Blann E, Payne PW, Bo J, Sheehan D, Medlock K. Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:116-9.
174. Boulos Z, Campbell SS, Lewy AJ, Terman M, Dijk DJ, Eastman CI. Light treatment for sleep disorders: consensus report. VII. Jet lag. *J Biol Rhythms* 1995;10:167-76.

175. Eastman CI, Boulos Z, Terman M, Campbell SS, Dijk DJ, Lewy AJ. Light treatment for sleep disorders: consensus report. VI. Shift work. *J Biol Rhythms* 1995;10:157-64.
176. Iglesias R, Terres A, Chavarria A. Disorders of the menstrual cycle in airline stewardesses. *Aviat Space Environ Med* 1980;51:518-20.
177. Cho K. Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat Neurosci* 2001;4:567-8.
178. Hampton SM, Morgan LM, Lawrence N, Anastasiadou T, Norris F, Deacon S et al. Postprandial hormone and metabolic responses in simulated shift work. *J Endocrinol* 1996;151:259-67.
179. Segawa K, Nakazawa S, Tsukamoto Y, Kurita Y, Goto H, Fukui A, Takano K. Peptic ulcer is prevalent among shift workers. *Dig Dis Sci* 1987;32:449-53.
180. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 2000;15:637-47.
181. Lakin-Thomas PL, Brody S. Circadian rhythms in microorganisms: new complexities. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:489-519.
182. Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans* 2005;33:962-6.
183. Pittendrigh CS. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 1993;55:16-54.
184. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:433-56.
185. Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:649-61.
186. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms* 1998;13:100-12.
187. Durgan DJ, Hotze MA, Tomlin TM, Egbejimi O, Graveleau C, Abel ED et al. The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1530-H1541.
188. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995;14:697-706.

189. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998;93:929-37.
190. Young ME. The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1-16.
191. Walters J, Skene D, Hampton SM, Ferns GA. Biological rhythms, endothelial health and cardiovascular disease. *Med Sci Monit* 2003;9:RA1-RA8.
192. Reiter RJ. Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 1986;21:35-54.
193. Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med* 2000;343:1070-7.
194. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998;280:1564-9.
195. Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD et al. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 1998;280:1599-603.
196. Cermakian N, Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:59-67.
197. Ripperger JA, Schibler U. Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian *Dbp* transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* 2006;38:369-74.
198. Preitner N, Brown S, Ripperger J, Le-Minh N, Damiola F, Schibler U. Orphan nuclear receptors, molecular clockwork, and the entrainment of peripheral oscillators. *Novartis Found Symp* 2003;253:89-99.
199. Li Y, Song X, Ma Y, Liu J, Yang D, Yan B. DNA binding, but not interaction with *Bmal1*, is responsible for *DEC1*-mediated transcription regulation of the circadian gene *mPer1*. *Biochem J* 2004;382:895-904.
200. Baggs JE, Green CB. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr Biol* 2003;13:189-98.
201. Kim EY, Edery I. Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6178-83.

202. Nishii K, Yamanaka I, Yasuda M, Kiyohara YB, Kitayama Y, Kondo T, Yagita K. Rhythmic post-transcriptional regulation of the circadian clock protein mPER2 in mammalian cells: a real-time analysis. *Neurosci Lett* 2006;401:44-8.
203. Curtis AM, Seo SB, Westgate EJ, Rudic RD, Smyth EM, Chakravarti D et al. Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J Biol Chem* 2004;279:7091-7.
204. Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 2003;421:177-82.
205. Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT, Okamura H. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J* 2002;21:1301-14.
206. Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV, Antoch MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev* 2003;17:1921-32.
207. Hastings MH, Herzog ED. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms* 2004;19:400-13.
208. Wilsbacher LD, Yamazaki S, Herzog ED, Song EJ, Radcliffe LA, Abe M et al. Photic and circadian expression of luciferase in mPeriod1-luc transgenic mice *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:489-94.
209. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000;288:483-92.
210. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001;291:1040-3.
211. Veerman DP, Imholz BP, Wieling W, Wesseling KH, van Montfrans GA. Circadian profile of systemic hemodynamics. *Hypertension* 1995;26:55-9.
212. House SD, Ruch S, Koscienski WF, III, Rocholl CW, Moldow RL. Effects of the circadian rhythm of corticosteroids on leukocyte-endothelium interactions in the AM and PM. *Life Sci* 1997;60:2023-34.
213. Shaw JA, Chin-Dusting JP, Kingwell BA, Dart AM. Diurnal variation in endothelium-dependent vasodilatation is not apparent in coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:806-12.

