

Université de Montréal

Effets combinés des gènes, du sexe et de l'environnement sur la  
morphologie et la fonction des cardiomyocytes de rat adulte

par

Emmanuelle Souzeau  
[REDACTED]

Département de physiologie  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
En physiologie

Août 2004

©Emmanuelle Souzeau, 2004





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets combinés des gènes, du sexe et de l'environnement sur la  
morphologie et la fonction des cardiomyocytes de rat adulte

Présenté par

Emmanuelle Souzeau  
[REDACTED]

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Josette Noël  
Président-rapporteur

Dr Christian Deschepper  
Directeur de recherche

Dr Angelino Calderone  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

L'hypertrophie cardiaque du ventricule gauche est un facteur de risque important pour la morbidité et la mortalité cardio-vasculaires. Il existe dans la littérature des évidences que le rapport longueur/largeur (L/l) des cardiomyocytes est une valeur étroitement régulée et conservée, et qu'un allongement disproportionné des cardiomyocytes corrèle avec une hypertrophie de type excentrique dilatée et éventuellement une dysfonction ventriculaire. Nous rapportons dans ce mémoire que l'absence de phytoestrogènes dans l'alimentation maternelle pendant la période périnatale a pour conséquence d'augmenter la longueur des cardiomyocytes des cœurs de leur progéniture pendant la vie adulte. Ces changements de morphologie des cardiomyocytes sont accompagnés par une hypertrophie ventriculaire dilatée ainsi que par une résistance moindre à la décompensation cardiaque. Nous avons par ailleurs démontré précédemment que les rats WKHA (Wistar-Kyoto-hyperactif) ont une masse cardiaque plus élevée que les rats WKY (Wistar-Kyoto) malgré une pression artérielle normale et comparable, et que le locus D5Cfd50-D5Rat245 sur le chromosome 5 était associé à des changements du rapport L/l des cardiomyocytes entre ces souches de rat. De façon intéressante, l'introduction du même locus d'origine WKHA dans des rats mâles WKY altère non seulement le rapport L/l des cardiomyocytes dans la souche congénique résultante, mais diminue aussi la résistance à la décompensation cardiaque. Au total, nos observations indiquent que des facteurs tant génétiques qu'environnementaux qui ont pour effet de modifier la valeur du rapport L/l des cardiomyocytes affectent également la morphologie et les capacités fonctionnelles du cœur dont ils sont dérivés.

**Mots-clés :** maladies cardio-vasculaires, hypertrophie du ventricule gauche, cardiomyocytes, fistule aorto-veineuse, phytoestrogènes, exposition périnatale, congéniques, hormones sexuelles.

## SUMMARY

Left ventricular hypertrophy (LVH) is an important risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. It has been reported previously that the value of the length/width (L/W) ratio of cardiomyocytes is tightly regulated and conserved, and that a disproportional increase in the length of cardiomyocytes correlates with dilated eccentric LVH and eventually ventricular dysfunction. We report here that the absence of phytoestrogens in the maternal diet during the perinatal period increased the length of cardiomyocytes from the heart of their progeny during adulthood. These changes in the morphology of cardiomyocytes were accompanied by features of dilated eccentric LVH as well as decreased resistance to cardiac decompensation. We had also reported previously that WKHA (Wistar-Kyoto-hyperactive) inbred rats have increased heart weight compared to WKY (Wistar-Kyoto) inbred rats despite normal and identical blood pressure, and that the D5Cfd50-D5Rat245 locus on chromosome 5 was linked to changes in the L/W ratio of cardiomyocytes from the hearts of crosses between these strains. Interestingly, introduction of that same locus from WKHA into male WKY rats not only changes the L/W ratio of cardiomyocytes from the hearts of the resulting congenic strain, but also decreases its resistance to cardiac decompensation. Altogether, our data show that environmental as well as genetic factors that affect the L/W ratio of cardiomyocytes also affect the morphology and functional properties of the hearts they derive from.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, left ventricular hypertrophy, cardiomyocytes, aorto-caval fistula, phytoestrogens, perinatal exposure, congenic, sex hormones.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xii</b>
<b>Chapitre 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1. L'hypertrophie cardiaque.....	1
1.1 L'épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque .....	1
1.2 Les types d'hypertrophie .....	2
1.2.1 Corrélation entre la morphologie du cœur et celle des cardiomyocytes .....	2
1.2.2 Corrélation entre morphologie et fonction .....	4
1.2.3 Mécanismes moléculaires.....	6
1.2.4 Induction expérimentale de l'hypertrophie .....	6
2. Implication des gènes dans l'hypertrophie .....	7
2.1 Déterminants génétiques de l'hypertrophie .....	7
2.2 Le rat : modèle de l'hypertrophie cardiaque.....	9
2.2.1 Les souches WKY/WKHA.....	9
2.2.2 Les lignées congéniques .....	10
3. Implication de l'environnement stéroïdien dans l'hypertrophie.....	13
3.1 Stéroïdes endogènes.....	13
3.1.1 Dimorphisme sexuel.....	13

3.1.2 Hormones sexuelles.....	14
3.2 Stéroïdes exogènes : Les phytœstrogènes.....	17
3.2.1 Composés .....	17
3.2.2 Métabolisme .....	19
3.2.3 Présence dans l'alimentation .....	20
3.2.3.1 Chez l'humain.....	20
3.2.3.2 Chez le rat .....	21
3.2.4 Mécanismes d'actions .....	22
3.2.5 Effets cardio-vasculaires .....	24
4. Projet de recherche.....	26
<b>Chapitre 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>28</b>
1. Animaux.....	28
2. Expérimentations sur les animaux .....	29
2.1 Fistule aorto-veineuse .....	29
2.2 Castration et ovariectomie .....	31
2.3 Mesures d'indices de contractilité cardiaque.....	31
2.4 Gavage de phytœstrogènes .....	32
3. Histologie et morphologie.....	33
4. Isolement des cardiomyocytes .....	33
5. Mesure des cardiomyocytes isolés.....	35
6. Dosage des hormones sexuelles .....	35
7. Détermination de la pression artérielle .....	36
8. Analyses statistiques .....	36
<b>Chapitre 3 : RÉSULTATS .....</b>	<b>37</b>
1. Caractéristiques des cardiomyocytes de rat adulte .....	37
1.1 Caractéristiques de base.....	37



1.2 Effet de l'alimentation .....	37
1.3 Effet de la gonadectomie combinée à une alimentation avec ou sans PE .	40
1.4 Réintroduction des PE à différents temps chez les WKY .....	45
1.5 Remplacement des PE par la génistéine ou la daidzéine .....	46
1.6 Effet d'une fistule AV chez les mâles et femelles WKHA, WKY et WKY (-PE).....	49
2. Morphologie du cœur.....	53
2.1 En conditions basales.....	53
2.2 Après induction d'une fistule AV .....	53
3. Mesures de contractilité .....	57
4. Pression Artérielle.....	63
5. Hormones sexuelles .....	63
<b>Chapitre 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>67</b>
1. Effet de la nourriture sur la morphologie et la fonction cardiaques .....	67
2. Effet des hormones sexuelles sur la morphologie et la fonction cardiaques ....	78
3. Effet des gènes sur la morphologie et la fonction cardiaques.....	84
4. Limitations .....	89
<b>Chapitre 5 : CONCLUSIONS.....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre 6 : PERPECTIVES.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE : .....</b>	<b>93</b>
<b>ANNEXE : PUBLICATION ORIGINALE .....</b>	<b>xiii</b>
1. Contribution des auteurs: .....	xiii
2. Déclaration des coauteurs de l'article :.....	xiv
3. Manuscrit .....	xv

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Caractéristiques des cardiomyocytes de rats WKHA et WKY adultes âgés de 12 semaines.....	38
Tableau II	Effet de la souche de rat sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des mâles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.....	50
Tableau III	Effet de la souche de rat sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des femelles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.....	51
Tableau IV	Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	52
Tableau V	Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur des mâles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	54
Tableau VI	Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur des mâles des lignées congéniques en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	58
Tableau VII	Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur des femelles des lignées congéniques en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	59

Tableau VIII	Effet de la souche de rat sur les mesures de contractilité des mâles et femelles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.....	61
Tableau IX	Effet de l'alimentation sur les mesures de contractilité des mâles et femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	62
Tableau X	Effet de l'alimentation sur les mesures de pressions artérielles des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.....	64
Tableau XI	Effet de l'alimentation sur les concentrations plasmatiques d'hormones sexuelles des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.....	65
Tableau XII	Effet de la souche de rat sur les concentrations plasmatiques d'hormones sexuelles des mâles et femelles âgés de 12 semaines en présence de PE.....	66

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Remodelage ventriculaire.....	3
Figure 2	Méthode d'obtention de lignées congéniques.....	12
Figure 3	Structure des phytoestrogènes.....	18
Figure 4	Schéma de l'induction expérimentale de la fistule AV.....	30
Figure 5	Effet des hormones sexuelles et des PE sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.....	39
Figure 6	Effet des hormones sexuelles et des PE sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKHA âgés de 12 semaines.....	41
Figure 7	Effet de l'alimentation sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 6 semaines.....	42
Figure 8	Effet de l'environnement stéroïdien sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.....	44
Figure 9	Effet de la réintroduction des PE à différents temps sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines...	47
Figure 10	Effet des suppléments de génistéine ou de daidzéine sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines...	48

Figure 11	Effet de l'alimentation sur la morphologie des ventricules des femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).....	56
Figure 12	Exemples de courbes pression/volume .....	73

## LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> (enzyme de conversion de l'angiotensine)
ACF	<i>Aorto caval fistula</i> (fistule aorto-veineuse)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i> (facteur natriurétique auriculaire)
AR	<i>Androgen receptor</i> (Récepteur aux androgènes)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1	<i>Angiotensin type 1 receptor</i> (récepteur à l'angiotensine de type 1)
AV	Aorto-veineuse
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i> (peptide natriurétique cérébral)
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (albumine de sérum bovin)
cM	centimorgan
CSA	<i>Cross section area</i>
EC <sub>50</sub>	<i>Effective concentration</i> (concentration causant 50% de la réponse maximale)
ER	<i>Estrogen receptor</i> (récepteur aux œstrogènes)
ERE	<i>Estrogen response element</i> (élément de réponse aux œstrogènes)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (sérum bovin fœtal)
GC-A	<i>Guanylate cyclase A</i>
GMPc	Guanylate monophosphate cyclique
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfuric acid</i>
HERS	<i>Heart and estrogen/progestin replacement study</i>
HHR	<i>Hypertrophic heart rat</i>
HRT	<i>Hormonal replacement therapy</i> (thérapie de remplacement d'hormone)
HVG	Hypertrophie cardiaque du ventricule gauche
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>Knock-Out</i> (inactivation de gène)
KH	Krebs-Henseleit

L/l	Longueur/largeur
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LVP	<i>Left ventricular pressure</i> (pression du ventricule gauche)
LVESP	<i>Left ventricular end-systolic pressure</i> (pression en fin de systole du ventricule gauche)
LVEDP	<i>Left ventricular end-diastolic pressure</i> (pression en fin de diastole du ventricule gauche)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NO	<i>Nitric oxyde</i> (oxyde nitrique)
Nppa	<i>Natriuretic peptide precursor type A</i> (précurseur du peptide natriurétique de type A)
p38	Protéine de 38 kDa
PE	Phytoestrogènes
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPAR $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
QTL	<i>Quantitative trait loci</i> (locus de trait quantitatif)
Dahl-S	<i>Dahl salt-sensitive</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (erreur standard de la moyenne)
SHBG	<i>Sex hormone binding globulin</i>
SHHF	<i>Spontaneously hypertensive heart failure</i>
SHR	<i>Spontaneous hypertensive rats</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche
WHI	<i>Women's health initiative</i>
WKY	<i>Wistar Kyoto</i>
WKHA	<i>Wistar-Kyoto hyperactive</i>
WKHT	<i>Wistar-Kyoto hypertensive</i>
WT	<i>Wild type</i> (type sauvage)

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Christian Deschepper pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Son support tout au long de mon projet de recherche, son encadrement ainsi que ses conseils m'ont permis de compléter ma maîtrise dans un contexte de travail agréable. Je tiens tout particulièrement à souligner la confiance qu'il m'a accordée et la considération qu'il a envers de chacun de ses étudiants.

Un grand merci à Sylvie Picard sans qui ma maîtrise n'aurait été possible. Ses conseils toujours utiles et son soutien technique de tous les jours ont été précieux. Mais son éternelle bonne humeur, son sens de l'humour et sa facilité à animer des discussions l'ont été encore plus.

Marie-line Rainville pour tout le travail de génotypage effectué ainsi que pour sa générosité, sa bonne humeur et sa joie de vivre. Sonia Bélanger pour son travail remarquable sur les animaux et son éternelle gentillesse.

Ainsi que tous les autres membres du laboratoire.

Julie D'amours pour son temps consacré à m'aider dans la gestion des animaux de l'animalerie du SPF, Manon Laprise pour les chirurgies et les manipulations sur les animaux et Dipti Taylor pour les extractions d'ADN servant à maintenir les lignées congéniques.

Et enfin Bastien Llamas pour m'avoir guidée et encouragée tout au long de ma maîtrise et pour tous ces bons moments partagés.



# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## 1. L'hypertrophie cardiaque

### 1.1 L'épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque

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

L'étude « *The Framingham Heart Study* » a démontré, à l'aide de mesures prises par échocardiographie, que l'hypertrophie cardiaque du ventricule gauche (HVG) était un facteur de risque important dans l'incidence des maladies cardio-vasculaires <sup>1</sup>. De plus, sa valeur prédictive est indépendante de certains facteurs comme l'hypertension. Son implication dans l'incidence de ces maladies a été démontrée par d'autres études épidémiologiques <sup>2-7</sup>. Plus particulièrement, l'HVG est un facteur déterminant dans la détérioration du myocarde et sa transition vers la décompensation cardiaque <sup>8,9</sup>. La défaillance cardiaque est une condition qui atteint des proportions épidémiques dans les pays industrialisés (4.8 millions de personnes aux Etats-Unis avec 500 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année <sup>10,11</sup>) et touchera 20% de la population d'Amérique du Nord maintenant âgée de plus de 40 ans <sup>12</sup>. Même si le développement récent de médicaments a amélioré le taux de survie associée à cette pathologie, le vieillissement de la population est tel que l'incidence de la défaillance cardiaque restera élevé dans les prochaines années <sup>13</sup>.

La forme la plus fréquente d'hypertrophie cardiaque est la forme sporadique. Une proportion plus faible des cas d'hypertrophie cardiaque est constituée par les formes familiales qui sont le résultat de mutations de gènes codant pour des protéines de structure cardiaques<sup>14-16</sup>. Cette dernière forme d'hypertrophie ne fera pas l'objet de cette étude. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'un remodelage cardiaque tel que l'HVG<sup>17</sup>: l'ischémie et/ou l'infarctus, l'inflammation, les surcharges hémodynamiques ainsi que les prédispositions génétiques. La masse cardiaque représente un trait quantitatif complexe<sup>18</sup>, c'est-à-dire qu'elle est contrôlée par les effets combinés de plusieurs gènes individuels (dont aucun ne peut être tenu comme seul responsable du phénotype) et des facteurs environnementaux. Le développement de l'hypertrophie cardiaque est donc influencé par trois composantes principales, à savoir les gènes, le sexe (et donc les hormones sexuelles) et l'environnement.

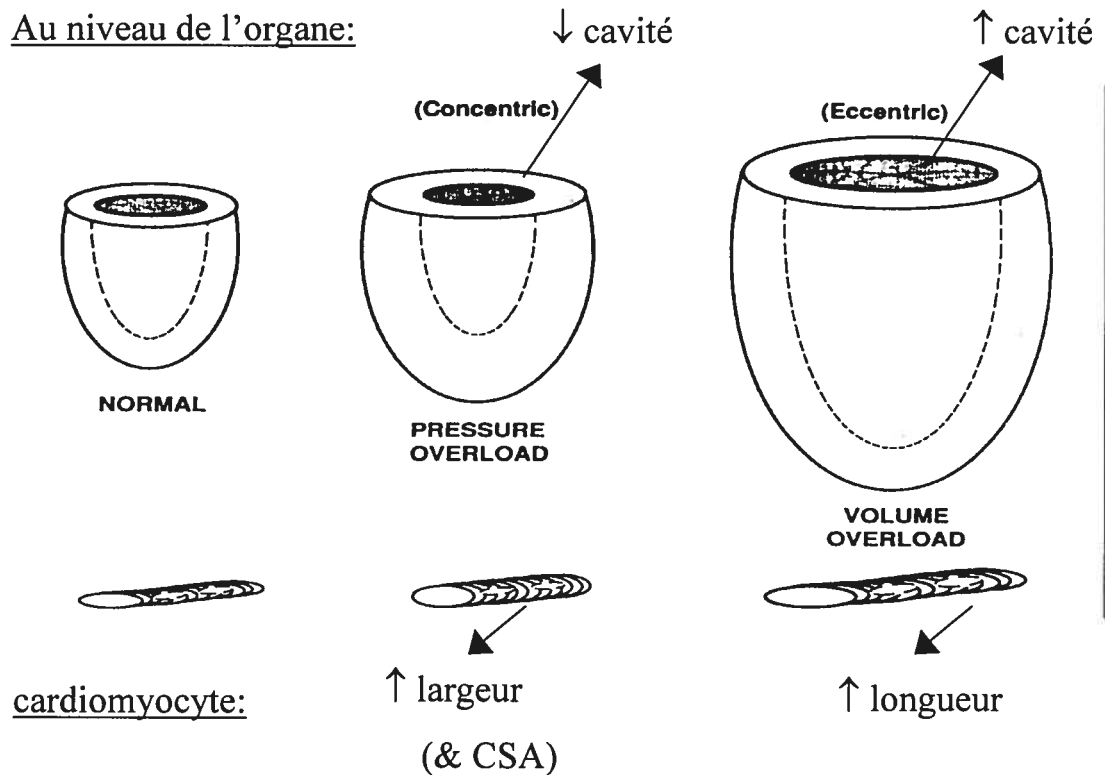
## 1.2 Les types d'hypertrophie

### 1.2.1 Corrélation entre la morphologie du cœur et celle des cardiomyocytes

L'hypertrophie cardiaque correspond à une augmentation de la taille des cellules du cœur (par une synthèse accrue de protéines contractiles) sans variation dans le nombre de ces cellules. Il est important de noter que le remodelage du cœur peut aboutir à deux types d'hypertrophie différente. Selon la loi de Laplace, une augmentation de la pression systolique sera contrebalancée par une augmentation de l'épaisseur du ventricule afin de normaliser le stress sur la paroi. Ceci correspond à l'hypertrophie concentrique, observée lors d'une surcharge de pression (ou augmentation de la postcharge et donc de la pression systolique), et retrouvée chez les personnes avec des sténoses aortiques ou de l'hypertension (Fig 1). L'hypertrophie de type excentrique, quant à elle, s'observe lors d'une augmentation de la charge cardiaque pendant la période diastolique, comme par exemple, lors d'une surcharge de volume (donc une augmentation de la précharge ou de la pression diastolique) et se retrouve chez les personnes avec une insuffisance de la valve mitrale ou aortique (Fig 1).

Figure 1. Remodelage ventriculaire.

Illustration schématique des variations dans les dimensions des cardiomyocytes associées à une surcharge de pression ou de volume du ventricule gauche.



modifié de Gerdes A.M. <sup>19</sup>.

Il existe actuellement des évidences qui montrent que les deux types d'hypertrophie sont contrôlés par des mécanismes différents <sup>20-22</sup>. En particulier, les changements morphologiques observés dans les dimensions des cardiomyocytes vont refléter différents types de remodelage cardiaque. Ainsi, l'hypertrophie concentrique se caractérise par une sarcomogénèse en parallèle (élargissement des cardiomyocytes) aboutissant à une augmentation de l'épaisseur de la paroi du ventricule <sup>23-26</sup> alors que l'hypertrophie excentrique se caractérise principalement par une sarcomogénèse en série (élongation des cardiomyocytes) aboutissant à une cavité ventriculaire plus grande et plus dilatée, et accompagnée d'une légère sarcomogénèse en parallèle (Fig 1) <sup>23,27-29</sup>. Ces

observations sont soutenues par une étude récente démontrant que l'étirement des cardiomyocytes pendant différentes phases du cycle cardiaque provoque différents phénotypes hypertrophiques<sup>30</sup>. Dans les deux cas d'hypertrophie, la taille des sarcomères composant les cellules reste la même; c'est le nombre d'unités sarcomériques qui varie<sup>27,28,31-33</sup>.

Grossman et al., en 1975, ont été les premiers à vérifier l'hypothèse selon laquelle des altérations dans la morphologie des cardiomyocytes pendant l'hypertrophie cardiaque s'accompagnent de changements dans l'anatomie ventriculaire<sup>23</sup>. Des données de cardiomyocytes isolés de patients avec et sans défaillance cardiaque suggèrent que la dilatation ventriculaire dans la pathologie est principalement due à leur élongation<sup>28</sup>. Chez le rat SHHF hypertendu, qui développe une défaillance cardiaque avec l'âge, l'élongation des cardiomyocytes semble pouvoir expliquer à elle seule la dilatation ventriculaire<sup>31</sup>. Ces données suggèrent que des variations dans la structure des cardiomyocytes s'accompagnent d'altérations dans l'anatomie du myocarde.

### 1.2.2 Corrélation entre morphologie et fonction

L'hypertrophie concentrique est une adaptation du myocarde qui a pour effet de normaliser l'augmentation du stress systolique alors que l'hypertrophie excentrique survient afin de réduire le stress diastolique. Cependant, dans la deuxième condition, la dilatation du ventricule ne suffit pas à abaisser le stress diastolique. Ceci conduit à une dilatation continue de la cavité ventriculaire résultant en une augmentation du stress systolique et causant simultanément une hypertrophie cardiaque concentrique modeste<sup>23,28</sup>. C'est pourquoi on retrouve une augmentation concomitante de la longueur et de la largeur des cardiomyocytes soumis à une surcharge de volume. Au niveau fonctionnel, l'hypertrophie concentrique se caractérise par une augmentation de la pression systolique et de la rigidité du myocarde, un épaississement de la paroi ventriculaire ainsi que d'une dysfonction systolique et de la fibrose<sup>23,34</sup>. Dans l'hypertrophie excentrique, le remodelage et la dilatation ventriculaires s'accompagnent d'une augmentation du

volume d'éjection, de la compliance ventriculaire, de la pression en fin de diastole et de la consommation d'oxygène, d'une diminution de la contractilité et de la rigidité du myocarde ainsi que d'une dysfonction diastolique du VG<sup>35-37</sup>.

Le ratio L/l des cardiomyocytes est un paramètre utile car il est l'analogie cellulaire du ratio diamètre de la cavité/épaisseur de la paroi ventriculaire. Des données obtenues chez le rat indiquent que ce ratio est préservé quelque soit l'âge, pendant la période de croissance normale des cardiomyocytes, du sevrage à l'âge adulte<sup>38,39</sup>. De plus, ce ratio est extrêmement bien conservé à travers les espèces (rats, hamster, cochon d'inde, chat, humain)<sup>40-42</sup>. Il n'y a qu'entre les sexes qu'il existe une différence chez l'animal, les mâles possédant un ratio L/l plus grand que les femelles<sup>43</sup>. Durant l'hypertrophie excentrique, l'augmentation concomitante de la longueur et de la largeur contribue à maintenir ce ratio<sup>29,44</sup>, ce qui n'est pas le cas de l'hypertrophie concentrique où la longueur ne varie pas<sup>26</sup>. Des variations du ratio L/l ont un impact fonctionnel et reflètent des adaptations inadéquates du myocarde comme la transition vers la défaillance cardiaque qui est accompagnée d'une augmentation disproportionnée de la longueur des cellules<sup>32,42,45</sup>.

L'étude « *The Framingham Heart Study* » a suggéré qu'une augmentation du volume de la cavité ventriculaire était un facteur de risque important dans le développement de la défaillance cardiaque<sup>46</sup>. D'autres études épidémiologiques<sup>33,47-49</sup> ainsi que sur l'animal<sup>36</sup> ont démontré que la dilatation du VG était associée à un pronostic défavorable. La défaillance cardiaque, dont l'issue est inéluctable, se traduit par une augmentation disproportionnée de la longueur des cellules, expliquant la dilatation ventriculaire plus prononcée sans variation dans l'épaisseur du ventricule, une contractilité des myocytes déprimée, une fonction myocardique diminuée, une activation neurohumorale, une surexpression de cytokines ainsi qu'une dysfonction vasculaire et endothéliale. Les mécanismes de transition vers la défaillance sont encore méconnus.

### 1.2.3 Mécanismes moléculaires

Différents profils d'expression de marqueurs biochimiques reliés à l'HVG sont observés lors de l'induction de l'hypertrophie cardiaque. Au niveau des cardiomyocytes, il se produit une réinduction du programme des gènes fœtaux. Entre autre, une induction des peptides natriurétiques (ANF et BNP) (pour les deux types d'hypertrophie)<sup>21,50-54</sup> et des changements dans les protéines contractiles des cardiomyocytes apparaissent (principalement dans la surcharge de pression) dont la réexpression de la chaîne lourde de la myosine  $\beta$ <sup>21,50,51,55-57</sup>, de la chaîne légère de la myosine embryonnaire ainsi que de l'actine squelettique  $\alpha$ <sup>21,50,51,53,58</sup>. Au niveau des fibroblastes, une augmentation de la synthèse de fibronectine et du collagène de type I et III est observée<sup>52,55,59,60</sup>.

De nombreuses voies de signalisation ont été impliquées dans la réponse moléculaire du cœur à l'hypertrophie; parmi celles-ci, on retrouve entre autres les voies liées à calcineurine-NFAT<sup>61-63</sup>, PI3K<sup>64,65</sup>, JAK/STAT<sup>66,67</sup>, MAPK (ERK, JNK et p38)<sup>68-72</sup> et les récepteurs liés aux protéines G<sup>73-75</sup>. Les mécanismes par lesquels les cardiomyocytes régulent la croissance des unités contractiles en série ou en parallèle sont encore méconnus. Cependant, des voies différentes vont être activées dans l'hypertrophie concentrique ou excentrique. Par exemple, ERK1/2 est impliqué dans l'hypertrophie concentrique<sup>68</sup> alors que MEK5 semble impliqué dans l'assemblage des sarcomères en série<sup>76</sup>.

### 1.2.4 Induction expérimentale de l'hypertrophie

Les différents modèles animaux d'hypertrophie cardiaque ont permis de comprendre de nombreux mécanismes au cours des dernières décennies autant au niveau morphologique que fonctionnel, pharmacologique ou biochimique. Dans les modèles animaux, l'hypertrophie cardiaque peut être induite de plusieurs façons : infusion de facteurs hormonaux (catécholamines<sup>77-82</sup> ou angiotensine II<sup>50,55,83,84</sup>) ou de manière chirurgicale (constriction partielle de l'aorte<sup>85-92</sup> entraînant une hypertrophie

concentrique, infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche<sup>93-98</sup> et fistule AV<sup>35-37,99,100</sup> aboutissant à une hypertrophie excentrique). Il est aussi possible d'induire une hypertrophie cardiaque en créant un état hyperactif chez l'animal. Le rat (tout comme l'humain) soumis à un exercice quotidien comme la nage ou la course développe une légère hypertrophie<sup>101-105</sup>.

Ces diverses méthodes miment certaines pathologies retrouvées chez l'humain. Cependant, il faut se montrer prudent avec l'extrapolation des résultats de l'animal vers l'humain, l'élaboration des études ne reflétant pas toujours l'évolution réelle des pathologies. Les hypertrophies induites sont souvent plus importantes et apparaissent plus brusquement que chez l'humain où l'hypertrophie se développe de façon progressive. Bien qu'il n'existe pas de modèle expérimental animal idéal pour étudier le remodelage cardiaque chez l'humain à ce jour, ces méthodes représentent néanmoins des modèles reproductibles, éventuellement contrôlés au niveau génétique afin d'obtenir des effets homogènes, où le stade de la pathologie est défini et les réponses individuelles expliquées par le degré d'hypertrophie.

## **2. Implication des gènes dans l'hypertrophie**

### **2.1 Déterminants génétiques de l'hypertrophie**

Plusieurs facteurs sont reconnus pour influencer la masse cardiaque chez l'humain : le sexe, l'âge, le mode de vie, le degré d'activité physique, la consommation de sel, de gras, d'alcool ou de tabac, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et les problèmes rénaux<sup>106-112</sup>. Cependant, les facteurs énumérés ci-dessus ne suffisent pas à expliquer la variance totale de la masse cardiaque dans la population<sup>113</sup>. Des études chez l'humain ont démontré l'héritabilité de la masse cardiaque<sup>114-117</sup>, ce qui suggère, en plus des facteurs environnementaux, l'importance des facteurs génétiques<sup>118</sup>. Il a été établi qu'une forte proportion de la variabilité de la masse cardiaque (60 à 70% chez l'humain

<sup>114</sup>; 45 à 65% chez le rat <sup>119</sup>) est imputable aux facteurs génétiques et le reste aux facteurs environnementaux <sup>108,120</sup>.

Cependant, la découverte de gènes impliqués dans la détermination de la masse cardiaque et le remodelage du myocarde est compliquée. La forme sporadique touche 10 à 20% de la population et comprend de nombreux gènes et la forme familiale est causée par des mutations héréditaires peu fréquentes. Des mutations dans les gènes codant pour différentes protéines sarcomériques cardiaques (la chaîne lourde de la myosine <sup>121,122</sup>, la tropomyosine- $\alpha$  <sup>123</sup>, la troponine T cardiaque <sup>123,124</sup>, l'actine- $\alpha$  <sup>125</sup>, la protéine C liant la myosine <sup>126</sup> et la titine <sup>127</sup>) ont été associées à la cardiomyopathie hypertrophique <sup>128</sup>. Ces données démontrent que des mutations monogéniques peuvent causer des formes particulières d'hypertrophie cardiaque.

Pourtant, l'étiologie de l'HVG est vraisemblablement le résultat des effets de multiples gènes interagissant indépendamment ou en synergie avec d'autres gènes et/ou l'environnement. Ainsi, des mutations dans les gènes qui codent pour les protéines régulant la structure du VG, la charge hémodynamique, l'homéostasie du calcium, les hormones, le métabolisme des substrats, les facteurs de croissance et/ou la signalisation cellulaire sont des candidats de choix pour l'héritabilité de la masse cardiaque et de la réponse hypertrophique <sup>129</sup>. Par exemple, des polymorphismes dans les enzymes et les hormones impliquées dans le système rénine-angiotensine prédisent des variations de pression artérielle <sup>130,131</sup>. D'autres mutations dans les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques confèrent une prédisposition à la défaillance cardiaque <sup>132</sup>. Des polymorphismes dans le gène PPAR $\alpha$  régulent la croissance du VG en réponse à l'exercice et à l'hypertension <sup>133</sup>. Cependant, il est probable que chaque gène seul ne contribue que pour une petite partie de la variation phénotypique totale de la fonction et de l'hypertrophie du VG.

L'identification des gènes responsables de traits quantitatifs complexes comme la masse cardiaque s'avère difficile en raison de l'héritabilité polygénique, l'hétérogénéité de chaque locus, les interactions génétiques, leur interaction avec l'environnement et les gènes développementaux <sup>134</sup>. Dans les modèles animaux, une des stratégies de base de la



généétique des traits complexes consiste à cribler des génomes entiers d'individus F2 issus de deux souches polymorphes et qui diffèrent pour le phénotype d'intérêt. Des analyses de liaison génétique permettent ensuite d'identifier des régions du génome appelées QTLs contenant potentiellement des gènes associés au phénotype d'intérêt. Pravenec et al. ont ainsi identifié un QTL relié à la masse du VG sur le chromosome 17 chez le rat <sup>135</sup>. D'autres QTLs reliés à la pression artérielle et/ou la masse cardiaque ont été identifiés sur les chromosomes 2 <sup>136,137</sup>, 3 <sup>138,139</sup>, 7 <sup>140</sup>, 10 <sup>139</sup> et 17 <sup>139,140</sup> chez le rat. Cependant, Sebkhî et al. <sup>141</sup> et Deschepper et al. <sup>142</sup> ont été les seuls à identifier des QTLs liés à la masse cardiaque à partir de croisements de rats normotendus sur les chromosomes 3 et 5 respectivement.

## 2.2 Le rat : modèle de l'hypertrophie cardiaque

L'avancement des connaissances reliées à l'HVG n'aurait pu être possible sans l'existence de modèles animaux <sup>143,144</sup>. Le rat a été largement utilisé pour les avantages qu'il présente : courte période de gestation, faible coût de gestion des colonies, manipulation facile, reproductibilité. Sa physiologie est bien caractérisée <sup>145</sup>, son génome est séquencé <sup>146</sup> et il existe maintenant les outils nécessaires pour le comparer à celui de l'humain <sup>147-150</sup>. Le rat possède des caractéristiques phénotypiques transposables à des conditions particulières chez l'humain. Il a permis la compréhension de nombreux mécanismes à l'origine de l'hypertrophie cardiaque et de la physiologie cardiovasculaire. De plus, il permet l'étude des facteurs génétiques grâce aux nombreuses souches consanguines existantes et aux modèles transgéniques <sup>145,151,152</sup>. L'utilisation de souches consanguines et la standardisation de leur environnement réduit la complexité génétique des phénotypes polygéniques et permet l'analyse de maladies multifactorielles comme les maladies cardio-vasculaires.

### 2.2.1 Les souches WKY/WKHA

Il existe plusieurs modèles de rat qui développent de l'hypertrophie cardiaque avec l'âge, à cause de modifications dans leur contenu génétique. Parmi ces modèles, les rats hypertendus SHR<sup>153-155</sup> et les rats Dahl-S<sup>156-158</sup> permettent d'étudier les mécanismes de l'hypertrophie cardiaque dépendants en partie de l'hypertension. Les rats hypertendus SHHF permettent l'étude de la défaillance cardiaque<sup>31,159,160</sup>. Il existe un modèle de rat qui développe de l'hypertrophie cardiaque tout en possédant une tension artérielle normale : le rat HHR<sup>151</sup>.

Néanmoins, dans la plupart des modèles utilisés, l'hypertrophie est souvent liée à une hypertension sous-jacente. Afin de pouvoir dissocier ces deux caractères l'un de l'autre, de nouvelles souches de rats consanguins ont été développées à partir de croisements F2 entre les souches WKY (Wistar Kyoto) normotendus et SHR hypertendus. Les deux nouvelles souches de rats consanguins créées sont les souches WKHA (hyperactif mais non hypertendu) et WKHT (hypertendu mais non hyperactif)<sup>161,162</sup>. Les rats WKHA constituent une souche intéressante; il s'agit du premier modèle animal connu possédant une masse cardiaque plus élevée que les WKY mais une tension artérielle similaire<sup>163</sup>. Ces deux souches ont permis l'étude de déterminants génétiques à l'origine des différences de masse cardiaque indépendamment de l'hypertension<sup>164</sup> (et données non publiées). Elles présentent aussi des différences au niveau de la morphologie des cardiomyocytes. Les mâles WKHA ont des cardiomyocytes plus larges que les mâles WKY, sans différence de longueur, et les femelles WKHA présentent des cardiomyocytes moins longs que les femelles WKY, sans différence de largeur<sup>43,163</sup>. L'implication de la morphologie de base du myocarde et des cardiomyocytes dans la réponse hypertrophique suite à un stimulus n'est pas encore bien caractérisée. Ces deux souches et les différences qu'elles possèdent au niveau morphologique permettent d'étudier cette implication.

### 2.2.2 Les lignées congéniques

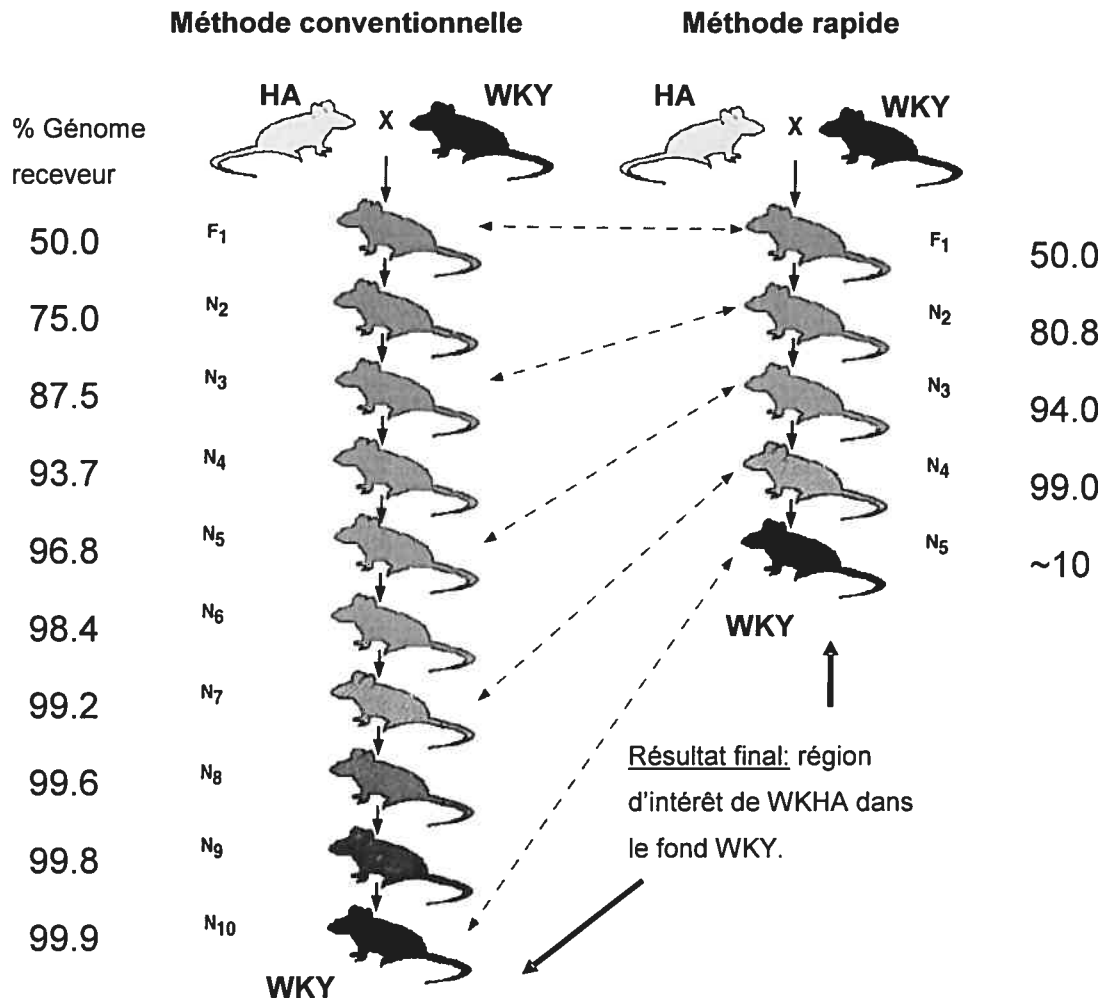
Les lignées congéniques, à partir de croisements sélectifs, visent à transférer une région d'intérêt d'une souche de rat possédant un certain phénotype dans le génome d'une seconde souche possédant un phénotype différent <sup>152,165</sup>. Les animaux sont identiques pour tous les chromosomes, excepté une région du génome sélectionnée. Ces lignées visent à valider l'implication de la région d'intérêt dans la différence de phénotype entre les deux souches et permettent de raffiner la carte génétique de la région chromosomique impliquée.

Le criblage du génome des individus de la génération F2 du croisement entre les rats WKY et WKHA a permis d'identifier une région d'intérêt sur le chromosome 5 associée à la masse du ventricule gauche et à la concentration ventriculaire en ANF chez les mâles et uniquement à cette dernière variable chez les femelles <sup>142</sup>. Il s'est avéré que cette région contenait un gène candidat de premier ordre : le gène *Nppa*, qui code pour le précurseur de l'ANF <sup>142</sup> (et données non publiées). Le rôle de l'ANF dans l'hypertrophie cardiaque a déjà été démontré puisqu'une faible concentration en ANF est génétiquement liée à une masse ventriculaire élevée et vice-versa dans les croisements F2 issus des souches WKY et WKHA <sup>164</sup>, et son rôle protecteur contre l'HVG est clairement établi <sup>166-171</sup>.

Des lignées congéniques contenant la région d'intérêt du chromosome 5 ont été créées à partir des souches WKY et WKHA afin de valider l'implication du gène candidat dans la détermination de la masse cardiaque et de préciser la région du génome qui y est associée. Ces lignées sont les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) et les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) contenant respectivement un fragment du génome de la souche WKHA dans celui de la souche WKY et un fragment de la souche WKY dans celui de la souche WKHA (Fig 2). Elles présentent les mêmes différences dans les dimensions des cardiomyocytes que les souches parentales pour les mâles mais pas pour les femelles <sup>43</sup>. Ceci suggère que le locus du chromosome 5 détermine certaines caractéristiques des cardiomyocytes (au niveau de la largeur puisque les mâles diffèrent pour ce trait) et de la masse cardiaque chez les mâles mais pas chez les femelles. L'utilisation des mâles des deux lignées congéniques représente un intérêt dans l'étude

de l'HVG afin de déterminer si cette région du chromosome 5 aurait un rôle à jouer dans l'implication de la morphologie de base du myocarde sur l'HVG et ses conséquences sur le remodelage cardiaque.

Figure 2. Méthode d'obtention de lignées congéniques.



modifié de Paul Markel et al. <sup>172</sup>.

### 3. Implication de l'environnement stéroïdien dans l'hypertrophie

#### 3.1 Stéroïdes endogènes

##### 3.1.1 Dimorphisme sexuel

Les hommes et les femmes n'ont pas la même susceptibilité aux maladies. Par exemple, les femmes sont plus affectées que les hommes par l'ostéoporose, la dépression, l'asthme, le cancer des poumons lié à la cigarette et les maladies auto-immunes. D'un autre côté, l'incidence et la sévérité des maladies cardio-vasculaires sont plus faibles chez les femmes préménopausées que chez les hommes du même âge, même après correction pour plusieurs facteurs de risque <sup>173-177</sup>. Par contre, la prévalence de l'HVG semble être la même entre les deux sexes avant la ménopause chez la femme (16% chez les hommes et 19% chez les femmes) <sup>178</sup>. D'après « *The Statistical Abstract of the United States* », il y a 39% plus d'hommes que de femmes touchés par la défaillance cardiaque causée par l'hypertension entre 45 et 64 ans <sup>179</sup>. Dans l'étude « *The Framingham Heart Study* », le taux de survie sur une période de 5 ans après diagnostic d'une défaillance cardiaque est de 25% pour les hommes contre 38% pour les femmes <sup>180</sup>. Cependant, après l'âge de 65 ans, le nombre de femmes qui meurent de maladies cardio-vasculaires excède celui des hommes de 22% <sup>179</sup> et l'effet cardioprotecteur qui leur était conféré semble perdu <sup>181</sup>.

Au niveau du système cardio-vasculaire, les femmes ont une meilleure contractilité, des fractions d'éjection et de raccourcissement du VG plus grandes (indices indépendants de la taille de la cavité) <sup>182-187</sup>, ainsi qu'une élasticité artérielle <sup>188</sup> et une épaisseur de la paroi plus grandes comparées aux hommes <sup>183,185,189</sup>. Ces derniers ont une contractilité plus faible, une dilatation de la cavité et une paroi plus mince <sup>183,189</sup>. En résumé, les femmes possèdent une meilleure fonction systolique du VG et une moins grande compliance diastolique que les hommes même après normalisation pour le poids du corps <sup>188</sup>. Chez les patients atteints de cardiomyopathie ischémique, l'hypertrophie du

myocarde est moins grande chez les femmes que chez les hommes <sup>190</sup>. Les femmes semblent posséder une réserve adaptative pour l'hypertrophie ce qui permet de retarder l'apparition de la défaillance <sup>185,191</sup>. Au niveau du remodelage, elles développent de l'hypertrophie concentrique en réponse à l'hypertension alors que les hommes sont plus enclins à développer une hypertrophie excentrique <sup>192</sup>.

Chez l'animal, les femelles présentent une meilleure adaptation à la surcharge de pression, avec un plus grand degré d'hypertrophie concentrique que les mâles <sup>34,193</sup> et une meilleure préservation de la fonction du VG <sup>194,195</sup>. Dans le cas de la surcharge de volume, les femelles présentent également une dilatation moins prononcée et une mortalité négligeable en comparaison aux mâles pour une HVG comparable (3% de mortalité vs 25% chez les mâles après 8 semaines de fistule AV) <sup>196</sup>. Le développement d'une hypertrophie plus concentrique chez ces femelles pourrait jouer un rôle protecteur en diminuant le stress systolique accompagnant la surcharge de volume <sup>34,196</sup>. Chez les rats SHHF également, la transition vers la défaillance cardiaque est retardée et la dysfonction ventriculaire est moins prononcée chez les femelles <sup>197</sup>. En résumé, quelque soit le modèle hypertrophique utilisé (surcharge de pression, de volume, infarctus du myocarde <sup>198</sup>, défaillance cardiaque <sup>197</sup>), les mâles présentent un pronostic moins favorable que les femelles.

### 3.1.2 Hormones sexuelles

Les hormones sexuelles mâles et femelles, sont des cibles intéressantes pour expliquer ce dimorphisme sexuel. Au niveau du développement, il n'y a pas de différence statistique dans la masse cardiaque entre les sexes avant la puberté, <sup>199,200</sup> alors qu'après la puberté, la masse absolue du cœur est de 25 à 35% plus grande chez l'homme <sup>199</sup>. Les deux sexes partent avec le même nombre et la même taille de cellules, mais, chez les hommes, il y a un plus fort degré d'hypertrophie des cardiomyocytes pendant la puberté. D'autre part, après la ménopause, les femmes perdent leur protection contre les maladies cardio-vasculaires <sup>179,181</sup>. L'étude « *The Framingham Heart Study* »

a démontré qu'après l'âge de 60 ans, la prévalence de l'HVG chez les femmes augmentait de 69% par décennie comparativement à seulement 15% chez les hommes<sup>178</sup>. La prévalence de l'HVG chez les femmes passe de 4.6% à l'âge de 30 ans à 49% à 70 ans<sup>178</sup>. D'autre part, l'étude « *The Nurse's Health Study* » a démontré que les HRTs administrées aux femmes post-ménopausées diminuaient de moitié le risque de maladies cardio-vasculaires (diminution de 35% de la mortalité associée à ces maladies)<sup>201</sup>. Les HRTs diminuent également la masse cardiaque<sup>202,203</sup>. Néanmoins, les études WHI<sup>204</sup> et HERS<sup>205</sup> n'ont pas trouvé de résultats concluants concernant un effet cardioprotecteur associé aux HRTs, et ont même démontré une augmentation des risques liés aux maladies cardio-vasculaires la première année du traitement, ce qui démontre que les HRTs possèdent également des effets néfastes. Cependant, les hormones sexuelles semblent incriminées dans la différence de masse cardiaque et de prévalence des maladies cardio-vasculaires chez l'humain.