214. Hill SM, Collins A, Kiefer TL. The modulation of oestrogen receptor-alpha activity by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 2000;36 Suppl 4:117-8.
215. De La Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. Oestrogen receptor-alpha-immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *J Neuroendocrinol* 1999;11:481-90.
216. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997;388:507-25.
217. Albers HE. Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. *Am J Physiol* 1981;241:R62-R66.
218. Su JD, Qiu J, Zhong YP, Chen YZ. Expression of estrogen receptor -alpha and -beta immunoreactivity in the cultured neonatal suprachiasmatic nucleus: with special attention to GABAergic neurons. *Neuroreport* 2001;12:1955-9.
219. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-84.
220. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103-12.
221. Roberts JM, Sherr CJ. Bared essentials of CDK2 and cyclin E. *Nat Genet* 2003;35:9-10.
222. Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother* 2001;5:109-29.
223. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, Elledge SJ. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 1997;277:1497-501.
224. Brooks G, Poolman RA, Li JM. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 1998;39:301-11.
225. Li JM, Brooks G. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 1997;273:H1358-H1367.
226. Puissant C, Houdebine LM. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* 1990;8:148-9.

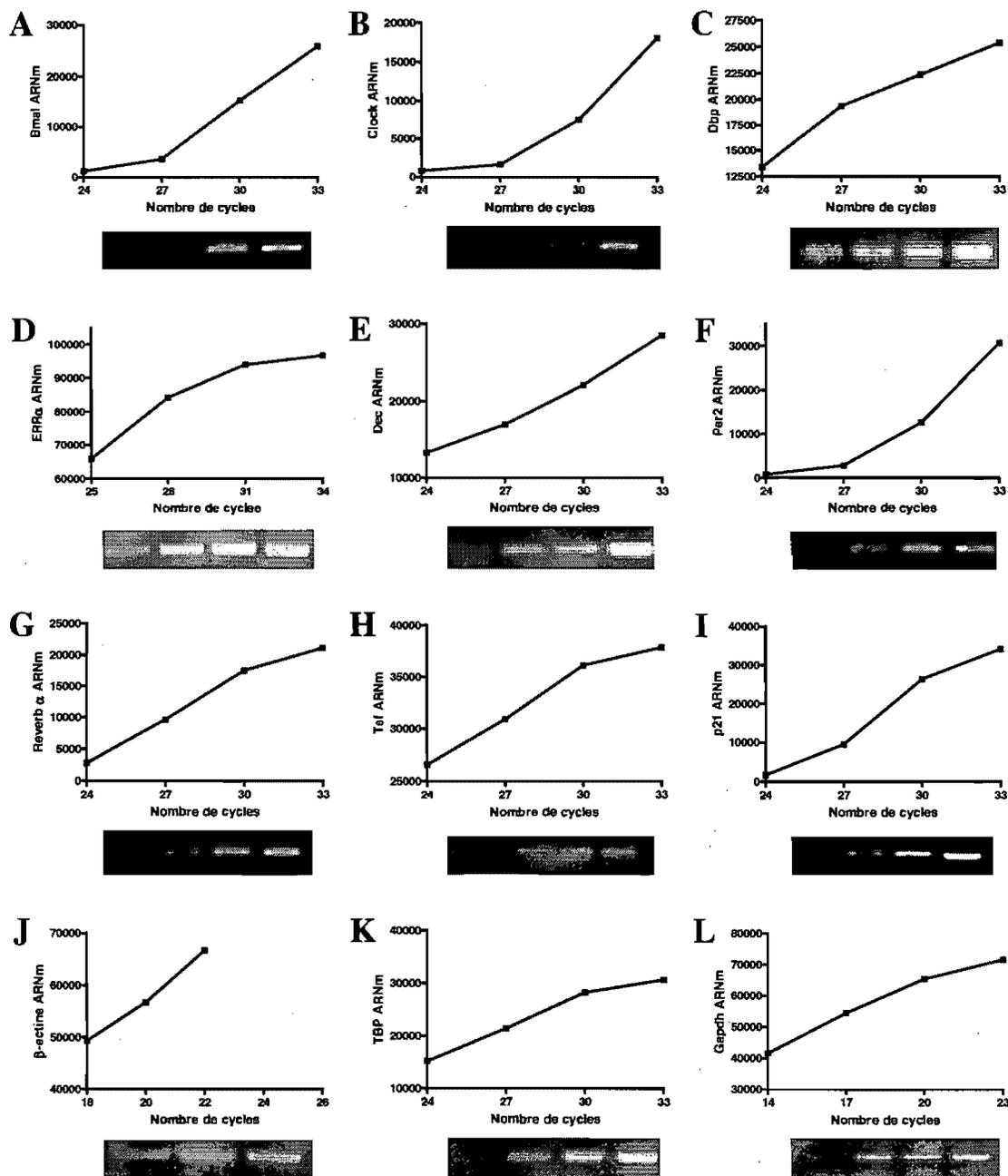
227. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry* 1970;9:2858-65.
228. Shapiro R, DiFate V, Welcher M. Deamination of cytosine derivatives by bisulfite. Mechanism of the reaction. *J Am Chem Soc* 1974;96:206-12.
229. de Luis DA, Aller R, Sagrado J. [Effects on health of soy in menopausal women]. *Rev Clin Esp* 2006;206:205-7.
230. Orzechowski A, Ostaszewski P, Jank M, Berwid SJ. Bioactive substances of plant origin in food--impact on genomics. *Reprod Nutr Dev* 2002;42:461-77.
231. Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N et al. Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J* 2004;382:43-50.
232. Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K. Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci* 2002;15:1953-60.
233. Honma K, Honma S, Shirakawa T, Hiroshige T. Phase setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am J Physiol* 1987;252:R256-R261.