La présence des récepteurs aux œstrogènes<sup>206</sup> et aux androgènes<sup>207,208</sup> a été démontrée dans le myocarde. Chez l'animal, l'ovariectomie augmente le poids du cœur<sup>209,210</sup> alors que l'administration d'œstrogènes restaure la fonction ventriculaire et le poids du cœur à la normale<sup>211,212</sup>. De même, des remplacements d'œstradiol restaurent toutes les altérations de la fonction cardiaque observées avec la gonadectomie (diminution de la fonction contractile des cardiomyocytes, de la vitesse de relaxation/raccourcissement et du ratio SERCA2a/PLB, augmentation du calcium intracellulaire)<sup>213</sup>. Les œstrogènes peuvent aussi affecter la fonction cardiaque de manière indirecte en augmentant la production de NO<sup>214-217</sup> ou en affectant le profil des lipides<sup>204,205,218</sup>. De plus, ils préviennent l'apoptose<sup>219</sup> et affectent la croissance des fibroblastes mais à ce niveau des études ont montré une inhibition<sup>220</sup>, une stimulation<sup>221</sup> ou aucun effet sur la croissance des fibroblastes<sup>222,223</sup>. L'ensemble de ces données suggère un rôle des œstrogènes dans le processus de remodelage cardiaque. Van Eickels et al. ont démontré que des doses physiologiques de 17β-estradiol atténuent de façon modeste, mais significative, le développement de l'hypertrophie due à la surcharge de pression<sup>224</sup>. Ceci serait dû à un effet direct sur le cœur puisque, dans cette étude, l'estradiol n'affecte ni la pression artérielle, ni les fibroblastes cardiaques. Les auteurs

suggèrent que le léger effet protecteur du  $17\beta$ -estradiol pourrait être médié par l'intermédiaire de l'ANF ou par les voies p38-MAPK<sup>224</sup>. En effet, cet œstrogène inhibe la phosphorylation de p38-MAPK<sup>224</sup>, l'activation de cette voie étant importante dans le maintien de la réponse hypertrophique à long terme<sup>68,70,225</sup>. D'autre part, les œstrogènes augmentent l'expression d'ARNm de l'ANF ainsi que sa concentration dans le myocarde<sup>224,226-228</sup> et l'effet protecteur de l'ANF contre l'hypertrophie est maintenant établi<sup>164,169-171</sup>. Babiker et al. ont récemment démontré que le rôle anti-hypertrophique des œstrogènes sur des cardiomyocytes néonataux est dépendant de l'ANF et de la voie liée au GMPc et que les œstrogènes, via une activation des ERs, modulent la transcription de l'ANF en agissant sur son promoteur proximal<sup>226</sup>. Parmi d'autres effets, les œstrogènes pourraient agir via le système rénine-angiotensine puisqu'ils diminuent l'expression des récepteurs AT1<sup>229,230</sup> et de l'ACE<sup>231</sup> impliqués dans la réponse hypertrophique et semblent permissifs pour les effets anti-hypertenseurs et anti-hypertrophiques d'un inhibiteur de l'ACE<sup>232</sup>. Parmi d'autres modèles d'hypertrophie, des suppléments de  $17\beta$ -estradiol préviennent le développement de l'HVG et de l'hypertension chez les rats SHHF<sup>231</sup> et l'ovariectomie provoque une dilatation ventriculaire plus prononcée suite à la surcharge de volume<sup>233</sup>. Cependant, dans le cas de l'infarctus du myocarde, il a été démontré que les œstrogènes inhibent la dilatation du myocarde<sup>234</sup> mais parallèlement augmentent la mortalité post-chirurgie<sup>234,235</sup>. La taille de la zone infarctée peut être augmentée<sup>234</sup>, diminuée<sup>235</sup> ou inchangée<sup>236</sup>. Enfin, il existe des évidences qui montrent que des concentrations physiologiques d'œstrogènes n'ont aucun effet majeur sur le développement de l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction et la dilatation post-infarctus<sup>236</sup>.

La différence de masse cardiaque qui existe entre les deux sexes apparaît à la puberté avec une hypertrophie des myocytes chez l'homme, ce qui semble impliquer les androgènes dans ce processus. Cependant, il existe peu d'études en rapport avec les androgènes et la masse cardiaque et/ou le remodelage du myocarde. Chez le mâle, la castration diminue le poids du cœur<sup>209-211</sup>. Au niveau cellulaire, la castration diminue la taille des cardiomyocytes alors que la testostérone l'augmente<sup>237</sup>. Les androgènes sont capables d'augmenter la synthèse protéique dans le cœur<sup>238</sup> et de produire une HVG<sup>208</sup>.



Il a été prouvé que la testostérone pouvait réguler l'expression de la chaîne lourde de la myosine <sup>239</sup>, ce qui démontre que les hormones mâles peuvent intervenir dans la régulation de l'expression des gènes reliés à l'hypertrophie. Enfin, Li et al. ont montré récemment l'implication des androgènes dans l'hypertrophie et la fibrose chez des mâles GC-A KO <sup>240</sup>. Le GC-A est le récepteur des peptides natriurétiques ANF et BNP. Ces mâles développent une plus grande hypertrophie que les femelles GC-A KO et cette différence est perdue avec la castration ou un antagoniste des AR. Enfin, étant donné que ce dimorphisme sexuel existe chez les souris KO mais pas chez les WT, les auteurs ont démontré que les androgènes produisent l'HVG via une régulation positive du système angiotensine en activant le récepteur AT1A, et que cette voie est normalement inhibée par les peptides natriurétiques via leur récepteur GC-A <sup>240</sup>.

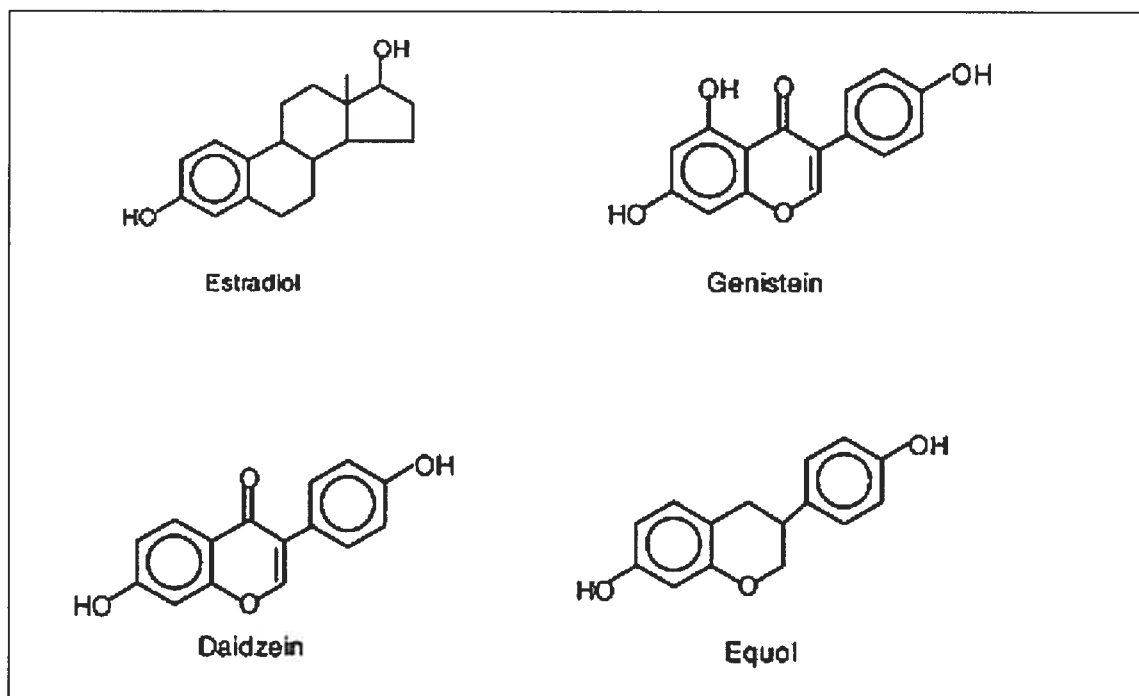
En résumé, la testostérone ou l'ovariectomie semblent augmenter l'hypertrophie cardiaque et aggraver la dysfonction ventriculaire alors que l'orchidectomie semble la diminuer. Certaines études ont montré que les hormones sexuelles mâles et femelles possèdent des effets opposés, les œstrogènes (endogènes ou en supplément) sembleraient prévenir un remodelage cardiaque inadéquat et la détérioration de la performance cardiaque alors que la testostérone (endogène ou en supplément) posséderait des effets inverses <sup>237,241</sup>. Néanmoins, en ce qui concerne les œstrogènes, les données ne vont pas toutes dans le même sens comme le prouvent les études mentionnées plus haut chez l'humain avec les thérapies d'hormones de remplacement et chez le rat avec des suppléments d'œstradiol qui démontrent des effets néfastes des œstrogènes. Ces observations résument bien le fait que les hormones sexuelles mâles et femelles ont un rôle important à jouer dans le processus de remodelage cardiaque, même si ce rôle n'est pas encore bien défini.

### 3.2 Stéroïdes exogènes : Les phytoœstrogènes

#### 3.2.1 Composés

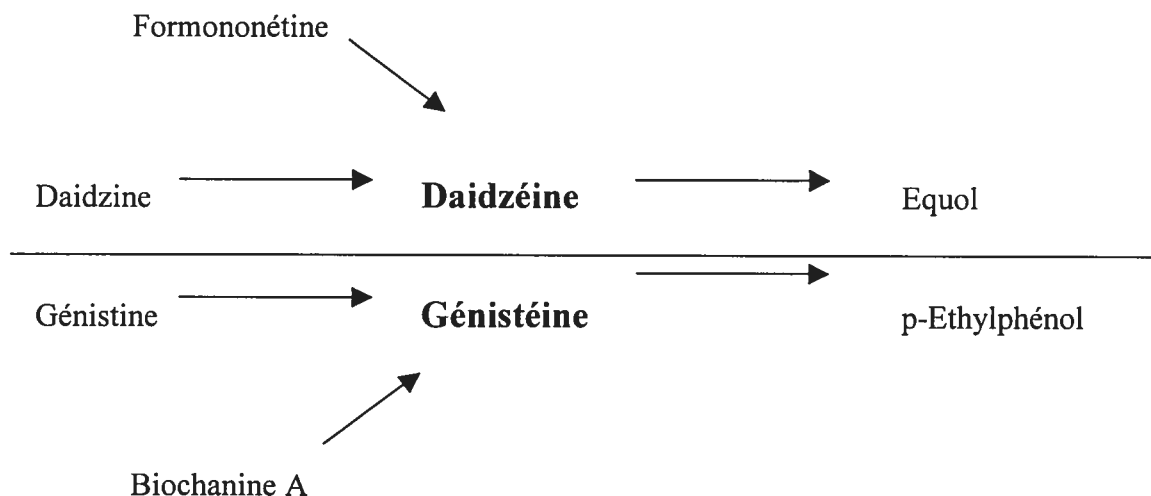
Les phytoestrogènes sont des composés œstrogéniques retrouvés dans les plantes. Ils sont ubiquitaires dans le règne végétal. Le premier article rapportant des effets œstrogéniques chez les plantes date de 1926<sup>242</sup>. L'activité œstrogénique des PE a réellement été découverte dans les années 1940, avec le rapport en Australie de la diminution de la fertilité chez les brebis se nourrissant dans les pâturages riches en trèfle, connu plus tard sous le nom de « *Clover Disease* »<sup>243</sup>. En 1954, Bradbury et White ont répertorié 53 plantes possédant une activité œstrogénique suffisante pour initier l'œstrus chez l'animal<sup>244</sup>. Cette liste a été étendue à plus de 300 plantes par Farnsworth et al.<sup>245</sup>. Les PE sont divisés en trois classes principales : les isoflavones, les coumestrans et les lignans. Tous sont des composés diphenoliques comportant des similarités de structure avec les œstrogènes et les anti-œstrogènes naturels ou synthétiques (Figure 3). Les principaux composés de la classe des isoflavones sont la génistéine, la daidzéine, l'équol, la formononétine et la biochanine A.

Figure 3. Structure des phytoestrogènes en comparaison à l'œstradiol.



Kurzer M.S. et Xu X.<sup>246</sup>

### 3.2.2 Métabolisme



Les voies métaboliques de ces composés chez l'humain ont été proposées originellement par Setchell et Adlecreutz<sup>247</sup>. Chaque composé peut être retrouvé sous quatre formes différentes : la forme non conjuguée (ou aglycone), les glycosides, les acétylglycosides et les malonylglycosides. La plupart des PE provenant de l'alimentation sont sous forme de glycosides (génistine et daidzine) et sont inactifs. Ceux-ci sont hydrolysés par l'acide gastrique, puis biotransformés par les glucosidases  $\beta$  bactériennes de l'intestin qui relâchent les aglycones (génistéine et daidzéine). Une fois absorbés dans l'intestin grêle, les isoflavones sont conjugués par le foie avec l'acide glucuronique ou sulfurique<sup>248</sup>. Ces formes-là sont plus solubles mais elles ne sont pas actives<sup>249</sup>, contrairement à la forme aglycone. Une faible portion de la forme aglycone est détectée dans le sang, ce qui montre un fort taux de conjugaison<sup>248</sup>. La fraction glucuronique, qui est le conjugué prédominant, représente 90% des isoflavones circulants chez le rat<sup>250</sup> et chez l'humain<sup>251</sup>. Ces composés sont ensuite excrétés par l'urine ou la bile. L'intestin et le foie ont donc un rôle important dans la biodisponibilité des PE et leur excrétion.

La génistéine est transformée en dihydrogénistéine puis en 6'-hydroxy-O-DMA et en p-éthyl phénol<sup>252,253</sup>. La daidzéine est métabolisée en dihydrodaidzéine puis en équol et O-desméthylangolensine (O-DMA)<sup>252,254-256</sup>. Mais, chez les humains, seulement 33% des individus sont capables de métaboliser la daidzéine en équol, dépendamment de la

composition de la flore bactérienne intestinale <sup>254,257,258</sup>. Dans l'urine et le plasma, on retrouve la génistéine, la daidzéine, l'équol, la formononétine, la dihydrodaidzéine, le p-éthyl phénol et le O-DMA <sup>252,254,255,259-261</sup>. La demi-vie de la génistéine et de la daidzéine est de 7.9 h chez l'adulte. Les pics de concentration apparaissent entre 6 et 8 h après administration des composés <sup>262</sup>.

### 3.2.3 Présence dans l'alimentation

#### 3.2.3.1 Chez l'humain

La principale source alimentaire d'isoflavones chez l'humain est la fève de soya <sup>263,264</sup>. Les trois principaux isoflavones présents dans le soya sont la génistéine, la daidzéine et la glycitéine <sup>265-267</sup>. Depuis des siècles, le soya fait partie de l'alimentation de plusieurs pays. Dans les pays asiatiques, ce sont les japonais qui présentent la consommation d'isoflavones issus du soya la plus élevée avec des valeurs allant jusqu'à 100 mg/jour (10% de la population) <sup>268</sup>. Plusieurs études épidémiologiques ont déterminé la consommation quotidienne d'isoflavones dans ces populations : Nakamura a estimé le contenu moyen en isoflavones chez les japonais autour de 27.8 mg/jour <sup>269</sup>, Nagata et al. à 20-50 mg/jour (moyenne à 28.7 mg/jour) <sup>270</sup>, Wakai et al. à 31.7 mg/jour <sup>271</sup> et Kim et al. à 14.9 mg/jour pour Hong Kong <sup>272</sup>. En moyenne, la population asiatique consomme entre 18 et 63 mg/jour d'isoflavones sous forme de glucosides <sup>268</sup>. Par contre, dans les pays occidentaux, la consommation moyenne d'isoflavones ne dépasse pas les 2 mg de glucosides/jour <sup>273-275</sup>. Chez les personnes végétariennes ou consommant des produits à base de soya, l'apport quotidien d'isoflavones est semblable à celui de la population asiatique.

Les concentrations d'isoflavones retrouvées dans le plasma, au Japon, sont de 0.1-1.2  $\mu\text{M}$  pour la génistéine et de 0.05-0.9  $\mu\text{M}$  pour la daidzéine <sup>259,276-278</sup>. Ces valeurs excèdent de plusieurs ordres de grandeur les concentrations plasmatiques d'œstradiol qui chez l'homme sont autour de 20 pg/ml et chez la femme varient entre ~40 et 500 pg/ml

suivant le cycle. Chez les végétariens, les taux circulants plasmatiques sont de 17-60 nM pour la génistéine et de 18-60 nM pour la daidzéine vs 3-6 nM et 4-9 nM respectivement chez les omnivores<sup>259,279</sup>. De manière générale, chez les occidentaux, on retrouve moins de 40 nM de génistéine et de daidzéine dans le plasma<sup>280</sup>. Adlercreutz et al. ont montré que les japonais (0.16-0.89 µM; moyenne 0.4 µM) ont des concentrations en isoflavones 7 à 110 fois supérieures à celles des finlandais (7-25 nM; moyenne 12.5 nM)<sup>278</sup>.

Les enfants nourris avec des formules à base de lait de soya reçoivent un apport quotidien en isoflavones de 4.5-8 mg/kg (28-47 mg d'isoflavones/jour) alors que chez l'adulte, les taux sont de 1 mg/kg<sup>281</sup>. Ces composés passent par le lait maternel pendant l'allaitement<sup>282,283</sup>. Une analyse d'échantillons sanguins a montré des taux plasmatiques de 2.5 µM de génistéine et de 1.2 µM de daidzéine, ce qui est largement supérieur aux taux retrouvés chez les enfants nourris avec du lait maternel ou du lait de vache (~10 nM)<sup>281-283</sup>. Les enfants sont donc capables de digérer et d'absorber les PE sous une forme active<sup>284</sup>. De plus, les enfants en Asie naissent avec les mêmes taux plasmatiques de PE que leurs mères, indiquant un transfert par le placenta pendant la gestation<sup>285</sup>. L'enfant peut donc être exposé dès son plus jeune âge et surtout pendant son développement à de fortes concentrations en PE.

### 3.2.3.2 Chez le rat

S'il est connu que les isoflavones sont largement présentes dans le plasma et l'urine de l'humain consommant régulièrement des produits du soya, peu de gens sont conscients que les nourritures commerciales pour rongeur sont formulées avec du soya et que de fortes concentrations plasmatiques d'isoflavones se retrouvent chez ces animaux. En effet, plusieurs isoflavones sont retrouvés dans la nourriture donnée aux rongeurs, le soya étant utilisé comme source de protéines<sup>286-290</sup>. Les concentrations varient suivant les fournisseurs mais sont généralement assez élevées pour pouvoir exercer des effets physiologiques dans plusieurs modèles animaux. Des études sur le contenu en isoflavones de ces nourritures ont été faites aux Etats-Unis<sup>287-289</sup>, en Grande-

Bretagne<sup>291</sup> et en Allemagne<sup>286</sup>. En plus de la variation entre fournisseurs, ce contenu varie d'un lot de nourriture à un autre au sein d'un même fournisseur<sup>289,292</sup>. Selon la provenance de l'alimentation, les concentrations d'isoflavones se situent entre 100 et 830 µg/g de nourriture<sup>286-289</sup> et sont directement proportionnelles au contenu en protéines de soya<sup>288,289</sup>. Le contenu en génistéine varie de 70 à 330 µg/g et celui en daidzéine varie de 75 à 280 µg/g<sup>287-289</sup>.

Les taux plasmatiques d'isoflavones totaux chez les animaux consommant une alimentation avec PE se situent autour de 2.6 µg/ml<sup>288</sup>. La concentration en génistéine varie de 0.37 µM à 0.62 µM et celle en daidzéine varie de 0.25 µM à 0.41 µM<sup>286,293</sup>. Les variations sont dues aux contenus différents en isoflavones de chaque nourriture et aux cinétiques différentes selon la souche étudiée. Chez les animaux maintenus sur une diète exempte de PE, les concentrations de génistéine et de daidzéine peuvent être aussi basses que 20 ng/ml de plasma<sup>286</sup>.

Chez les rats néonataux n'ayant pas encore absorbé de lait maternel, on retrouve des concentrations en isoflavones très élevées (903 ng/ml composés de 44% de génistéine, 37% d'équol et 19% de daidzéine)<sup>288</sup>. Ceci est dû à une accumulation prénatale par transfert de la mère au fœtus pendant la gestation chez le rat<sup>288,294</sup>. D'autre part, des concentrations élevées d'isoflavones se retrouvent dans le plasma de la progéniture avant leur sevrage. Tout comme chez l'humain, les isoflavones passent par le lait de la mère consommant une alimentation riche en PE, créant une accumulation de ces composés chez les ratons<sup>295-297</sup>.

### 3.2.4 Mécanismes d'actions

Les principaux composés de la famille des isoflavones à posséder des effets biologiques sont la génistéine, la daidzéine ainsi que l'équol, métabolite de la daidzéine. Très peu d'attention est portée au métabolisme des isoflavones et à l'activité biologique de ces métabolites. Cependant, il a déjà été montré que l'équol a une activité

œstrogénique <sup>256,298,299</sup> et semble même posséder plus d'affinité pour les récepteurs œstrogéniques que la daidzéine <sup>300</sup>, et que des métabolites des isoflavones peuvent avoir des propriétés antioxydantes <sup>301</sup>.

Les PE possèdent une activité œstrogénique <sup>302-305</sup>. Ils sont capables de lier les récepteurs œstrogéniques ER $\alpha$  et ER $\beta$  <sup>298,300,306,307</sup> dont la présence est démontrée dans le myocarde <sup>206</sup>. Ces composés possèdent un anneau phénolique pré-requis pour leur liaison aux récepteurs œstrogéniques <sup>306</sup>. Ils peuvent agir comme agoniste ou comme antagoniste œstrogénique <sup>308</sup>. Leurs actions au niveau cellulaire et moléculaire sont influencées par plusieurs facteurs, incluant leur concentration, le statut du récepteur, la présence ou l'absence d'œstrogènes endogènes et le type d'organe ou de cellule cible. La génistéine est 10 fois plus puissante que la daidzéine et les deux composés sont 10 à 25 fois plus puissants pour le récepteur ER $\beta$  vs ER $\alpha$  <sup>306,309</sup>. Cependant, la puissance de la génistéine est 3 fois plus faible que celle de l'œstradiol pour ER $\beta$  et 100 fois plus faible pour ER $\alpha$ . Pour la daidzéine, elle est 60 fois plus faible pour ER $\beta$  et 1000 fois plus faible pour ER $\alpha$  par rapport à l'œstradiol <sup>309</sup>.

En ce qui a trait à l'efficacité d'action des isoflavones par rapport aux œstrogènes endogènes, les PE ont une activité œstrogénique de l'ordre de 100 à 1000 fois plus faible que celle du 17 $\beta$ -œstradiol <sup>310</sup>. Cependant, l'œstradiol est principalement lié à la SHBG et à l'albumine sérique alors que les isoflavones, beaucoup moins liés aux protéines sériques, sont plus disponibles pour les récepteurs <sup>311</sup>. D'autre part, les concentrations plasmatiques d'isoflavones mesurées chez le rat adulte <sup>288</sup> ou chez l'humain <sup>278</sup> consommant des PE excèdent les concentrations d'œstrogènes endogènes de plusieurs ordres de grandeur. Les isoflavones possèdent beaucoup moins d'affinité que l'œstradiol pour les ERs mais les concentrations plasmatiques de ces composés sont respectivement 10 à 100 fois plus élevées que les valeurs EC<sub>50</sub> des récepteurs ER $\beta$  et ER $\alpha$  du rat ou de l'humain <sup>306,309</sup>, ce qui les rend susceptibles d'exercer des effets biologiques par l'intermédiaire de ces récepteurs.

Enfin, certains isoflavones possèdent d'autres mécanismes d'action. La génistéine est reconnue pour être un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinases (exceptée la protéine tyrosine kinase p40) <sup>312,313</sup>. Elle agit aussi comme inhibiteur sur d'autres enzymes comme l'ADN topoisomérase I et II <sup>314,315</sup> et l'histidine kinase <sup>316</sup>. La génistéine est aussi capable d'inhiber le cycle cellulaire <sup>317,318</sup>, de provoquer l'apoptose <sup>319</sup>, d'inhiber l'angiogénèse <sup>320</sup> et possède une activité antioxydante <sup>321-323</sup>.

### 3.2.5 Effets cardio-vasculaires

Plusieurs études épidémiologiques ainsi que des données expérimentales attribuent aux isoflavones une diminution de risques liés à certaines maladies ainsi qu'un effet bénéfique sur la santé <sup>277,324-327</sup>. D'autre part, les japonais qui consomment plus de soya ont une incidence plus faible de cancer de la prostate <sup>276,328,329</sup>, du sein <sup>276,330-332</sup> et du colon <sup>333</sup> ainsi que des maladies cardio-vasculaires <sup>334</sup>. De plus, les asiatiques, immigrant dans les pays occidentaux et adoptant une nourriture contenant moins d'isoflavones, perdent leur protection contre ces maladies <sup>330,331,335-337</sup>. La « *Food and Drug administration* » recommande de manger 25 g de protéine de soya par jour avec une alimentation faible en cholestérol et acides gras saturés pour diminuer les risques de maladies cardio-vasculaires <sup>338</sup>.

Chez les femmes postménopausées, les HDL diminuent et les LDL augmentent, ce qui favorise les risques de maladies cardio-vasculaires, en particulier l'athérosclérose <sup>339</sup>. Plusieurs études ont démontré une diminution du taux de cholestérol avec une alimentation riche en soya chez l'humain <sup>340-344</sup> ainsi que chez l'animal <sup>345,346</sup> (diminution du ratio cholestérol total/HDL de 20% chez les rats mâles et de 50% chez les femelles) <sup>347</sup> et cette relation semble dépendante de la dose <sup>348,349</sup>. Deux études principales ont démontré le rôle hypocholestérolémiant du soya. Carroll et al., en révisant deux douzaines d'études chez des personnes ayant un cholestérol normal ou élevé, ont démontré une diminution du cholestérol total avec une substitution des protéines animales par des protéines de soya <sup>350</sup>. Anderson et al. ont effectué une méta-



analyse de 38 études qui avaient examiné l'utilisation de protéines de soya afin de diminuer le cholestérol chez l'humain <sup>351</sup>. Trente-quatre des 38 études montrent une amélioration du profil des lipides; une ingestion de 31 à 47 g de protéines de soya par jour diminue les concentrations de cholestérol sérique total de 9.3%, les LDL de 12.9% et les triglycérides de 10.5% et les PE comptent pour 60-70% des effets observés <sup>351</sup>. Néanmoins, toutes les études ne s'entendent pas quant à savoir si les isoflavones sont responsables des propriétés hypocholestérolémiantes associées aux protéines de soya, certains ne trouvant aucun effet des isoflavones sur le taux de cholestérol <sup>352-354</sup>. Il a néanmoins été démontré que des suppléments de protéines du soya sans isoflavones n'ont aucun effet sur le taux de cholestérol chez l'homme <sup>349,355</sup>, le singe <sup>347,356</sup> ou la souris <sup>357</sup>. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme d'amélioration du profil des lipides par les PE mais aucune ne semble privilégiée à ce jour <sup>350,358</sup>.

Les isoflavones pourraient jouer un rôle dans la diminution des risques associés à l'athérosclérose par leur effet sur le métabolisme des lipides <sup>349</sup>, leur activité antioxydante <sup>359</sup> ainsi que la réduction de la formation de thrombus <sup>360</sup> et l'amélioration de la compliance vasculaire <sup>361</sup> qu'ils produisent. Anthony et al. ont montré qu'une alimentation à base de soya contenant des PE diminuait les lésions athérosclérotiques de 90% par rapport à une alimentation sans protéines de soya et de 50% par rapport à une diète sans PE <sup>356</sup>. Cependant, l'amélioration du profil des lipides et la diminution des risques liés à l'athérosclérose par les isoflavones ne peuvent expliquer à eux seuls la diminution de l'incidence des maladies cardio-vasculaires observée avec une alimentation riche en soya.

En ce qui a trait aux effets directs des PE sur le cœur, il existe très peu d'études. La génistéine semble limiter la réponse inflammatoire <sup>362</sup>, réduire l'apoptose et la taille de la zone infarctée dans le myocarde soumis à un épisode d'ischémie-reperfusion <sup>363</sup>. Zhai et al. ont également montré que la génistéine et la daidzéine possèdent un effet cardioprotecteur en préservant la structure myocardique et en améliorant la fonction après 30 min d'ischémie via un mécanisme en partie dépendant des récepteurs

œstrogéniques (relâche de NO et préservation de la structure mitochondriale)<sup>364</sup>. Il a aussi été montré que la génistéine inhibe les canaux calciques de type L dans les cardiomyocytes en diminuant la probabilité d'ouverture sans en affecter le temps d'ouverture ou la conductance<sup>365-369</sup>. Elle semble agir en partie via une inhibition des protéines tyrosine kinases<sup>365,368</sup> mais d'autres mécanismes sont en cause puisque la daidzéine<sup>369</sup> et l'équol<sup>370</sup> aussi peuvent inhiber les canaux calciques. L'effet cardioprotecteur de la génistéine durant l'ischémie semble médié en partie par son inhibition des canaux calciques, empêchant ainsi une surcharge de calcium sur le myocarde<sup>364</sup>. La génistéine est également capable d'inhiber les canaux potassiques<sup>371</sup>. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur l'influence possible des PE sur la morphologie de base du myocarde et leur implication dans le remodelage cardiaque et la réponse hypertrophique.

#### **4. Projet de recherche**

Des observations faites avant mon arrivée dans le laboratoire ainsi que des analyses préliminaires utilisant les deux souches de rat WKY et WKHA (normotendus mais présentant des différences de masse cardiaque) nous avaient montré que : 1) la longueur et la largeur des cardiomyocytes adultes isolés variaient (de façon non proportionnelle) en fonction de la souche d'origine; 2) dans les 2 souches, les cardiomyocytes de rats femelles étaient toujours plus courts que ceux des mâles de la même souche ; 3) la castration des mâles ou des femelles faisaient disparaître les différences qui existaient au niveau de la morphologie des cardiomyocytes; et 4) les cardiomyocytes de rats nourris avec une alimentation riche en PE étaient beaucoup plus courts que ceux des rats nourris avec une diète exempte de PE . Ces données suggéraient que des interactions spécifiques entre les allèles de certains gènes et le sexe des rats régulent la largeur et la longueur des cardiomyocytes de façon indépendante et distincte et que certains composés présents dans la nourriture (les phytoœstrogènes) influencent également ces caractéristiques.

Notre premier objectif a été de déterminer la fenêtre de temps responsable du raccourcissement des cardiomyocytes par les PE présents dans l'alimentation. Des gavages de composés phytoestrogéniques présents dans la nourriture (génistéine ou daidzéine) pendant cette fenêtre de temps ont ensuite été utilisés afin de déterminer si l'un ou l'autre de ces composés pouvait expliquer l'effet observé sur les cardiomyocytes. D'autre part, plusieurs études suggèrent que la longueur des cardiomyocytes constitue un facteur important dans la dilatation ventriculaire et la sensibilité à la décompensation cardiaque en présence de surcharge hémodynamique. Afin de vérifier si cette hypothèse est vraie, des animaux exposés ou non aux PE dans l'alimentation ont été soumis à une surcharge de volume en créant chirurgicalement une fistule aorto-veineuse et évalués de façon hémodynamique et histologique 12 semaines après la chirurgie. Enfin, pour vérifier si des loci chromosomiques influençant la morphologie des cardiomyocytes ont également un impact fonctionnel, les souches de rats WKHA et WKY ainsi que les lignées congéniques présentant des différences au niveau de cette caractéristique phénotypique ont été soumis également à une surcharge de volume.

Ces expériences ont abouti à la caractérisation de plusieurs modèles de rats où la longueur des cardiomyocytes varie en fonction du contexte hormonal et/ou génétique afin de vérifier si, comme des études précédentes le suggèrent, la longueur de ces cellules corrèle avec la sensibilité à la défaillance cardiaque. Les études proposées visent à élaborer des modèles animaux qui permettront par la suite l'identification de gènes liés à des différences de susceptibilité à la réponse hypertrophique. De plus, cette approche expérimentale nous a permis de tester l'effet de l'environnement stéroïdien exogène (exposition par l'alimentation) sur les caractéristiques morphologiques des cardiomyocytes et son impact au niveau fonctionnel sur le myocarde. Ce dernier point est d'un intérêt clinique important par extension à l'humain puisqu'il soulève la question de savoir si une alimentation avec un contenu élevé en PE serait un facteur de protection contre la décompensation cardiaque qui, rappelons-le, atteint des proportions épidémiques et est l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés.

## Chapitre 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Animaux

Toutes les expérimentations effectuées sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et ont été menées en suivant les lignes directrices du « *Canadian Council on Animal Care* ». La nomenclature des lignées et des souches suit les recommandations du « *International Rat Genetic Nomenclature Committee* ». Les rats WKHA/Cfd proviennent d'une colonie gérée à l'IRCM, telle qu'enregistrée au « *Institute of Laboratory Animal Resources* ». Les rats WKY/Cfd proviennent également 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 et WKHA 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). Les animaux maintenus sur la diète sans PE le sont depuis au moins deux générations. La nourriture avec PE a ensuite été réintroduite à différents âges (gestation et/ou lactation (0-3 semaines), 0-6, 0-12, 6-12 semaines). Après la période d'exposition au PE par l'alimentation, les animaux retournent sur la diète sans PE afin de s'assurer qu'ils n'ont consommé des PE que pendant la période déterminée. Tous les rats sont maintenus sur un cycle de lumière 12 :12 h, les lumières étant allumées à 6 : 00 AM. Les animaux ont été sacrifiés à 12 semaines pour la plupart des mesures.

Les lignées congéniques ont été dérivées en effectuant une série de croisements en retour entre les souches WKY et WKHA afin d'obtenir des animaux contenant l'ensemble du génome de la souche receveuse excepté la région d'intérêt du génome de la souche donneuse, c'est à dire le fragment D5Cfd50/D5Rat245 du chromosome 5 (ce

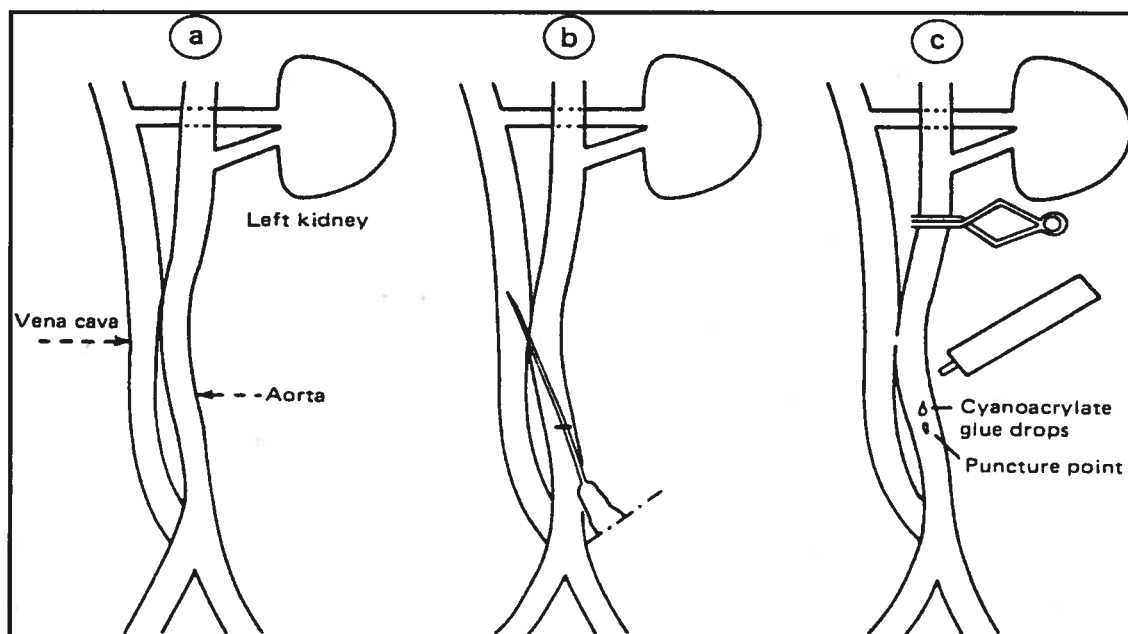
locus couvre une région de 8 millions de paires de base (~8 cM)). Les lignées obtenues sont WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) (contenant un fragment de la souche WKHA dans la souche WKY) et WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) (contenant un fragment de la souche WKHY dans la souche WKHA).

## 2. Expérimentations sur les animaux

### 2.1 Fistule aorto-veineuse

Une fistule aorto-veineuse (AV) abdominale infrarénale a été effectuée en utilisant la méthode de Garcia et Diebold comme décrite précédemment (Fig 2.)<sup>35,99</sup> sur les rats mâles et femelles suivants à l'âge de 10 semaines : WKHA, WKY et WKY sur la diète sans PE ainsi que sur les lignées congéniques WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) et WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245). Cette chirurgie permet de produire une hypertrophie de type excentrique sur les animaux. Brièvement, les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane 5% à un débit de 1 L/min d'O<sub>2</sub> puis maintenus sous isoflurane 2%, et une laparotomie abdominale ventrale est faite pour exposer l'aorte et la veine cave caudale ~1.5 cm au-dessous des artères rénales là où les deux vaisseaux se touchent (Fig 2.a.). Après avoir exposé les vaisseaux, une occlusion manuelle est pratiquée sur ces derniers au-dessus et en dessous du site de la fistule. Une aiguille de calibre 18 G est insérée dans l'aorte abdominale et avancée à travers la paroi médiane dans la veine cave pour créer la fistule (Fig 2.b.). L'aiguille est ensuite retirée et le trou sur l'aorte ventrale est scellé avec du cyanoacrylate (Fig 2.c.). La création de la fistule AV est clairement visible avec le flot pulsatile de sang oxygéné dans la veine cave. Le temps d'occlusion total ne dépasse pas 5 minutes. Les incisions dans la musculature abdominale et la peau sont refermées par des techniques standard avec des points de suture non-absorbables (soie 4-0) et des « *autoclips* » respectivement. Les « *sham* » sont utilisés pour générer les animaux témoins et servent de contrôles aux animaux opérés. La procédure reste la même, incluant l'exposition des vaisseaux sauf qu'il n'y a pas de perforation de l'aorte et de la veine cave.

Figure 4 : Schéma de l'induction expérimentale de la fistule AV

Garcia R. et Diebold S. <sup>99</sup>.

Les rats sont divisés en groupes de 6 « sham » et 9 opérés. Les animaux ont été sacrifiés 12 semaines après la chirurgie pour les mâles et les femelles. Les animaux étaient donc âgés de 22 semaines. Avant d'être tués les animaux sont pesés pour détermination de leur poids corporel. Les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane 5% à un débit de 1 L/min d'O<sub>2</sub>. Après vérification de la présence de la fistule AV par inspection visuelle, le cœur est retiré rapidement et un cathéter P.E.90 est inséré dans l'aorte. Celui-ci est relié à un capteur de pression qui lui-même est relié à un système d'acquisition et d'analyse (*Powerlab ML785*, ADInstruments, Colorado Springs, Canada). Le cœur est ensuite immergé dans un Pétri contenant une solution froide de KCl 100 mM et de NaCl 50 mM et perfusé avec cette même solution pour arrêter le cœur en diastole. Une fois le cœur arrêté, le cathéter est avancé dans le ventricule gauche, attaché à l'aorte avec du fil 4-0 et une pression de 15 mmHg est établie dans la cavité du ventricule avec la solution isotonique de KCl/NaCl <sup>163</sup>. Le cathéter est ensuite coupé et scellé et le cœur est immergé dans sa forme distendue dans 15 ml d'une solution 10% formaline pour 24h, avant d'être utilisé pour étudier sa morphologie. D'autre part, les poumons et les ventricules sont pesés et leur poids est rapporté à la

longueur du tibia afin de normaliser l'excès de poids que les animaux ont pu prendre à cause de la chirurgie, et ces données seront utilisées pour évaluer le degré d'hypertrophie développé avec la chirurgie.

## 2.2 Castration et ovariectomie

Une castration a été effectuée chez les mâles WHKA et WKY. Les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane 5% à un débit de 1 L/min d'O<sub>2</sub> puis maintenus sous isoflurane 2%. La peau du scrotum est incisée sur la partie médiane, puis la tunique qui recouvre le testicule est coupée. Celui-ci est retiré de la tunique et coupé au niveau du canal déférent et des vaisseaux sanguins. Après avoir procédé de même pour le deuxième testicule, la peau est refermée avec des points simples (soie 4-0). Les ovariectomies ont été pratiquées sur les femelles des mêmes souches. L'anesthésie a été réalisée dans les mêmes conditions. La peau et la couche musculaire sont coupées sur 1.5 cm sur le flanc, sous le niveau de la cage thoracique. Après isolation de la corne utérine et de l'ovaire, une section est pratiquée entre les deux et l'ovaire est retiré. La corne utérine est remise en place, le muscle refermé avec de la soie 4-0 et la peau avec des « *autoclips* ». La même procédure est appliquée de l'autre côté de l'animal pour retirer le deuxième ovaire. Les « *sham* » sont réalisés pour générer les animaux témoins.

## 2.3 Mesures d'indices de contractilité cardiaque

Les mesures de contractilité sont effectuées sur l'animal maintenu sous anesthésie (fentanyl/dropéridol 1:1, 0.0015 mL/g) avec un cathéter Millar Mikro-Tip SPR407, taille 2F (Millar instruments Inc, Houston, TX, USA) inséré dans la carotide droite puis avancé dans la cavité du ventricule gauche. L'enregistrement du signal carotidien est d'environ 30 sec et celui du signal ventriculaire d'environ 1 min. L'acquisition des données se fait grâce au système d'acquisition de données *Powerlab ML785* (ADInstruments, Colorado Springs, Canada). La pression ventriculaire moyenne (LVP) et le rythme cardiaque sont enregistrés directement et transmis sur l'ordinateur via le système *Powerlab*. Les autres données sont ensuite calculées à partir de ces variables. La

pression ventriculaire en fin de systole (LVESP) est déterminée comme étant le minimum du cycle de la LVP et la pression ventriculaire en fin de diastole (LVEDP) comme étant le maximum du cycle de la LVP. La dérivée de la pression en fonction du temps ( $dP/dt$ ) est calculée à partir du canal LVP. Les minima et maxima sont ensuite calculés directement à partir de la courbe  $dP/dt$ . La constante de temps de la chute de pression du VG pendant la phase de relaxation isovolumétrique,  $\tau$ , est calculée directement dans le logiciel d'analyse *Powerlab ML785* (ADInstruments, Colorado Springs, Canada)<sup>372</sup> (consulter le manuel à [http://www.adinstruments.com/updates/appnotes/cfw5appnotes/Peak\\_Parameters.pdf](http://www.adinstruments.com/updates/appnotes/cfw5appnotes/Peak_Parameters.pdf)).

## 2.4 Gavage de phytoestrogènes

Des gavages ont été effectués sur les rats WKY nourris avec la diète sans PE. Six femelles ont été accouplées avec des mâles (deux femelles pour un mâle). Elles ont été gavées pour une période de 6 semaines allant du premier jour de l'accouplement jusqu'à 3 semaines après la naissance des bébés, période correspondant à la gestation et à la lactation. Deux femelles ont reçu la génistéine (LC Laboratories, Woburn, MA), deux autres la daidzéine (LC Laboratories, Woburn, MA) et les deux dernières ont reçu un véhicule, le carboxyméthylcellulose « *medium-viscosity* » (Sigma, St-Louis, MO). En assumant que la quantité de nourriture consommée par un animal est de 30 g par jour et que la nourriture Purina 5012 contient  $\sim 250 \mu\text{g}$  de génistéine ou de daidzéine par g de nourriture<sup>287,288</sup>, la dose quotidienne de chacun des composés que doivent recevoir les animaux correspond à 7.5 mg ( $250 \times 30 = 7500 \mu\text{g} = 7.5 \text{ mg}$ ). La quantité administrée a ensuite été ajustée au poids de chaque animal pendant la gestation puis à la quantité de nourriture consommée par chaque animal après la naissance des bébés. Les composés ont été dilués dans une solution de carboxyméthylcellulose 1% et administrés avec une aiguille de gavage.



### 3. Histologie et morphologie

Après 24 h de fixation dans la formaline 10%, le cœur prélevé des animaux ayant eu une fistule AV est coupé dans un plan sagittal au niveau du milieu des ventricules afin de générer une tranche de ~2 mm d'épaisseur. Des images de chaque côté des sections sont prises sous un microscope binoculaire Leica MZ12 avec un objectif 1 X-0.5 X relié à une vidéocaméra pour analyse ultérieure. Des mesures de la surface des deux ventricules, du VG et de la cavité du VG sont effectuées avec le logiciel « *Northern Eclipse* » version 6.0 de « *Empix imaging* » (Mississauga, ON, Canada). La taille du ventricule droit, l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche et l'épaisseur relative de la paroi du ventricule gauche sont déterminées à partir des données mesurées afin d'évaluer si la chirurgie créée sur les animaux a affecté la surface de la cavité, celle de la paroi ou les deux à la fois.

### 4. Isolement des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été isolés des cœurs de groupes de 6 rats mâles et 6 rats femelles de 12 semaines (excepté les rats ayant eu une fistule aorto-veineuse où les animaux ont été sacrifiés à 22 semaines) des souches WKHA et WKY. Différents groupes d'animaux ont été utilisés : avec ou sans castration (mâles et femelles), alimentation avec ou sans PE, changements d'alimentation à différents temps et administration de composés par gavage. Les cardiomyocytes sont isolés des deux ventricules. Campbell et al. a analysé la morphologie des cardiomyocytes du VG et du VD et a montré que ceux du VD étaient plus petits <sup>40</sup>. De même, à l'intérieur du VG, il existe des différences dans les dimensions des cardiomyocytes suivant que ceux-ci proviennent de l'endomyocarde ou de l'épimyocarde <sup>40</sup>. Cependant l'extraction des cardiomyocytes du VD est techniquement difficile et ces cellules représentent 10% des cellules des deux ventricules. Pour ces raisons, les cardiomyocytes sont donc isolés des deux ventricules. Le biais causé par des cardiomyocytes plus petits du VD ou différents suivant leur origine dans le VG est alors normalisé par le fait que le VD et le VG entiers

sont gardés pour tous les animaux. Les solutions de Krebs-Henseleit (KH) (contenu en mmol/L : NaCl 118; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub> 1.25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 25; et dextrose 11; pH 7.4) et de Milieu 199 (milieu 199 (Sigma, Oakville, ON, Canada) 4.89 g; BSA 0.2% « *fatty acid free* » (Roche Diag, Laval, QC, Canada); et contenu en mmol/L : créatine 5; L-carnitine 2; taurine 5; acide ascorbique 0.1; NaHCO<sub>3</sub> 26.2; HEPES 0.02; penicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml; pH 7.25) sont préparées la veille et conservées à 4°C. Les solutions utilisées pour perfuser le cœur (KH avec Ca<sup>2+</sup> et sans Ca<sup>2+</sup>) ont été préalablement oxygénées pendant 20 minutes (O<sub>2</sub> 95%/CO<sub>2</sub> 5%). Le cœur est retiré rapidement des animaux anesthésiés (0.18 cc de Ketaset + 0.08 cc Xylasine) et les cardiomyocytes tolérants au Ca<sup>2+</sup> sont isolés selon la méthode Langendorff (perfusion aortique rétrograde)<sup>163,373</sup>. Le cœur installé sur l'aiguille reliée au système de perfusion est rincé (±5 mL/min suivant la dilatation du cœur) pendant 5 minutes dans une solution KH à 37°C. Une solution KH à 37°C sans Ca<sup>2+</sup> est ensuite utilisée pour arrêter les battements cardiaques (5 minutes). Le cœur est perfusé pendant 20 minutes avec du tampon KH normal à 37°C contenant 200 U/ml de collagénase (CLS2, Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, USA) (dégrade le collagène fibrillaire) et 0.3 mg/ml de hyaluronidase (Roche Diag, Laval, QC, Canada) (dégrade les glycoprotéines) pour dissocier les cellules du tissu. Les oreillettes sont ensuite ôtées et les deux ventricules sont gardés. Les ventricules sont ensuite émincés et incubés dans du tampon KH contenant de la trypsine (Roche Diag, QC, Canada) (protéase à sérine qui dégrade les protéines de la matrice) (0.2 mg/ml) pour dissocier le tissu et de la DNase I (Roche Diag, Laval, QC, Canada) (0.2 mg/ml) pour dégrader l'ADN, à 37°C avec agitation pendant 10 minutes. La suspension cellulaire est passée à travers un filtre dont les pores sont de 200 µm et centrifugée à 1000 rpm pour 60 secondes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10-15 ml d'une solution de lavage (KH/milieu 199 1:1, FBS 10%) et sédimentent pendant 20 minutes. La procédure est répétée 3 fois puis les cellules sont resuspendues dans 10 ml de solution de lavage. Les cellules sont ensuite déposées sur 10 ml de BSA (« *fatty acid free* ») 6% pour séparer les cardiomyocytes des autres types cellulaires. Le culot contient les cardiomyocytes isolés qui sont observés au microscope pour vérifier la qualité des cellules. Les cardiomyocytes sont fixés dans un tampon phosphate 0.08 M pH 7.4 contenant de la glutaraldéhyde 1.5% pendant 15

minutes puis lavés avec du tampon phosphate 0.1 M pH 7.4. Les cellules sont conservées dans ce dernier tampon à 4°C. Il a été montré que cette solution préservait le volume des cellules fixées et évitait la contraction des cellules<sup>374</sup>. Les cellules sont ensuite analysées au microscope.