234. Horard B, Rayet B, Triqueneaux G, Laudet V, Delaunay F, Vanacker JM. Expression of the orphan nuclear receptor ERRalpha is under circadian regulation in estrogen-responsive tissues. *J Mol Endocrinol* 2004;33:87-97.
235. Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan YC, Chen S. Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res* 2003;1:981-91.
236. Ichida M, Nemoto S, Finkel T. Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1alpha). *J Biol Chem* 2002;277:50991-5.
237. Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* 2002;277:40265-74.
238. Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14451-6.
239. Ratna WN. Inhibition of estrogenic stimulation of gene expression by genistein. *Life Sci* 2002;71:865-77.

240. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 1997;62:365-72.
241. Suzuki T, Miyata N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Curr Med Chem* 2006;13:935-58.
242. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005;10:631-47.
243. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005;10:631-47.
244. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
245. Rideout WM, III, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990;249:1288-90.
246. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2 Suppl 1:S4-11.
247. Holmes R, Soloway PD. Regulation of imprinted DNA methylation. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:122-9.
248. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-4.
249. Tyler JK, Kadonaga JT. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* 1999;99:443-6.
250. Claus R, Lubbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2003;22:6489-96.
251. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006;114:567-72.
252. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARBeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* 2005;11:7033-41.
253. Day JK, Bauer AM, DesBordes C, Zhuang Y, Kim BE, Newton LG et al. Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* 2002;132:2419S-23S.

254. Lyn-Cook BD, Blann E, Payne PW, Bo J, Sheehan D, Medlock K. Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:116-9.
255. Robertson KD, Jones PA. Dynamic interrelationships between DNA replication, methylation, and repair. *Am J Hum Genet* 1997;61:1220-4.

ANNEXE

Annexe 1 : Mise au point du nombre de cycles d'amplification appropriés pour RT-PCR semi-quantitatives selon les différentes amorces employées.



Ces résultats ont permis de déterminer le nombre de cycles d'amplification nécessaires afin de demeurer dans la phase linéaire de la courbe pour éviter que la réaction d'amplification plafonne.