## 5. Mesure des cardiomyocytes isolés

Les cardiomyocytes fixés et provenant des ventricules gauche et droit sont déposés dans des Pétris contenant du tampon phosphate 0.1 M, la journée même ou le lendemain de l'isolation des cellules. Des images de ces cellules sont prises sous un microscope Zeiss Axiovert avec un objectif 10X relié à une vidéocaméra pour analyses ultérieures. Le logiciel « *Northern Eclipse* » version 6.0 est ensuite utilisé pour mesurer la longueur (définie comme la plus grande longueur parallèle à l'axe longitudinal des cardiomyocytes) et la surface (mesurée manuellement en faisant le contour de la cellule) d'environ 100 cellules ( $\pm 5$ ) par animal étudié. La largeur est déterminée en divisant la surface par la longueur. Ces mesures permettent la détermination d'un ratio longueur/largeur des cardiomyocytes isolés.

## 6. Dosage des hormones sexuelles

Les hormones sexuelles ont été dosées pour les mâles et femelles des souches WKHA et WKY consommant la nourriture avec PE et les WKY consommant celle sans PE. Les échantillons de sang sont prélevés au niveau de l'aorte descendante dans une seringue contenant de l'EDTA (6 mM), sur les animaux anesthésiés (0.18 cc de Ketaset + 0.08 cc Xylasine). Après 15 minutes de centrifugation à 4000 rpm, le plasma est recueilli et conservé à -20°C. La fraction non conjuguée de la testostérone, de la progestérone et du 17 $\beta$ -estradiol a été dosée par RIA avec des trousse spécialisées ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, CA, USA).

## 7. Détermination de la pression artérielle

Les pressions systolique et diastolique sont continuellement enregistrées par radiotéléométrie<sup>375,376</sup>. Les transmetteurs téléométriques (Datasciences International; St. Paul, MN, USA) sont implantés dans la cavité abdominale des rats (avec le cathéter inséré dans la portion distale de l'aorte descendante) à l'âge de 10 semaines. Après 2 semaines de récupération, les données téléométriques sont enregistrées pendant 14 jours en continu avec le système « *Dataquest ART 2.3* » (Datasciences International, St. Paul, MN, USA). L'acquisition des données se fait toutes les 5 minutes pour 10 secondes et des moyennes pour chaque heure sont utilisées pour obtenir les pressions systolique, diastolique ainsi que le niveau d'activité de chaque rat. La pression artérielle du jour (période de repos de l'animal) est définie comme la moyenne des valeurs comprises entre 10 et 15 h alors que celle de nuit (période d'activité de l'animal) est déterminée à partir des valeurs comprises entre 22 et 4 h.

## 8. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel « *GraphPad Prism 4* » (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA). Le test t de Student a été utilisé afin de comparer deux groupes de valeurs. Une ANOVA a été utilisée afin de comparer plusieurs groupes de valeurs entre eux. Le test post-hoc de Tukey a ensuite été utilisé pour examiner les différences significatives observées avec l'ANOVA.  $p \leq 0.05$  est considéré significatif.

## Chapitre 3 : RÉSULTATS

### 1. Caractéristiques des cardiomyocytes de rat adulte

#### 1.1 Caractéristiques de base

Les cardiomyocytes des mâles et femelles WKHA et WKY, intacts et nourris avec une alimentation standard présentent des différences de morphologie (Tab I.). Dans les deux souches, les cardiomyocytes de rats adultes de 12 semaines sont plus longs chez les mâles que chez les femelles. Entre les mâles des deux souches, la longueur ne varie pas alors qu'au niveau de la largeur, les cardiomyocytes des WKHA sont plus larges que ceux des WKY. Chez les femelles, c'est la longueur qui varie entre les deux souches : les WKHA possédant des cardiomyocytes moins longs que les WKY, alors que la largeur ne varie pas entre les deux souches. Cependant, dans les deux sexes, le résultat de ces différences de morphologie est que le ratio L/l est plus élevé chez les WKY que chez les WKHA.

#### 1.2 Effet de l'alimentation

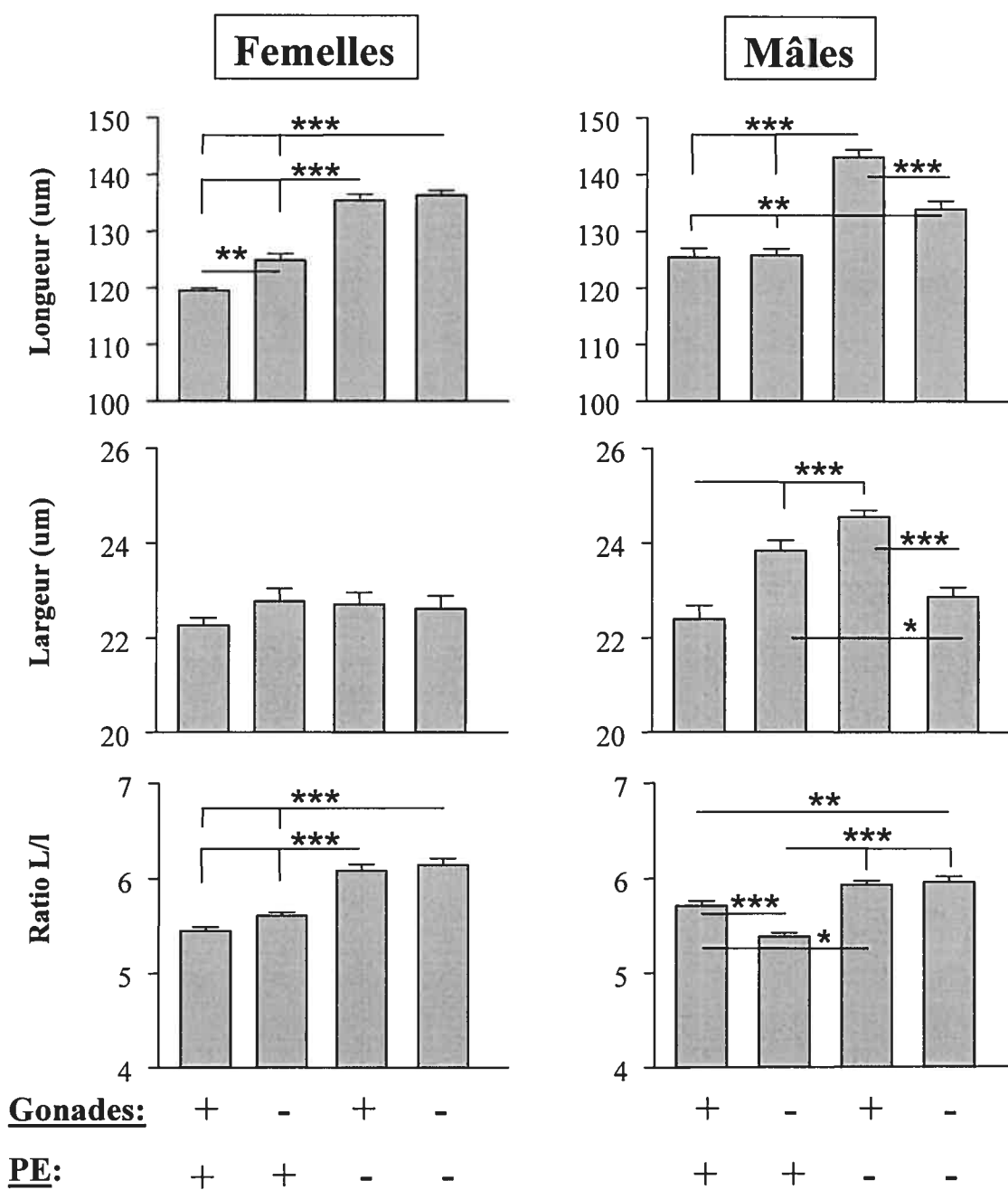
La présence de PE dans l'alimentation affecte les caractéristiques des cardiomyocytes des rats adultes de 12 semaines (Fig 5. et 6.). La nourriture contenant des PE a été remplacée par une diète sans PE sur au moins deux générations pour éviter tout transfert de ces composés de la mère aux petits. La figure 5 montre les résultats chez les WKY. La longueur des cardiomyocytes des mâles WKY augmente de 14% en l'absence de PE dans la nourriture (125.53  $\mu\text{m}$  à 143.07  $\mu\text{m}$ ,  $p \leq 0.001$ ) et la largeur de 9.6% (22.40  $\mu\text{m}$  à 24.55  $\mu\text{m}$ ,  $p \leq 0.001$ ), ce qui augmente légèrement le ratio L/l de 4% (5.709 à 5.933,  $p \leq 0.05$ ). Chez les femelles WKY, la longueur augmente de 13.4% (119.50  $\mu\text{m}$  à 135.46  $\mu\text{m}$ ,  $p \leq 0.001$ ) mais la largeur n'est pas affectée (22.27  $\mu\text{m}$  vs 22.71  $\mu\text{m}$ ), ce qui augmente le ratio L/l de 11.7% (5.451 à 6.089,  $p \leq 0.001$ ).

Tableau I. Caractéristiques des cardiomyocytes de rats WKHA et WKY adultes âgés de 12 semaines.

Sexe	Souche	Longueur ( $\mu\text{m}$ )	Largeur ( $\mu\text{m}$ )	Ratio L/l
<b>Mâles</b>	WKY	125.53 $\pm$ 1.53	22.40 $\pm$ 0.29###	5.709 $\pm$ 0.052###
	WKHA	124.43 $\pm$ 1.08***	25.46 $\pm$ 0.23***	4.959 $\pm$ 0.049***
<b>Femelles</b>	WKY	119.50 $\pm$ 0.48** ††	22.27 $\pm$ 0.17	5.451 $\pm$ 0.039** ††
	WKHA	114.20 $\pm$ 1.45	22.54 $\pm$ 0.14	5.148 $\pm$ 0.039

Les valeurs de la longueur, de la largeur et du ratio L/l des cardiomyocytes isolés de rats adultes des souches WKHA et WKY sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*, p  $\leq$  0.01 vs les femelles WKHA; ††, p  $\leq$  0.01 vs les mâles WKY; \*\*\*, p  $\leq$  0.001 vs les femelles WKHA; ###, p  $\leq$  0.001 vs les mâles WKHA.

Figure 5. Effet des hormones sexuelles et des PE sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.



PE se rapporte à la présence (+) ou à l'absence (-) de phytoestrogènes dans l'alimentation (-PE depuis au moins deux générations) et Gonades à la présence (+) ou l'absence (-) des gonades par castration ou ovariectomie. Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/I des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

La figure 6 présente les résultats chez les WKHA. Chez les adultes de 12 semaines, les femelles WKHA réagissent de la même manière que les femelles WKY. La longueur de leurs cardiomyocytes augmente de 14.8% en l'absence de PE (114.20  $\mu\text{m}$  à 131.05  $\mu\text{m}$ ,  $p \leq 0.001$ ) tandis que la largeur ne varie pas (22.54  $\mu\text{m}$  vs 22.79  $\mu\text{m}$ ), ce qui augmente le ratio L/l de 13.5% (5.148 à 5.842,  $p \leq 0.001$ ). Cependant, les mâles WKHA ne répondent pas au changement d'alimentation : la longueur, la largeur et le ratio L/l restent les mêmes.

La différence de longueur des cardiomyocytes observée avec le retrait des PE de l'alimentation est déjà présent chez les animaux à l'âge de 6 semaines (Fig 7.). En effet, les mâles WKY ont déjà une augmentation de la longueur de 11.1% sans variation de largeur, ce qui augmente le ratio L/l de 13%. Chez les femelles WKY de 6 semaines la longueur augmente également de 11.1% sans variation de la largeur, ce qui augmente le ratio L/l de 12.5%.

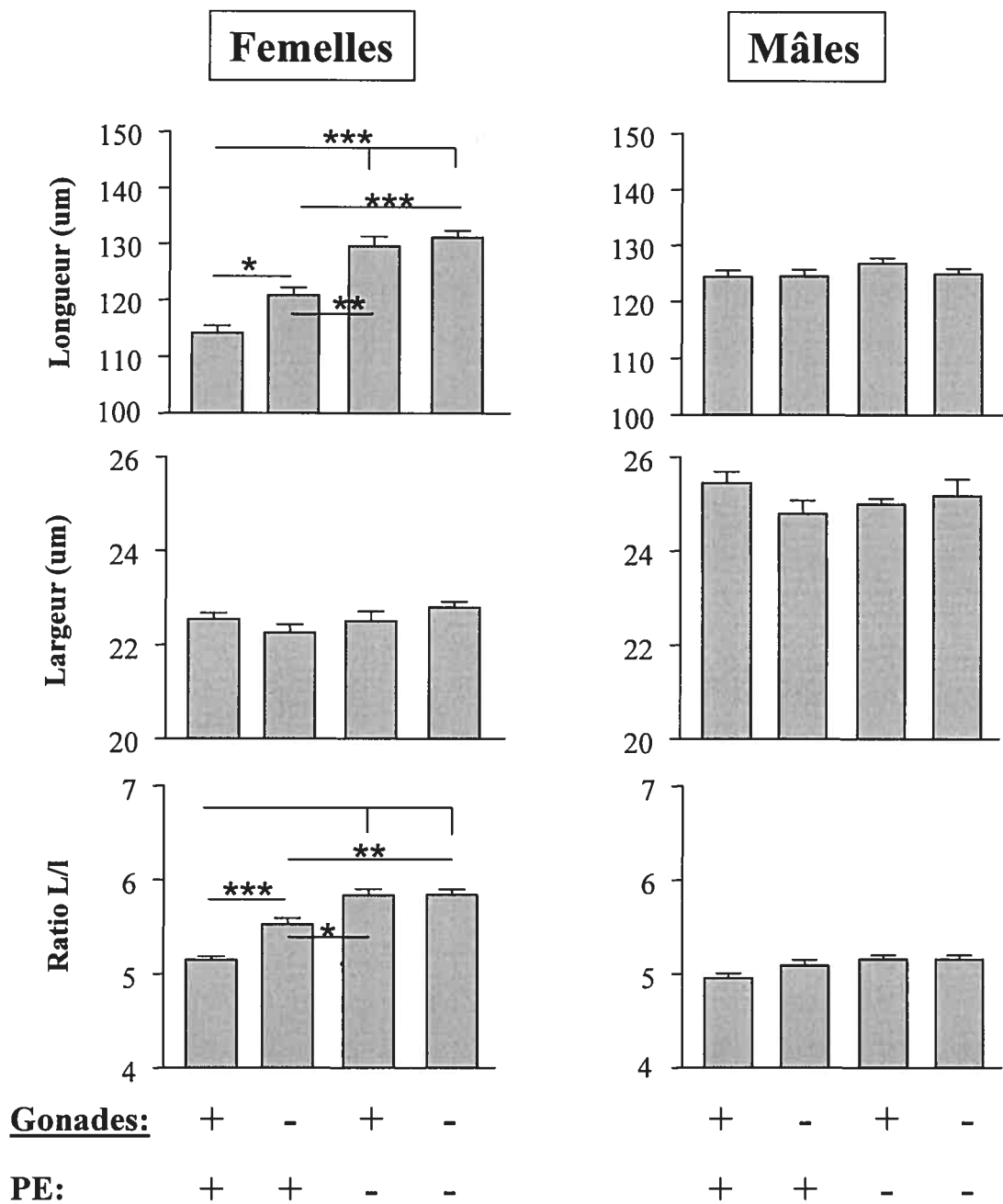
En résumé, ces résultats montrent un effet important de la présence de PE dans l'alimentation des rats, avec une diminution de la longueur des cardiomyocytes ainsi que du ratio L/l des mâles et femelles WKY et des femelles WKHA. Il est à noter que cette différence est effective dès l'âge de 6 semaines.

### 1.3 Effet de la gonadectomie combinée à une alimentation avec ou sans PE

Les mâles et les femelles ne répondent pas de la même manière à la gonadectomie, et ceci dépend de la présence ou de l'absence de PE dans l'alimentation (Fig 5. et 6.). La figure 5 présente les résultats chez les WKY. En présence de PE, la castration n'a aucun effet sur la longueur des cardiomyocytes des mâles WKY mais présente un léger effet sur leur largeur ce qui diminue légèrement le ratio L/l de 5.4%. A l'inverse, les cardiomyocytes des femelles WKY augmentent de 4.5% sans variation dans la largeur. Les variations sont cependant trop faibles pour affecter le ratio L/l. En l'absence de PE, les mâles WKY réagissent à la castration avec une diminution concomitante de 6.6% de

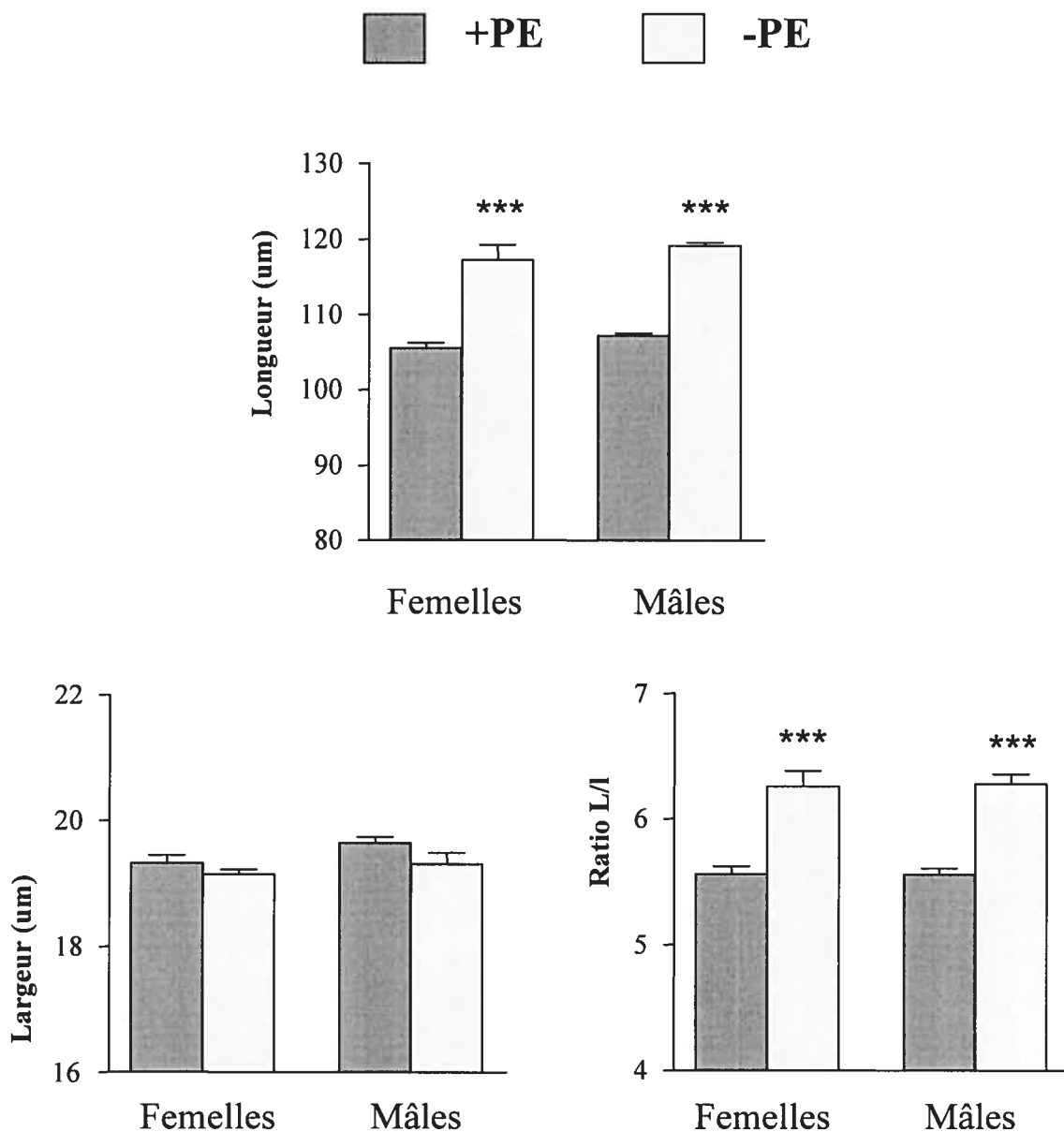


Figure 6. Effet des hormones sexuelles et des PE sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKHA âgés de 12 semaines.



PE se rapporte à la présence (+) ou à l'absence (-) de phytoestrogènes dans l'alimentation (-PE depuis au moins deux générations) et Gonade à la présence (+) ou l'absence (-) des gonades par castration ou ovariectomie. Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/I des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Figure 7. Effet de l'alimentation sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 6 semaines.



+PE et -PE se rapportent à la présence ou à l'absence de phytoestrogènes dans l'alimentation respectivement (-PE depuis au moins deux générations). Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/I des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*\*,  $p \leq 0.001$  vs +PE.

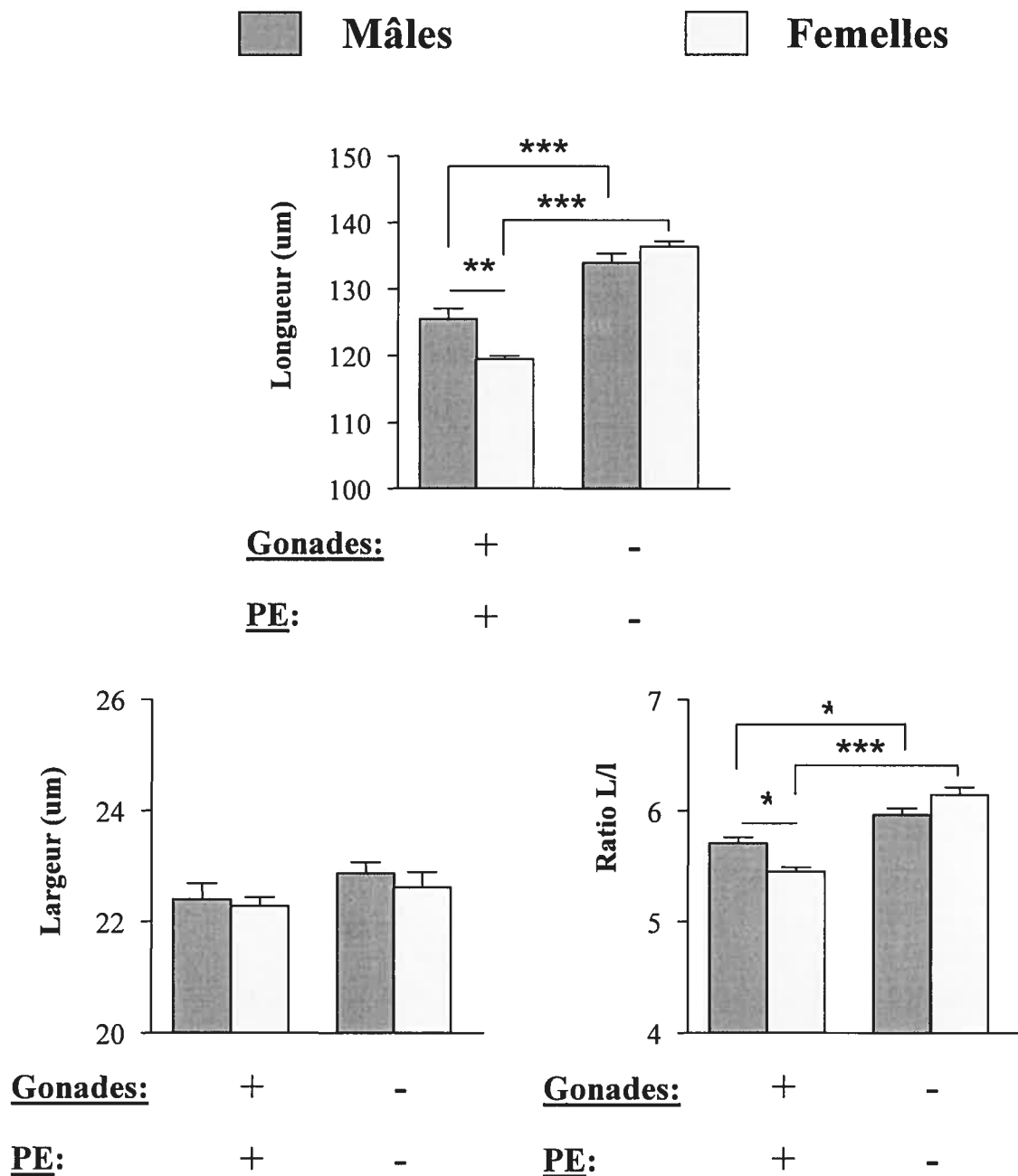
la longueur et de 6.9% de la largeur, ce qui maintient le ratio L/l. Cependant l'ovariectomie chez les femelles WKY, en l'absence de PE dans l'alimentation, n'affecte pas les dimensions des cardiomyocytes.

Les résultats pour les WKHA sont présentés dans la figure 6. Les cardiomyocytes des femelles WKHA présentent également la même réponse à l'ovariectomie que les femelles WKY, quelque soit l'alimentation. En présence de PE, la longueur des cardiomyocytes des femelles WKHA augmente de 5.8% sans variation de la largeur, ce qui augmente légèrement le ratio L/l de 7.3%. Par contre l'ovariectomie en l'absence de PE chez les femelles WKHA ne produit aucun effet, comme pour les femelles WKY. Les mâles WKHA ne répondent pas plus à un changement d'alimentation qu'à la castration. En présence de PE la castration n'a aucun effet et en l'absence de PE non plus.

Que ce soit en présence ou en absence de PE, la gonadectomie dans les deux sexes abolit les différences de longueur des cardiomyocytes qui sont observées normalement entre les mâles et les femelles (en présence de leurs gonades). En effet, chez les WKY gonadectomisés, en présence de PE, la longueur est de 125.85  $\mu\text{m}$  pour les mâles et de 124.93  $\mu\text{m}$  pour les femelles et en l'absence de PE, la longueur est de 133.97  $\mu\text{m}$  pour les mâles et de 136.41  $\mu\text{m}$  pour les femelles. La figure 8 montre que la différence de longueur et de ratio L/l des cardiomyocytes observée en situation normale est perdue entre les mâles et les femelles WKY en l'absence de PE dans l'alimentation et d'hormones sexuelles par gonadectomie (environnement stéroïdien nul).

En résumé, les hormones sexuelles semblent être responsables des différences dans les caractéristiques des cardiomyocytes observées normalement entre les mâles et les femelles. De plus, la gonadectomie affecte le ratio L/l des cardiomyocytes des rats femelles en présence de PE dans l'alimentation mais pas en leur absence, alors que chez les rats mâles, la gonadectomie affecte le ratio L/l des cardiomyocytes en l'absence de PE dans l'alimentation mais pas en leur présence.

Figure 8. Effet de l'environnement stéroïdien sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.



PE se rapporte à la présence ou à l'absence de phytoestrogènes dans l'alimentation (-PE depuis au moins deux générations) et Gonade à la présence ou l'absence des gonades par castration ou ovariectomie. Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/I des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

#### 1.4 Réintroduction des PE à différents temps chez les WKY

La réintroduction des PE à différents temps par l'intermédiaire d'un changement d'alimentation a été faite chez les rats WKY car les cardiomyocytes des animaux des deux sexes de cette souche sont sensibles aux PE, contrairement aux WKHA. Les rats WKY qui consommaient une diète sans PE depuis au moins deux générations ont donc été mis sur la nourriture qui en contenait pour une certaine période de temps. La réintroduction des PE dans l'alimentation entre 6 et 12 semaines chez les WKY castrés (pour éviter toute interaction avec les hormones sexuelles endogènes) n'a aucun effet sur la morphologie des cardiomyocytes adultes de 12 semaines. Les données (qui ne sont pas présentées sous forme de figure ou de tableau) sont les suivantes : pour les mâles, les valeurs sont de  $133.97 \pm 1.39 \mu\text{m}$  vs  $133.81 \pm 0.85 \mu\text{m}$  pour la longueur, de  $22.87 \pm 0.20 \mu\text{m}$  vs  $22.82 \pm 0.11 \mu\text{m}$  pour la largeur et de  $5.967 \pm 0.056$  vs  $5.971 \pm 0.029$  pour le ratio L/l sans ou avec PE respectivement; chez les femelles les valeurs sont de  $136.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$  vs  $132.28 \pm 0.34 \mu\text{m}$  pour la longueur, de  $22.61 \pm 0.27 \mu\text{m}$  vs  $22.47 \pm 0.20 \mu\text{m}$  pour la largeur et de  $6.143 \pm 0.071$  vs  $5.999 \pm 0.067$  pour le ratio L/l sans ou avec PE respectivement.

Par contre, la réintroduction de PE entre la naissance et l'âge de 12 semaines a des effets sur les cardiomyocytes des WKY adultes (les données ne sont pas présentées sous forme de figure ou tableau). Ainsi, chez les mâles WKY, comparativement aux animaux qui n'ont jamais consommé de PE, leur présence entre 0 (correspondant à la naissance) et 12 semaines diminue la longueur des cardiomyocytes de  $143.07 \pm 1.34 \mu\text{m}$  à  $135.26 \pm 0.64 \mu\text{m}$  (5.5%;  $p \leq 0.01$ ) et la largeur de  $24.55 \pm 0.13 \mu\text{m}$  à  $23.53 \pm 0.24 \mu\text{m}$  (4.2%;  $p \leq 0.05$ ), ce qui ne change pas le ratio L/l. Chez les femelles aussi la longueur diminue de  $135.46 \pm 1.09 \mu\text{m}$  à  $128.40 \pm 0.89 \mu\text{m}$  (5.2%;  $p \leq 0.001$ ) sans variation de la largeur ce qui diminue le ratio L/l de  $6.089 \pm 0.65$  à  $5.871 \pm 0.17$  (4.6%;  $p \leq 0.05$ ). La réintroduction des PE entre 0 et 6 semaines a les mêmes effets sur les cardiomyocytes que celle entre 0 et 12 semaines. Ainsi, chez les mâles WKY, la longueur diminue de 6.1% ( $p \leq 0.001$ ) et la largeur de 4.2% ( $p \leq 0.01$ ) ce qui ne change pas le ratio L/l. Chez

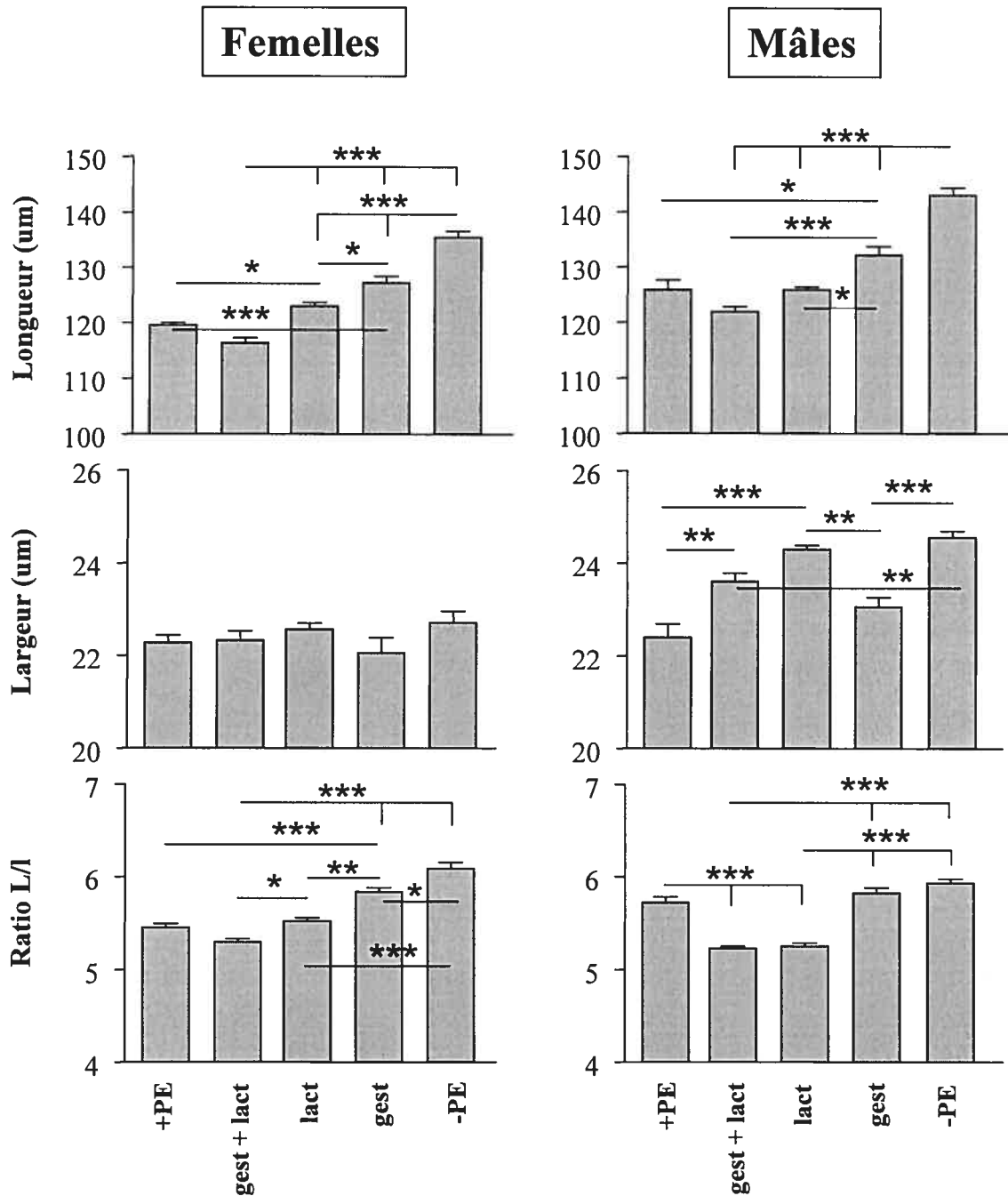
les femelles, la longueur diminue de 6.4% ( $p \leq 0.001$ ) sans variation de la largeur ce qui diminue le ratio L/l de 5.2% ( $p \leq 0.01$ ). Cependant, l'ajout de PE entre 0 et 12 ou 0 et 6 semaines ne parvient pas à ramener les valeurs des cardiomyocytes à celles des WKY ayant toujours consommé des PE.

Les PE ont ensuite été réintroduit chez les WKY depuis l'accouplement jusqu'à la troisième semaine après la naissance (qui correspond à la fin de la période de lactation) chez la mère. Les bébés n'ont donc jamais consommé directement de PE mais y ont été exposés par le placenta puis par le lait maternel. Les données sont présentées dans la figure 9. Les cardiomyocytes de ces animaux à 12 semaines présentent des valeurs similaires à ceux des WKY adultes ayant toujours consommé des PE. Enfin, la réintroduction des PE pendant la gestation ou pendant la lactation diminue sensiblement la longueur et le ratio L/l des cardiomyocytes, mais pas suffisamment pour obtenir les valeurs des WKY ayant toujours consommé des PE.

### 1.5 Remplacement des PE par la génistéine ou la daidzéine

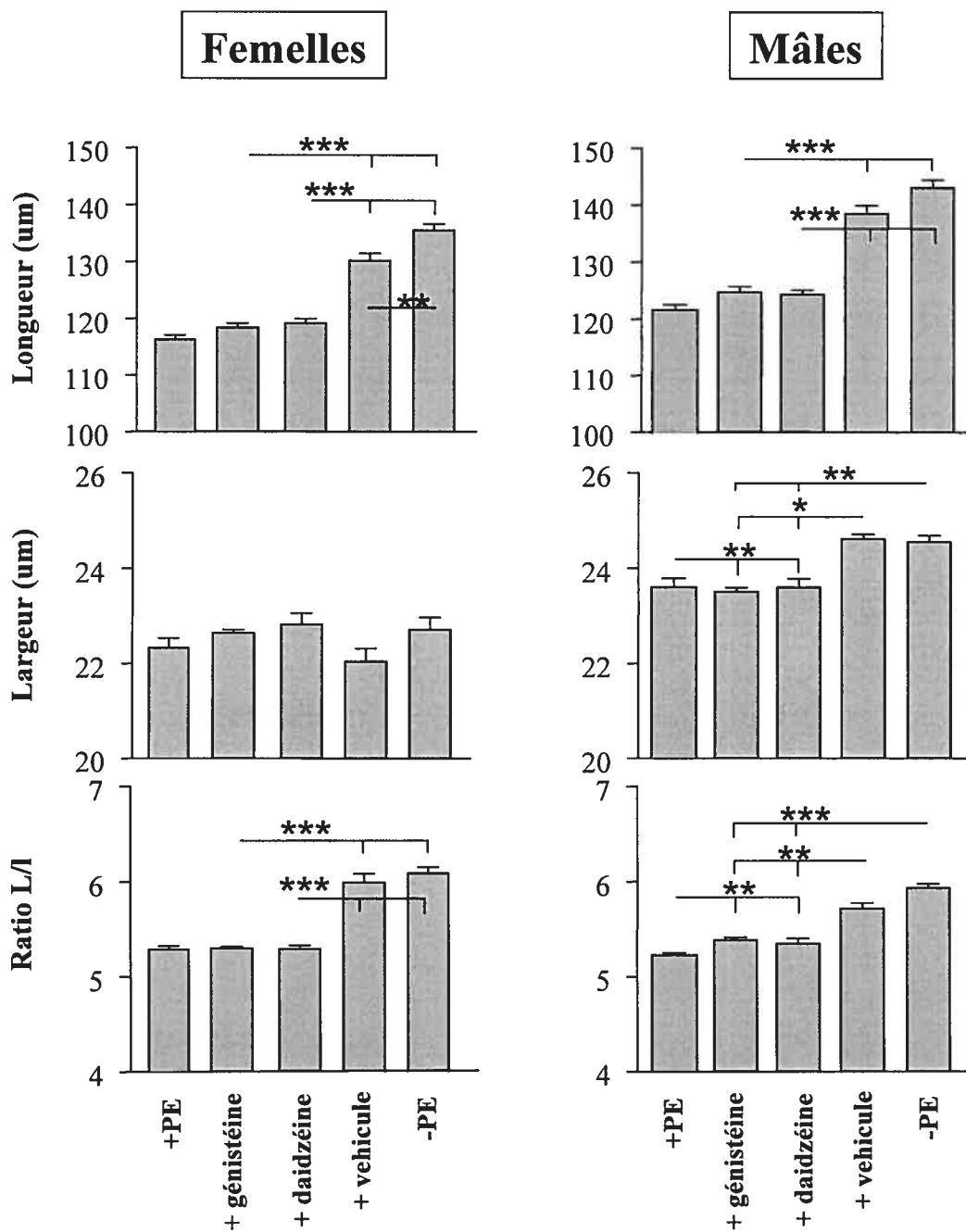
La fenêtre de temps choisie pour l'administration de différents composés est la gestation plus la lactation étant donné que cette période suffit à reproduire les effets des PE lorsque ceux-ci sont consommés pendant la gestation et la lactation par la mère (Fig 9.). L'administration par gavage de la génistéine ou de la daidzéine (deux isoflavones qui correspondent aux PE les plus abondants retrouvés dans l'alimentation des animaux) a été faite sur des WKY consommant une diète sans PE. Les données sont présentées dans la figure 10. Les WKY ayant reçu le véhicule présentent quelques changements dans les grandeurs des cardiomyocytes par rapport aux rats qui consomment la diète sans PE mais ceci n'affecte pas le ratio L/l des mâles (5.933 vs 5.718) et des femelles (6.089 vs 5.995) et ne cause pas de changements significatifs. L'administration de génistéine seule ramène les valeurs des cardiomyocytes à celles des animaux ayant consommé des PE pendant la gestation et la lactation. L'administration de daidzéine seule donne les mêmes résultats que la génistéine, à savoir des valeurs équivalentes à celles des animaux ayant consommé des PE pendant la même fenêtre de temps. Ainsi, la présence d'un seul de ces

Figure 9. Effet de la réintroduction des PE à différents temps sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.



PE se rapporte à la présence ou à l'absence de phytoestrogènes dans l'alimentation (-PE et +PE depuis au moins deux générations), gest et lact se rapportent à l'alimentation avec PE seulement pendant la gestation et/ou la lactation respectivement. Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/I des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Figure 10. Effet des suppléments de génistéine ou de daidzéine sur la morphologie des cardiomyocytes des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.



PE se rapporte à la présence ou à l'absence de phytoestrogènes dans l'alimentation (-PE depuis au moins deux générations, +PE seulement pendant la gestation et la lactation). Le véhicule, la génistéine et la daidzéine ont été administrés pendant la gestation et la lactation. Les résultats correspondent à la longueur, la largeur et le ratio L/l des cardiomyocytes. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .



composés suffit à reproduire les effets des PE sur les cardiomyocytes observés dans la figure 5.

### 1.6 Effet d'une fistule AV chez les mâles et femelles WKHA, WKY et WKY (-PE)

La surcharge de volume induite par une fistule AV provoque une élongation des cardiomyocytes. Les données pour la longueur des cardiomyocytes des mâles WKY et WKHA 12 semaines après la chirurgie sont présentées dans le tableau II. Chez les mâles WKY la longueur augmente de 9% ( $p \leq 0.001$ ), la largeur de 10% ( $p \leq 0.001$ , donnée non présentée) et le ratio L/l ne varie pas. Chez les mâles WKHA, la longueur augmente de 11% ( $p \leq 0.001$ ), la largeur augmente légèrement (+ 3%,  $p \leq 0.05$ , données non présentées) ce qui augmente le ratio L/l de 8% ( $p \leq 0.001$ ).

Les données pour la longueur des cardiomyocytes des femelles WKY et WKHA 12 semaines après la chirurgie sont présentées dans le tableau III. Chez les femelles WKY, la longueur des cardiomyocytes augmente de 10% ( $p \leq 0.001$ ). La largeur augmente de 5% ( $p \leq 0.001$ , donnée non présentée), ce qui augmente légèrement le ratio L/l de 4% ( $p \leq 0.05$ ). Les femelles WKHA présentent une augmentation de la longueur plus importante 12 semaines après la chirurgie que les WKY; la longueur augmente de 16% ( $p \leq 0.001$ ). La largeur et le ratio L/l augmentent également de 6% ( $p \leq 0.001$ , donnée non présentée) et de 10% ( $p \leq 0.001$ ) respectivement.

Les cardiomyocytes des rats consommant une diète sans PE répondent différemment à la surcharge de volume. Les données, 12 semaines après la création d'une fistule AV, sont présentées dans le tableau IV pour les femelles. Les résultats chez les mâles ne sont pas présentés à cause d'un nombre insuffisant d'animaux. Chez les femelles WKY consommant la diète sans PE, l'élongation des cardiomyocytes est plus marquée (16%) que celle des animaux consommant des PE (10%). La largeur augmente également ce qui n'affecte pas le ratio L/l.

Tableau II. Effet de la souche de rat sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des mâles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.

variable	WKY			WKHA		
	« Sham »	ACF	%	« Sham »	ACF	%
V/tibia	3.17 ± 0.07	3.74 ± 0.19*	+18	3.47 ± 0.10	5.22 ± 0.13***	+50
Poumons/tibia	3.38 ± 0.06	3.55 ± 0.17	+5	2.97 ± 0.13	4.02 ± 0.21**	+35
Surface V (mm <sup>2</sup> )	115.25 ± 3.07	134.95 ± 4.80**	+17	132.40 ± 4.74	188.06 ± 4.56***	+42
Cavité VG (mm <sup>2</sup> )	31.48 ± 3.48	40.41 ± 2.28	+28	36.28 ± 4.72	66.56 ± 4.43***	+83
Longueur CM (µm)	123.70 ± 0.96	135.39 ± 0.81***	+9	124.47 ± 0.79	138.35 ± 1.75***	+11
Surface CM (µm <sup>2</sup> )	2810.83 ± 37.90	3397.10 ± 35.86	+21	3185.57 ± 49.01	3664.94 ± 65.79	+15
Ratio L/I CM	5.536 ± 0.038	5.477 ± 0.032	0	4.932 ± 0.029	5.309 ± 0.048***	+8

V/tibia est le poids des deux ventricules rapporté à la longueur du tibia, poumons/tibia est le poids des poumons rapporté à la longueur du tibia. V : ventricules gauche et droit; CM : cardiomyocyte. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 5-8). \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; \*\*\*, p ≤ 0.001 vs « sham » respectifs.

Tableau III. Effet de la souche de rat sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des femelles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.

variable	WKY			WKHA		
	« Sham »	ACF	%	« Sham »	ACF	%
V/tibia	2.45 ± 0.05	2.43 ± 0.07	0	2.84 ± 0.11	4.21 ± 0.15***	+48
Poumons/tibia	2.77 ± 0.04	2.79 ± 0.03	0	2.69 ± 0.15	3.35 ± 0.12**	+25
Surface V (mm <sup>2</sup> )	96.96 ± 3.17	90.84 ± 3.36	-6	102.24 ± 5.42	151.42 ± 5.38***	+48
Cavité VG (mm <sup>2</sup> )	22.44 ± 1.24	21.05 ± 3.07	-6	22.21 ± 2.36	51.31 ± 4.39***	+131
Longueur CM (µm)	125.11 ± 0.78	137.44 ± 0.93***	+10	119.57 ± 0.55	138.98 ± 1.23***	+16
Surface CM (µm <sup>2</sup> )	2916.92 ± 32.85	3381.58 ± 32.84***	+16	2816.56 ± 20.07	3470.55 ± 52***	+23
Ratio L/1 CM	5.452 ± 0.037	5.681 ± 0.068*	+4	5.166 ± 0.032	5.669 ± 0.066***	+10

V/tibia est le poids des deux ventricules rapporté à la longueur du tibia, poumons/tibia est le poids des poumons rapporté à la longueur du tibia. V : ventricules gauche et droit; CM : cardiomyocyte. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 5-8). \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; \*\*\*, p ≤ 0.001 vs « sham » respectifs.

Tableau IV. Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur et la dimension des cardiomyocytes des femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).

variable	+PE			-PE		
	« Sham »	ACF	%	« Sham »	ACF	%
V/tibia	2.45 ± 0.05	2.43 ± 0.07	0	2.57 ± 0.12	3.25 ± 0.10***	+26
Poumons/tibia	2.77 ± 0.04	2.79 ± 0.03	0	2.79 ± 0.03	3.27 ± 0.07***	+17
Surface V (mm <sup>2</sup> )	96.96 ± 3.17	90.84 ± 3.36	-6	133.42 ± 2.75 ###	154.56 ± 3.23***	+16
Cavité VG (mm <sup>2</sup> )	22.44 ± 1.24	21.05 ± 3.07	-6	40.89 ± 4.80 #	56.12 ± 4.75*	+37
Longueur CM (µm)	125.11 ± 0.78	137.44 ± 0.93***	+10	131.80 ± 0.71 ###	152.52 ± 0.68***	+16
Surface CM (µm <sup>2</sup> )	2916.92 ± 32.85	3381.58 ± 32.84***	+16	3128.07 ± 18.78 ##	4097.02 ± 34.74***	+31
Ratio L/I CM	5.452 ± 0.037	5.681 ± 0.068*	+4	5.645 ± 0.075	5.780 ± 0.020	+2

+PE et -PE se rapportent à l'alimentation contenant des PE ou à celle qui n'en contient pas respectivement. V/tibia est le poids des deux ventricules rapporté à la longueur du tibia, poumons/tibia est le poids des poumons rapporté à la longueur du tibia. V : ventricules gauche et droit; CM : cardiomyocyte. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 5-8). \*, p ≤ 0.05; \*\*\*, p ≤ 0.001 vs « sham » respectifs. #, p ≤ 0.05; ##, p ≤ 0.01; ###, p ≤ 0.001 vs « sham » +PE.

## 2. Morphologie du cœur

### 2.1 En conditions basales

La morphologie du cœur à l'état basal (chez les animaux n'ayant pas subi de fistule AV) est différente entre les animaux consommant une nourriture avec ou sans PE. Les données sur les mâles WKY adultes de 22 semaines sont présentées dans le tableau V et celles concernant les femelles dans le tableau IV. Le poids des ventricules et celui des poumons rapportés à la longueur du tibia ne varient pas selon la présence ou l'absence de PE dans l'alimentation autant chez les mâles que chez les femelles. De même, le poids du corps ne varie pas selon que les animaux soient nourris avec ou sans PE (mâles +PE :  $300 \pm 5$  g vs -PE :  $292 \pm 5$  g; femelles +PE :  $182 \pm 7$  g vs -PE :  $186 \pm 7$  g) (données non présentées dans les tableaux). Par contre, la surface des ventricules augmente de 22% chez les mâles et de 38% chez les femelles et la surface de la cavité du VG augmente de 46% chez les mâles et de 82% chez les femelles quand les animaux consomment une diète sans PE.

### 2.2 Après induction d'une fistule AV

Les cœurs des animaux soumis à une surcharge de volume ont été analysés 12 semaines après la chirurgie, c'est-à-dire chez des rats adultes de 22 semaines. Les valeurs pour les mâles WKY et WKHA sont présentées dans le tableau II. Le ratio poids des ventricules/longueur du tibia augmente de 18% chez les WKY et de 50% chez les WKHA. Le ratio poids des poumons/longueur du tibia augmente de 5% chez les WKY et de 35% chez les WKHA. La surface des ventricules augmente de 17% chez les WKY et de 42% chez les WKHA et celle de la cavité du VG augmente de 28% chez les WKY et de 83% chez les WKHA. Les mâles WKHA présentent donc une hypertrophie excentrique plus prononcée par rapport aux mâles WKY. Les valeurs pour les femelles WKY et WKHA sont présentées dans le tableau III. Les femelles WKY ne montrent pas

Tableau V. Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur des mâles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).

variable	+PE			-PE		
	« Sham »	ACF	%	« Sham »	ACF	%
V/tibia	3.17 ± 0.07	3.74 ± 0.19*	+18	3.13 ± 0.10	4.51 ± 0.10***	+44
Poumons/tibia	3.38 ± 0.06	3.55 ± 0.17	+5	3.44 ± 0.06	3.82 ± 0.11	+11
Surface V (mm <sup>2</sup> )	115.25 ± 3.07	134.95 ± 4.80**	+17	140.70 ± 5.13 #	195.71 ± 6.73***	+39
Cavité VG (mm <sup>2</sup> )	31.48 ± 3.48	40.41 ± 2.28	+28	46.08 ± 4.05	64.40 ± 4.73*	+40

+PE et -PE se rapportent à l'alimentation contenant des PE ou à celle qui n'en contient pas respectivement. V/tibia est le poids des deux ventricules rapporté à la longueur du tibia, poumons/tibia est le poids des poumons rapporté à la longueur du tibia. V : ventricules gauche et droit; CM : cardiomyocyte. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 5-8). \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; \*\*\*, p ≤ 0.001 vs « sham » respectifs. #, p ≤ 0.05 vs « sham » +PE.

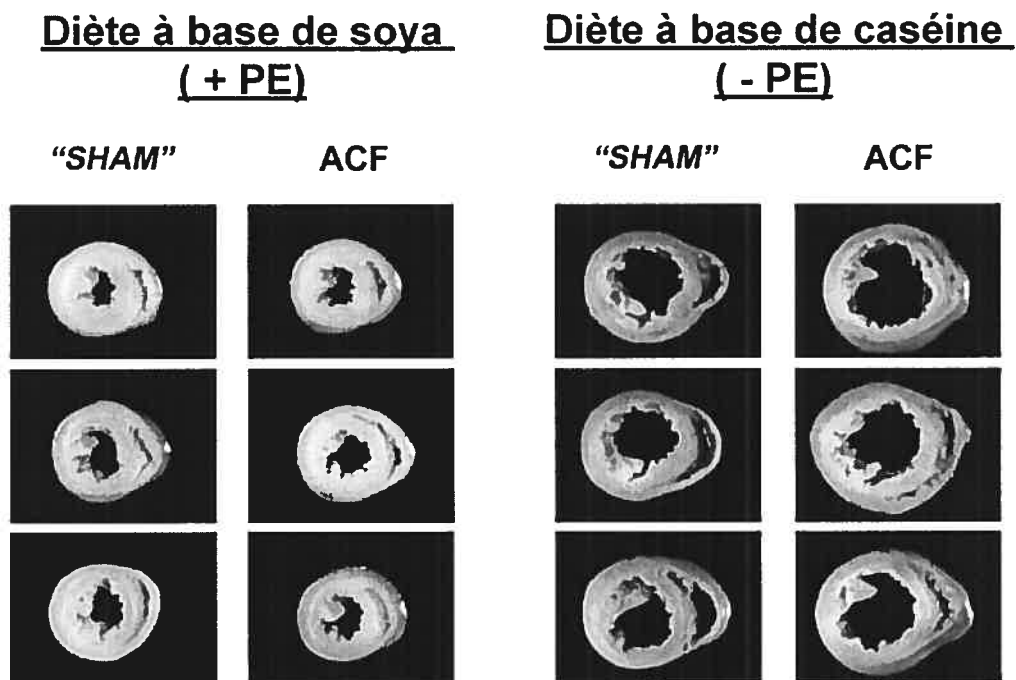
de signes d'hypertrophie contrairement aux mâles WKY qui présentent une hypertrophie modeste. Chez les femelles WKY, les ratios poids des ventricules/longueur du tibia et poids des poumons/ longueur du tibia n'augmentent pas alors qu'ils augmentent de 48% et 25% respectivement chez les femelles WKHA. De plus, la surface des ventricules et celle de la cavité du VG n'augmentent pas non plus chez les WKY alors qu'ils augmentent de 48% et de 131% respectivement chez les WKHA. En résumé, les femelles WKY présentent une hypertrophie moins marquée que les mâles WKY. Les femelles WKHA présentent une hypertrophie excentrique comparable à celle des mâles WKHA. Enfin, contrairement aux WKY, les WKHA montrent des signes évidents d'hypertrophie excentrique que ce soient les mâles ou les femelles.

L'impact de l'alimentation sur la morphologie du cœur en présence d'une fistule AV a également été analysé. Les données pour les mâles WKY sont disponibles dans le tableau IV. Les mâles qui consomment la diète sans PE présentent une hypertrophie excentrique plus développée que les animaux qui consomment des PE. Les ratios poids des ventricules/longueur du tibia et poids des poumons/ longueur du tibia pour les mâles WKY qui consomment la diète sans PE augmentent de 44% et de 11% respectivement. La surface des ventricules et celle de la cavité du VG augmentent de 39% et de 40% respectivement.

Les valeurs pour les femelles WKY sur l'alimentation avec ou sans PE sont présentées dans le tableau V. Par rapport aux femelles WKY qui consomment la nourriture avec PE et qui ne présentent pas de signe d'hypertrophie, les animaux qui consomment la diète sans PE sont largement hypertrophiés et dilatés. Les ratios poids des ventricules/longueur du tibia et poids des poumons/longueur du tibia augmentent de 26% et de 17% respectivement. La surface des ventricules et celle de la cavité du VG augmentent de 16% et de 37% respectivement. Ces réponses différentes à la fistule AV en fonction de la présence ou de l'absence de PE dans l'alimentation sont bien visibles sur la figure 11.

Enfin, les données pour les mâles des lignées congéniques WKY.WKHA-

Figure 11. Effet de l'alimentation sur la morphologie des ventricules des femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).





(D5Cfd50/D5Rat245) et WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) sont présentées dans le tableau VI. Chez les mâles, les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) soumis à la fistule AV développent de l'hypertrophie. Les ratios poids des ventricules/longueur du tibia et poids des poumons/longueur du tibia augmentent de 36% et de 14% respectivement chez les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) et de 44% et de 20% respectivement chez les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245). La surface des ventricules et celle de la cavité du VG augmentent de 31% et de 45% respectivement chez les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) et de 48% et de 67% respectivement chez les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245). Ainsi, chez les mâles WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) l'hypertrophie est présente mais semble plus prononcée que chez les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245). On retrouve donc des degrés d'hypertrophie similaires entre les souches, en comparaison des souches parentales où les WKHA développent également plus d'hypertrophie que les WKY.

Les résultats pour les femelles des lignées congéniques sont présentés dans le tableau VII. Les deux lignées semblent atteindre le même degré d'hypertrophie quand elles sont soumises à la fistule AV contrairement aux souches parentales chez qui seuls les WKHA développaient de l'hypertrophie. Les ratios poids des ventricules/longueur du tibia et poids des poumons/longueur du tibia augmentent de 51% et de 21% respectivement chez les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) et de 59% et de 14% respectivement chez les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245). La surface des ventricules et celle de la cavité du VG augmentent de 46% et de 106% respectivement chez les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) et de 50% et de 91% respectivement chez les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245).

### **3. Mesures de contractilité**

La pression en fin de diastole du VG (LVEDP), la pression en fin de systole du VG (LVESP), le différentiel de pression minimum ( $dP/dt(-)$ ) et maximum ( $dP/dt(+)$ ) ainsi que tau ont été calculés 12 semaines après création d'une fistule AV sur les animaux



Tableau VII. Effet de l'alimentation sur la morphologie du cœur des femelles des lignées congéniques en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).

variable	WKY.WKHA-D5Cfd50/D5Rat245			WKHA.WKY-D5Cfd50/D5Rat245		
	« Sham »	ACF	%	« Sham »	ACF	%
V/tibia	2.29 ± 0.03	3.65 ± 0.16***	+59	2.43 ± 0.08	3.67 ± 0.22***	+51
Poumons/tibia	2.95 ± 0.09	3.36 ± 0.06	+14	3.01 ± 0.12	3.65 ± 0.18**	+21
Surface V (mm <sup>2</sup> )	86.32 ± 1.75	129.37 ± 4.21***	+50	90.73 ± 1.43	132.86 ± 4.29***	+46
Cavité VG (mm <sup>2</sup> )	17.83 ± 0.80	34.01 ± 2.54***	+91	18.19 ± 0.56	37.56 ± 1.63***	+106

WKY.WKHA-D5Cfd50/D5Rat245 correspond à la souche WKY contenant un fragment de la souche WKHA et WKHA.WKY-D5Cfd50/D5Rat245 à la souche WKHA contenant un fragment de la souche WKY. V/tibia est le poids des deux ventricules rapporté à la longueur du tibia, poumons/tibia est le poids des poumons rapporté à la longueur du tibia. V : ventricules gauche et droit; CM : cardiomyocyte. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 5-8). \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; \*\*\*, p ≤ 0.001 vs « sham » respectifs.

« sham » et opérés. Les animaux étaient donc âgés de 22 semaines. Les données pour les mâles et femelles WKY et WKHA sont présentées dans le tableau VIII. Pour les mâles WKY, la LVEDP, la LVESP, le dP/dt (-) ainsi que le dP/dt (+) ne varient pas en présence d'une surcharge de volume. Pour les mâles WKHA, il n'y a pas non plus d'augmentation de ces variables suite à la fistule AV. Par contre, la constante de temps tau ne varie pas pour les WKY mais augmente de 41.1% ( $p \leq 0.01$ ) pour les WKHA après induction d'une fistule AV. De même que pour les mâles, pour les femelles WKY, la LVEDP, la LVESP, le dP/dt (-) et le dP/dt (+) présentent des valeurs similaires à l'état basal et après la chirurgie. Pour les femelles WKHA également, ces variables n'augmentent pas suite à la chirurgie. Par contre, comme pour les mâles, la constante de temps tau augmente légèrement pour les femelles WKY mais augmente de façon marquée (61.2%,  $p \leq 0.01$ ) pour les femelles WKHA après induction d'une fistule AV.

Les mesures de contractilité pour les mâles et femelles WKY consommant la diète sans PE sont présentées dans le tableau IX. Pour les mâles, les valeurs de LVEDP, de LVESP, de dP/dt (-) et de dP/dt (+) ne varient pas 12 semaines après induction d'une surcharge de volume. Pour les femelles également, ces valeurs n'augmentent pas en présence de la fistule AV. Cependant, la constante de temps tau augmente pour les mâles (33.4%,  $p \leq 0.05$ ) ainsi que pour les femelles (33.9%,  $p \leq 0.01$ ) n'ayant pas de PE dans l'alimentation contrairement aux WKY respectifs consommant des PE.

Enfin, en comparant les animaux à l'âge de 22 semaines mais à l'état basal (animaux « sham »), on constate qu'il n'y a pas de variation du LVEDP, du LVESP, du dP/dt (-) ainsi que du dP/dt (+) entre les animaux consommant des PE et ceux qui n'en consomment pas, autant chez les mâles que chez les femelles. Par contre, la constante de temps tau est plus élevée chez les femelles consommant la diète sans PE que chez les femelles consommant des PE (+ 41.7%,  $p \leq 0.05$ ). Ceci ne se retrouve cependant pas chez les mâles.

Tableau VIII. Effet de la souche de rat sur les mesures de contractilité des mâles et femelles en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie) en présence de PE.

variable	WKY		WKHA	
	« Sham »	ACF	« Sham »	ACF
<b>Mâles</b>				
LVEDP (mmHg)	1.32 ± 0.30	1.69 ± 0.33	0.62 ± 0.57	0.53 ± 0.35
LVESP (mmHg)	125.35 ± 4.06	121.00 ± 3.30	126.05 ± 5.14	134.38 ± 1.89
dP/dt (-) (mmHg/s)	6811 ± 588	6582 ± 297	5902 ± 507	6633 ± 402
dP/dt (+) (mmHg/s)	9876 ± 494	8268 ± 595	9129 ± 284	9564 ± 393
Tau (ms)	18.57 ± 0.74	18.12 ± 0.71	13.37 ± 0.27	18.87 ± 0.91**
<b>Femelles</b>				
LVEDP (mmHg)	1.66 ± 0.62	1.34 ± 0.70	2.00 ± 0.40	2.29 ± 1.10
LVESP (mmHg)	129.68 ± 8.03	119.61 ± 3.54	131.30 ± 4.87	128.92 ± 4.58
dP/dt (-) (mmHg/s)	7503 ± 3.75	6670 ± 179	6619 ± 311	7020 ± 630
dP/dt (+) (mmHg/s)	10672 ± 643	9547 ± 295	10483 ± 475	10100 ± 504
Tau (ms)	11.04 ± 0.50	13.59 ± 1.37	13.47 ± 1.82	21.72 ± 1.60**

dP/dt : différentiel de pression en fonction du temps. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 6-9). \*\*, p ≤ 0.01 vs « sham » respectifs.

Tableau IX. Effet de l'alimentation sur les mesures de contractilité des mâles et femelles WKY en réponse à la fistule AV (12 semaines après la chirurgie).

variable	+PE		-PE	
	« Sham »	ACF	« Sham »	ACF
<b>Mâles</b>				
LVEDP (mmHg)	1.32 ± 0.30	1.69 ± 0.33	0.40 ± 0.30	0.36 ± 0.34
LVESP (mmHg)	125.35 ± 4.06	121.00 ± 3.30	129.87 ± 4.32	129.45 ± 4.60
dP/dt (-) (mmHg/s)	6811 ± 588	6582 ± 297	7197 ± 624	7359 ± 436
dP/dt (+) (mmHg/s)	9876 ± 494	8268 ± 595	10883 ± 535	9918 ± 617
Tau (ms)	18.57 ± 0.74	18.12 ± 0.71	13.35 ± 1.07	17.81 ± 1.52*
<b>Femelles</b>				
LVEDP (mmHg)	1.66 ± 0.62	1.34 ± 0.70	1.35 ± 0.36	0.46 ± 0.61
LVESP (mmHg)	129.68 ± 8.03	119.61 ± 3.54	118.49 ± 3.84	115.05 ± 2.20
dP/dt (-) (mmHg/s)	7503 ± 3.75	6670 ± 179	6803 ± 436	6422 ± 222
dP/dt (+) (mmHg/s)	10672 ± 643	9547 ± 295	9621 ± 557	9196 ± 387
Tau (ms)	11.04 ± 0.50	13.59 ± 1.37	15.64 ± 0.93#	20.70 ± 0.98**

dP/dt : différentiel de pression en fonction du temps. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 6-9). \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01 vs « sham » respectifs. #, p ≤ 0.05 vs « sham » +PE.

#### **4. Pression Artérielle**

La pression artérielle a été mesurée chez les mâles et femelles WKY consommant ou non des PE, à l'âge de 12 semaines (Tab X.). Les différentes pressions ont été calculées sur 24 h mais aussi en fonction de l'activité de l'animal : pendant la période active (entre 20 et 2 h) et pendant la période de repos (entre 8 et 14 h). L'activité de l'animal (24 h, actif ou au repos) n'affecte pas les valeurs de pressions (données non présentées), les résultats sont donc montrés pour la période de 24 h. Chez les mâles et chez les femelles, il n'existe aucune différence dans les pressions moyenne, systolique et diastolique entre les animaux sur les deux types d'alimentation.

#### **5. Hormones sexuelles**

Les hormones sexuelles ont été dosées à l'âge de 12 semaines chez les mâles et femelles WKY consommant ou non des PE (Tableau XI). Ces valeurs correspondent aux concentrations plasmatiques de la forme non conjuguée. Il n'y a pas de variation dans la concentration de  $17\beta$ -estradiol, de progestérone ou de testostérone chez les femelles WKY ni chez les mâles WKY en fonction de l'alimentation. Les hormones sexuelles femelles (œstrogènes et progestérone) et mâles (testostérone) ne sont pas affectées par la présence de PE dans l'alimentation.

Les concentrations d'hormones sexuelles des WKHA sont présentées dans le tableau XII. Ces concentrations sont les mêmes entre les mâles WKY et WKHA sauf pour la progestérone où les WKY en possèdent plus que les WKHA. Il n'y pas de différence dans les concentrations de ces trois hormones entre les femelles WKY et WKHA. La présence de PE dans l'alimentation ne semble donc pas affecter non plus les hormones sexuelles mâles ou femelles chez les WKHA.

Tableau X. Effet de l'alimentation sur les mesures de pressions artérielles des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.

	<b>+ PE</b>	<b>- PE</b>	
<b>Mâles</b>			Valeur p
Pression artérielle moyenne	97.9 ± 1.1	99.2 ± 2.2	0.6097
Pression artérielle systolique	119.5 ± 0.7	120.2 ± 2.0	0.7439
Pression artérielle diastolique	78.2 ± 1.4	80.7 ± 2.6	0.4300
<b>Femelles</b>			Valeur p
Pression artérielle moyenne	98.2 ± 2.9	97.4 ± 2.1	0.8137
Pression artérielle systolique	117.5 ± 2.7	118.7 ± 1.9	0.7357
Pression artérielle diastolique	80.3 ± 3.3	78.1 ± 2.3	0.5945

+PE et -PE se rapportent à l'alimentation contenant des PE ou à celle qui n'en contient pas respectivement. Toutes les valeurs sont des moyennes ± SEM (n = 6).



Tableau XI. Effet de l'alimentation sur les concentrations plasmatiques d'hormones sexuelles des mâles et femelles WKY âgés de 12 semaines.

	+ PE	- PE	
<b>Mâles</b>			Valeur p
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	26.02 $\pm$ 1.7	27.95 $\pm$ 2.1	0.4912
Progestérone (ng/ml)	2.48 $\pm$ 0.5	2.15 $\pm$ 0.4	0.6112
Testostérone (ng/ml)	1.86 $\pm$ 0.23	1.23 $\pm$ 0.2	0.0629
<b>Femelles</b>			Valeur p
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	56.04 $\pm$ 7.6	54.20 $\pm$ 4.9	0.9699
Progestérone (ng/ml)	22.34 $\pm$ 2.5	25.84 $\pm$ 4.2	0.4760
Testostérone (ng/ml)	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.9794

+PE et -PE se rapportent à l'alimentation contenant des PE ou à celle qui n'en contient pas respectivement. Toutes les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM (n = 10).

Tableau XII. Effet de la souche de rat sur les concentrations plasmatiques d'hormones sexuelles des mâles et femelles âgés de 12 semaines en présence de PE.

	WKY	WKHA	
<b>Mâles</b>			Valeur p
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	26.02 $\pm$ 1.7	19.72 $\pm$ 3.4	0.1158
Progestérone (ng/ml)	2.48 $\pm$ 0.5	0.98 $\pm$ 0.17**	0.0074
Testostérone (ng/ml)	1.86 $\pm$ 0.23	1.75 $\pm$ 0.35	0.8034
<b>Femelles</b>			Valeur p
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	56.04 $\pm$ 7.6	54.55 $\pm$ 7.9	0.8933
Progestérone (ng/ml)	22.34 $\pm$ 2.5	23.86 $\pm$ 2.2	0.6511
Testostérone (ng/ml)	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00	0.4359

+PE et -PE se rapportent à l'alimentation contenant des PE ou à celle qui n'en contient pas respectivement. Toutes les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM (n = 10). \*\*, p  $\leq$  0.01 vs mâles WKY.

## Chapitre 4 : DISCUSSION

### 1. Effet de la nourriture sur la morphologie et la fonction cardiaques

Les phytoestrogènes sont des composés présents en quantités suffisantes dans l'alimentation des rongeurs pour exercer des effets physiologiques<sup>287,288</sup>. Chez l'humain, plusieurs études ont démontré un impact de ces composés sur diverses maladies ou prédispositions à des maladies (cancer, ostéoporose, hypertension, profil des lipides, symptômes de la ménopause...) <sup>268,276,351,377</sup>. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux effets directs des phytoestrogènes sur le cœur et il n'existe quasiment pas d'information à ce sujet. Nous nous sommes donc proposés d'étudier les effets possibles des PE présents dans l'alimentation des rongeurs sur le myocarde et plus particulièrement sur les cellules musculaires contractiles, c'est-à-dire les cardiomyocytes. Pour cela, 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 PE en grandes quantités et l'autre dont la source de protéines a été remplacée par la caséine et qui se trouve exempte de PE. Les animaux consommant la diète sans PE reçoivent cette alimentation depuis au moins deux générations afin d'éviter toute transmission de PE de la mère à sa progéniture. Dans des expériences préliminaires, nous avons constaté, en comparant les cardiomyocytes isolés de rats âgés de 12 semaines consommant une nourriture avec ou sans PE, que les cardiomyocytes des animaux qui consomment la diète sans PE sont plus longs que ceux des animaux qui consomment des PE. L'élongation des cellules est similaire chez les mâles et chez les femelles (+ 14%). La présence de PE dans l'alimentation semble donc causer un raccourcissement de la longueur des cardiomyocytes ainsi qu'une diminution du ratio L/l chez les rats adultes (Fig 5, p39; fig 6, p41).

Ayant constaté un effet majeur des PE sur les dimensions des cardiomyocytes, nous avons tenté d'établir quelle était la fenêtre de temps d'exposition aux PE nécessaire et suffisante pour observer ces effets. Pour cela nous avons utilisé les rats WKY consommant la diète sans PE depuis au moins deux générations et réintroduit la

nourriture avec PE dans leur alimentation à différentes périodes. Une fois que la période de temps souhaitée était écoulée, les animaux retournaient à la diète sans PE jusqu'au sacrifice à l'âge de 12 semaines. Nous avons démontré que la réintroduction des PE entre 6 et 12 semaines chez l'animal ne produit aucun effet sur les cardiomyocytes. Leur réintroduction entre la naissance et l'âge de 6 semaines ou entre la naissance et l'âge de 12 semaines produit un résultat intermédiaire entre celui des animaux ayant toujours été exposés aux PE et celui des animaux n'ayant jamais été exposés. Cependant, il semble qu'à l'âge de 6 semaines, il existe déjà des différences dans les dimensions des cardiomyocytes chez les animaux consommant les deux sortes d'alimentation (Fig 7, p42). Nous avons ensuite réintroduit les PE chez la mère durant la gestation (du temps de l'accouplement à la naissance de la progéniture) et/ou la lactation (de la naissance à la troisième semaine de vie de la progéniture) uniquement. La présence des PE dans l'alimentation pendant la gestation ou pendant la lactation diminue de beaucoup la longueur des cardiomyocytes de la progéniture mais aucune de ces deux périodes à elle seule n'est suffisante pour ramener les valeurs à celles des animaux ayant toujours été exposés aux PE (Fig 9, p47). Il semble que les effets des PE sur les cardiomyocytes des rats adultes pendant la gestation et la lactation soient additifs. Ces recherches nous ont permis d'établir que la période d'exposition aux PE nécessaire et suffisante pour obtenir des résultats équivalents aux animaux ayant toujours été exposés aux PE est celle couvrant la gestation et la lactation, c'est-à-dire la période périnatale. Ceci est en accord avec plusieurs études qui ont démontré un passage des PE via le placenta pendant la gestation <sup>285,288</sup> puis par le lait maternel pendant la lactation <sup>282,283</sup> autant chez l'animal que chez l'humain.

Nous avons ensuite voulu établir si les isoflavones présents dans l'alimentation des rongeurs étaient véritablement les responsables des effets observés sur les cardiomyocytes isolés des rats adultes. Pour ce faire, les mères ont été gavées pendant la gestation et la lactation avec la génistéine ou la daidzéine (les deux principaux isoflavones retrouvés dans la nourriture) à des doses équivalentes à celles retrouvées dans l'alimentation des rongeurs <sup>287,288</sup> et les cardiomyocytes de la progéniture ont été analysés à l'âge de 12 semaines. Nous avons montré que la génistéine et la daidzéine étaient

capables de reproduire les effets de la nourriture contenant des PE et ainsi de raccourcir la longueur des cardiomyocytes à des valeurs équivalentes aux animaux ayant toujours été en contact avec des PE (Fig 10, p48). Deux conclusions s'imposent face à ces résultats. La première est que l'effet observé ne peut être imputable à un mécanisme dépendant des récepteurs tyrosines kinases puisque seule la génistéine, et non la daidzéine, possède une activité inhibitrice sur ces enzymes<sup>312</sup>. La deuxième est que l'effet observé n'est pas médié par l'équol, qui possède des effets œstrogéniques<sup>256,299,300</sup> et qui est un métabolite de la daidzéine mais pas de la génistéine<sup>254,256,257</sup>. Ces données montrent que le mécanisme d'action par lequel les PE diminuent la longueur des cardiomyocytes ne peut être attribuable à une inhibition des tyrosines kinases ni au métabolisme intestinal mais plutôt à un mécanisme commun entre la génistéine et la daidzéine.

Etant donnés les changements sur les dimensions des cardiomyocytes provoqués par les isoflavones, nous avons observé, sous des conditions basales, la morphologie du myocarde en rapport avec la présence ou l'absence de PE dans l'alimentation. La présence de PE n'affecte pas le poids des ventricules ni celui des poumons. Par contre, les cœurs des animaux consommant la diète sans PE ont une surface des ventricules plus grande de 26 % chez les mâles et 38% chez les femelles et une cavité du VG plus grande de 46% chez les mâles et 82% chez les femelles par rapport aux cœurs des animaux qui consomment des PE (Tab IV, p52; tab V, p54). De tels phénotypes, en plus de l'élongation des cardiomyocytes, sont caractéristiques d'une dilatation ventriculaire. Ceci est en accord avec plusieurs études qui ont établi une corrélation positive entre la longueur des cardiomyocytes et les dimensions de la cavité du VG<sup>23,28</sup>. D'autre part, la pression artérielle a été mesurée et elle n'est pas différente entre les animaux des deux groupes, autant chez les mâles que chez les femelles (Tab X, p64). Elle ne peut donc pas expliquer la différence de morphologie cardiaque observée. Au niveau fonctionnel, les paramètres hémodynamiques (LVEDP, LVESP, dP/dt (-) et (+)) ne changent pas entre les deux groupes pour les deux sexes. Cependant, nous avons observé à l'état basal que la constante de temps de la chute de pression du VG pendant la phase de relaxation isovolumétrique, tau, était augmentée de manière significative chez les rats ne

consommant pas de PE (Tab VIII, p61; tab IX, p62). L'augmentation de cette constante, même en l'absence d'altérations des autres indices de contractilité, est caractéristique d'une relaxation ventriculaire incomplète et d'une dysfonction diastolique isolée  
307,372,378-380

La dilatation de la cavité ventriculaire semble être un facteur de risque important dans le développement de la défaillance cardiaque autant chez l'humain<sup>33,46-49</sup> que chez l'animal<sup>36</sup>. D'autre part, la longueur des cardiomyocytes corrèle étroitement avec le développement d'une hypertrophie excentrique<sup>28</sup>. A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les rats qui consomment une diète sans PE et qui présentent une dilatation du myocarde ainsi qu'une dysfonction diastolique à l'état basal sont plus propices à la défaillance cardiaque en présence d'une surcharge hémodynamique de volume. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle chirurgical, la fistule AV, qui s'accompagne d'une décompensation cardiaque progressive<sup>35,36</sup>. Plusieurs modèles expérimentaux permettent le développement d'une hypertrophie excentrique chez l'animal. Cependant, il existe de grandes différences entre les espèces et les modèles et seulement quelques uns peuvent mimer certains aspects de la défaillance cardiaque chez l'humain. La plupart des modèles induisent une hypertrophie importante et brusque alors que chez l'humain, elle se développe de façon progressive. Étant conscient qu'il n'existe pas de modèle animal idéal et qui reflète exactement le remodelage cardiaque chez l'humain, la fistule aorto-veineuse reste néanmoins la méthode la plus fiable et la plus représentative en ce qui concerne la surcharge de volume<sup>99</sup>; elle consiste à faire un trou entre l'aorte abdominale et la veine cave, ce qui entraîne un passage du sang oxygéné de l'aorte vers la veine cave et un retour veineux plus important. Cette technique s'avère simple, rapide, efficace, sans chirurgie microvasculaire et avec un faible taux de mortalité<sup>99</sup>. De plus, Huang et al.<sup>381</sup> ont démontré que des aiguilles de tailles différentes (20, 18 ou 16 G) induisent une insuffisance cardiaque faible, modérée ou sévère respectivement, ce qui démontre que le degré d'hypertrophie peut être contrôlé et que la méthode est reproductible.

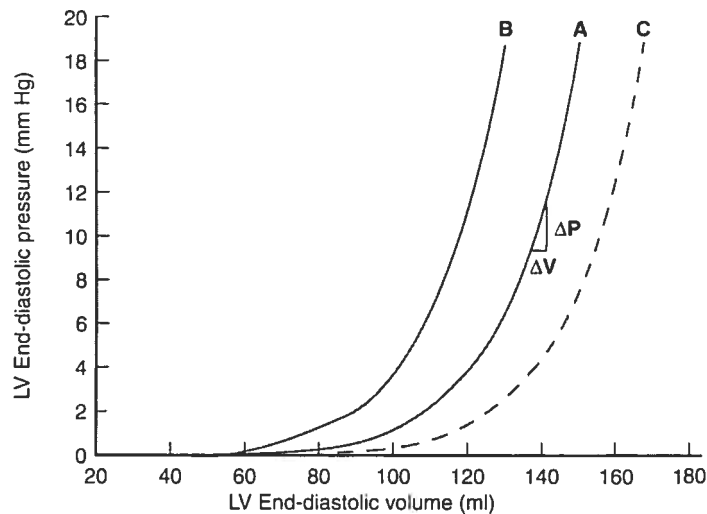
Les animaux utilisés ont été opérés à l'âge de 10 semaines et sacrifiés 12 semaines après la chirurgie. Chez les femelles WKY, ni le poids des ventricules, ni la surface des ventricules ou de la cavité du VG n'augmentent (Tab IV, p52). La longueur et la surface des cardiomyocytes augmentent cependant de 10% et 16% respectivement, ce qui semble montrer que l'élongation des cardiomyocytes précède la dilatation ventriculaire <sup>31</sup>. Par contre, l'absence de PE dans la nourriture des animaux opérés s'accompagne d'une hypertrophie des ventricules de 26%, d'une augmentation de la surface de la cavité du VG de 37% et d'une élongation des cardiomyocytes de 16% (Tab IV, p52). Cependant, le ratio L/l reste constant en raison d'une augmentation concomitante de la largeur. Chez les mâles WKY consommant des PE, le poids des ventricules augmente de 9%, la surface de la cavité du VG de 13%, et la longueur des cardiomyocytes de 9% (Tab V, p54). Mais en comparaison, les animaux consommant la diète sans PE présentent une hypertrophie ventriculaire de 44% et une dilatation de la cavité du VG de 40% (Tab V, p54). Chez les deux sexes, en l'absence de PE dans l'alimentation, le cœur soumis à une surcharge de volume présente une surface des ventricules plus grande, des cardiomyocytes allongés et une dilatation de la cavité du ventricule gauche de 37-40%. Les animaux qui consomment une diète exempte de PE montrent donc des signes évidents d'hypertrophie excentrique. Cela est clairement visible sur les photos de la figure 11 (p56) qui représentent les femelles WKY 12 semaines après la chirurgie, en présence ou en absence de PE dans l'alimentation. Nos résultats sont en accord avec ceux de Brower et al. <sup>35,36</sup> et de Wang et al. <sup>37</sup> qui ont également observé une dilatation ventriculaire ainsi qu'une hypertrophie des cardiomyocytes après induction d'une fistule AV. D'autre part, ces altérations ventriculaires s'accompagnent de signes de défaillance cardiaque étant donné que le poids des poumons augmente considérablement chez les animaux consommant la diète sans PE (11-17%) comparativement à ceux consommant des PE (0-5%) (Tab IV, p52; tab V, p54). De plus, la constante de temps tau augmente de manière significative autant chez les mâles que chez les femelles consommant la diète sans PE alors qu'elle ne varie pas chez ceux consommant des PE (Tab IX, p62). Cette augmentation de tau apparaît en l'absence de variations des autres indices de contractilité comme la LVEDP, la LVESP, le dP/dt (-) et le dP/dt (+). Cependant, plusieurs études ont montré une augmentation de la

LVEDP chez les animaux soumis à la fistule AV <sup>35-37</sup>, ce que nous ne retrouvons pas dans nos résultats. Le remplissage diastolique se fait entre le moment où la pression dans le VG est suffisamment basse et avant l'ouverture de la valve mitrale. La constante de temps tau, représente le temps requis pour que la pression dans le VG diminue de 37% de sa valeur au dP/dt minimum <sup>382</sup>. Tau reflète la phase active de la relaxation ventriculaire qui consiste en une relaxation isovolumique et un remplissage ventriculaire rapide et qui traduit le processus actif de consommation d'énergie pendant la relaxation <sup>382</sup>. Cette mesure est la plus représentative et la plus utile de la relaxation isovolumique du VG <sup>372</sup>. Comparativement, la LVEDP reflète les propriétés de la phase passive de relaxation du VG qui inclut le remplissage ventriculaire plus lent et la contraction des oreillettes et est une mesure de la distensibilité ventriculaire <sup>382</sup>. La dysfonction diastolique se caractérise par une relaxation du cœur inadéquate mais elle peut être divisée en dysfonction diastolique précoce ou tardive suivant la phase affectée <sup>378,382</sup>. Une augmentation de tau n'est pas forcément liée à une augmentation de la LVEDP <sup>379</sup>. Weiss a d'ailleurs démontré que tau est indépendant de la LVEDP et du stress sur la paroi <sup>372</sup>. Dans notre cas, les animaux présentent une dysfonction diastolique précoce puisque tau est affecté, mais pas la LVEDP, ce qui reflète une relaxation plus lente du cœur et un problème relié à la consommation énergétique de la diastole. Parallèlement, les myocards des animaux soumis à la fistule AV sont beaucoup plus distendus (Fig 11, p56). Or, les courbes pression/volume montrent que la pression augmente (dans la phase passive de la diastole) lorsque le cœur est plus raide et moins distensible (déplacement de la courbe vers la gauche) (Fig 12, de A vers B). Le fait que nos données indiquent que la LVEDP n'augmente pas et que le myocarde est plus distendu pourrait signifier un déplacement de la courbe vers la droite (Fig 12, de A vers C). Il a été montré que la fistule AV provoquait un déplacement vers la droite et un aplatissement de cette courbe <sup>383</sup>. Cette distensibilité accrue pourrait être due à une altération des propriétés du collagène extracellulaire. Cette hypothèse devrait être vérifiée lors d'expérimentations subséquentes.



Figure 12 : Exemples de courbes pression/volume.

Un décalage de la courbe vers la gauche (de A vers B) indique qu'une pression du ventricule gauche plus grande sera nécessaire pour distendre le ventricule à un volume similaire. Le ventricule est donc moins distensible. Parallèlement, un décalage de la courbe vers la droite (de A vers C, courbe hypothétique) indique que pour une même pression, le volume du ventricule gauche est plus grand, le ventricule est donc plus distensible.



modifié de Little W.C. et Downes T.R. <sup>380</sup>.

Enfin, nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui rapportent une augmentation de tau, et donc une prolongation de la relaxation isovolumétrique dans plusieurs formes d'hypertrophie chez l'humain <sup>382,384-388</sup>. Nos résultats démontrent une dysfonction diastolique précoce isolée et une relaxation anormale chez les animaux consommant la diète sans PE soumis à une surcharge de volume, alors que ces signes ne sont pas présents chez les animaux consommant des PE. La dysfonction diastolique et l'augmentation du poids des poumons sont des signes de défaillance cardiaque <sup>35,36</sup>, ce qui indique que les animaux consommant la diète sans PE présentent une fonction cardiaque détériorée et sont en décompensation cardiaque.

Enfin, un groupe d'animaux n'ayant jamais consommé de PE a été exposé à une substitution de régime alimentaire juste après la création de la fistule AV (à l'âge de 10 semaines) afin de savoir si la réintroduction des PE en même temps que la chirurgie pouvait prévenir le développement de l'HVG. L'hypertrophie cardiaque se caractérise par la réinduction du programme de gènes fœtaux<sup>21,50,51,53,56</sup>. Il semblait donc intéressant de déterminer si les PE peuvent influencer l'apparition de l'HVG en modulant l'expression de ces gènes au moment où ils sont réexprimés. Nos résultats ont montré que les PE réintroduits le premier jour après la chirurgie ne provoquent aucun effet sur les paramètres morphologiques du cœur et que ce dernier s'hypertrophie autant que celui des animaux n'ayant jamais consommés de PE (données non présentées). Il semble qu'une exposition aux PE depuis la vie fœtale ou dès les premiers jours de vie est nécessaire afin de protéger l'animal durant sa vie adulte à titre de prévention. Les PE ne semblent donc pas posséder de propriétés thérapeutiques pour traiter l'apparition d'une hypertrophie due à la surcharge de volume.

Les mécanismes pathophysiologiques qui expliqueraient la relation entre la masse du ventricule gauche et les risques cardio-vasculaires ne sont pas encore bien connus. L'hypertrophie cardiaque est traditionnellement considérée comme étant une adaptation du myocarde en réponse à une augmentation de la charge cardiaque afin de normaliser le stress sur la paroi et de maintenir la fonction cardiaque. Il est intéressant de revenir sur ce concept. L'HVG possède, au début, des effets bénéfiques en terme d'économie du myocarde et de normalisation du stress. Cependant, l'HVG est un facteur de risque important dans la morbidité et la mortalité reliées aux maladies cardio-vasculaires<sup>1,3,7</sup> et dans la transition du myocarde vers la décompensation cardiaque<sup>8,9</sup>. L'HVG est donc considérée comme un mécanisme compensatoire et nécessaire afin de conserver une fonction contractile adéquate bien que néfaste à long terme en raison de ses conséquences nocives dont la détérioration de la contractilité et l'évolution vers la défaillance cardiaque. De façon intéressante, une étude récente a montré que le développement d'une hypertrophie concentrique en réponse à une constriction aortique et la normalisation du stress sur la paroi qui l'accompagne ne préviennent pas la décompensation cardiaque<sup>389</sup>. En fait, l'hypertrophie semble associée à une détérioration progressive de la fonction

cardiaque et à un élargissement de la cavité du VG alors que les animaux dont le myocarde n'est pas hypertrophié mais chez qui le stress sur la paroi demeure élevé ont une fonction cardiaque préservée<sup>389</sup>. Une autre étude utilisant des souris a montré également que l'HVG et la normalisation du stress aboutissent à une détérioration progressive de la fonction cardiaque alors que les animaux qui ne présentent pas d'HVG mais un stress élevé ont une fonction cardiaque préservée<sup>75</sup>. L'HVG précoce ne semble donc pas entièrement bénéfique. Nos résultats, quoique se rapportant à une hypertrophie excentrique, vont dans le même sens; l'hypertrophie cardiaque apparaît plutôt néfaste et maladaptée puisque seuls les animaux dont le myocarde n'est pas hypertrophié ne présentent pas de signes de défaillance cardiaque. Plusieurs recherches sont en cours afin de tenter de comprendre si l'HVG est un mécanisme bénéfique à stimuler ou un mécanisme néfaste à prévenir. Nos données démontrent que l'HVG ne semble pas être un mécanisme compensatoire nécessaire afin de conserver une fonction cardiaque adéquate étant donné l'état des WKY consommant la diète sans PE 12 semaines après la chirurgie. Plusieurs études ont démontré qu'une réduction de l'HVG représente un pronostic favorable, indépendamment du traitement utilisé<sup>390,391</sup>. Mais ces études tentent de diminuer l'HVG une fois que celle-ci est établie. Cependant, dans notre cas, la situation est différente. La présence de PE dans l'alimentation semble être un facteur de protection contre le développement d'une hypertrophie excentrique, la dysfonction diastolique et la transition vers la défaillance cardiaque. Ces composés agissent donc en prévention et empêchent l'hypertrophie cardiaque de se développer. Cette protection pourrait s'expliquer par le fait que les animaux consommant des PE ne présentent pas à l'état basal de dilatation ventriculaire (élongation des cardiomyocytes et cavité ventriculaire plus grande) ou de dysfonction diastolique par rapport à leurs pairs qui ne consomment pas de PE. Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la dilatation du VG était associée à un pronostic défavorable<sup>33,47-49</sup>. De plus, dû à l'élongation de leurs cardiomyocytes, les animaux consommant la diète sans PE présentent un ratio L/l plus grand. Ce ratio se situe dans des proportions très étroites quelque soit l'âge et la croissance de l'animal<sup>38,39</sup> et des variations du ratio L/l ont un impact fonctionnel et reflètent des adaptations inadéquates du myocarde<sup>32,42,45</sup>. Les altérations de ce ratio, que

nous observons, corrélient donc avec une prédisposition à l'hypertrophie excentrique et à l'apparition de la défaillance cardiaque.

Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que la présence de PE dans l'alimentation maternelle a des conséquences à long terme sur la morphologie des cardiomyocytes et des ventricules de la progéniture pendant la vie adulte et que ces altérations semblent protéger la fonction cardiaque chez les rats consommant des PE par la nourriture et soumis à une surcharge de volume. Le moment d'exposition aux substances œstrogéniques semble d'une importance critique par rapport à la susceptibilité de développer des maladies ultérieurement <sup>392</sup>. Il a été démontré qu'une exposition à la génistéine ou au lait de soya pendant la période périnatale chez le rat entraîne des conséquences sur le développement de l'utérus <sup>295</sup> et diminue l'incidence de cancer du sein <sup>296,297,393-395</sup>. Néanmoins, les seules études à ce sujet se sont penchées sur les effets d'une exposition périnatale aux isoflavones sur le développement sexuel de l'animal ou sur l'incidence des cancers mais il n'existe aucune évidence à ce jour des conséquences possibles sur le cœur. Les résultats de cette étude sont donc les premiers à démontrer un impact direct d'une exposition périnatale aux PE sur la morphologie du myocarde et sur la préservation de la fonction cardiaque en réponse à une surcharge de volume.

Notre hypothèse pour expliquer un effet périnatal des isoflavones et ses conséquences à long terme chez le rat adulte est que ces composés exerceraient des effets épigénétiques. Ainsi, l'expression de certains gènes serait programmée (activée ou inactivée) autour de la période néonatale, sans modification de la séquence d'ADN. La régulation épigénétique peut se faire par méthylation des cytosines ou par méthylation, acétylation ou phosphorylation des histones. L'alimentation peut modifier les événements épigénétiques survenant durant la vie intra-utérine et amener des changements permanents dans l'expression génique. C'est le cas des souris agouti où des suppléments dans l'alimentation maternelle augmentent la méthylation de l'ADN et aboutissent à des changements dans la couleur du pelage ainsi qu'à une augmentation des risques liés à l'obésité, au diabète et au cancer <sup>396,397</sup>. D'autre part, des changements dans la disponibilité de la nourriture durant la vie intra-utérine peuvent augmenter les risques de

mortalité cardio-vasculaire dans la vie adulte chez l'humain <sup>398</sup>. Concernant les isoflavones, une étude a déjà montré qu'une exposition prénatale à la génistéine résulte en une induction ou une répression de l'expression de plusieurs gènes dans le système reproducteur de rat via les récepteurs œstrogéniques <sup>397</sup>. De façon plus précise, il a été montré que les récepteurs œstrogéniques recrutent des coactivateurs qui modifient la structure de la chromatine <sup>399</sup> et que les isoflavones sont capables d'augmenter l'acétylation des histones et l'activité de coactivation de ces récepteurs <sup>400</sup>. Enfin, l'incorporation de génistéine dans l'alimentation amène des changements dans la méthylation de plusieurs îlots de dinucléotides cytosine guanosine (CpG) (fréquemment localisés dans les régions promotrices) <sup>401</sup>, même si cette étude est limitée à l'administration de génistéine pendant la vie adulte chez la souris. Sachant que les PE sont capables d'activer les récepteurs œstrogéniques <sup>300,306,307</sup> et que certains d'entre eux peuvent affecter les événements épigénétiques <sup>400,401</sup>, il est envisageable de penser que ces composés, en se liant aux récepteurs œstrogéniques, pourraient affecter l'expression de certains gènes de façon permanente pendant la période périnatale quand ils sont présents dans l'alimentation maternelle et entraîner des effets bénéfiques à long terme durant la vie adulte de l'animal.

Des études préliminaires au laboratoire utilisant des souches de souris sur les deux sortes d'alimentation ont montré que certaines souches répondent aux PE présents dans la nourriture par un raccourcissement des cardiomyocytes (129/J) mais que d'autres ne répondent pas (A/J, C57BL/6J) (données non présentées). La situation est semblable en ce qui concerne les rats. Les mâles et femelles WKY ainsi que les femelles WKHA possèdent des cardiomyocytes plus courts en présence de PE dans la nourriture mais ceux des mâles WKHA ne présentent aucune variation en présence ou en absence de PE. Nous ne connaissons pas encore le mécanisme d'action ou les voies de signalisation responsables de l'effet des PE sur les cardiomyocytes mais il semble que plusieurs facteurs sont nécessaires afin d'observer une réponse et que ce ne sont pas toutes les souches, voire même les deux sexes, qui possèdent ces facteurs. Les caractéristiques pharmacocinétiques en rapport aux PE (absorption, métabolisme et distribution) pourraient être différentes entre les souches de rats et de souris, ce qui pourrait expliquer

les différences de réponse sur les cardiomyocytes. D'autre part, si les PE agissent via les récepteurs œstrogéniques, il se pourrait que certaines souches ne possèdent pas tous les éléments nécessaires à la réponse aux PE ou présentent des différences dans la réponse aux récepteurs œstrogéniques.

Par extension à l'humain, il est actuellement bien établi que plusieurs maladies répandues dans les pays industrialisés sont reliées à l'alimentation <sup>402</sup>. Les cancers hormono-dépendants (cancer du sein, de la prostate et de l'endomètre), le cancer du colon et les maladies coronariennes sont ce qu'on appelle des « *Western diseases* » car l'incidence et la mortalité qui leur sont associées sont plus élevées dans les pays occidentaux que dans d'autres pays d'Asie et d'Europe de l'est <sup>403</sup>. Plusieurs évidences montrent que l'alimentation influence le développement de ces maladies et que la diète occidentale est le principal facteur responsable de l'incidence élevée de ces maladies dans les pays industrialisés <sup>403</sup>. D'autre part, les asiatiques sont moins touchés par ces maladies et consomment du soya en grandes quantités <sup>276,328,334</sup>. On attribue aux isoflavones une diminution de risques liés à ces maladies ainsi qu'un effet bénéfique sur la santé <sup>277,324-327</sup>. Les isoflavones sont facilement accessibles dans l'alimentation chez l'humain (en consommant des produits dérivés des fèves de soya) et peuvent être retrouvés en quantités suffisantes pour exercer des effets physiologiques <sup>276,277,366</sup>. Les effets observés dans cette étude sur le cœur et sa fonction présentent donc un intérêt clinique et un potentiel thérapeutique majeurs étant donné que la dilatation ventriculaire est fortement liée à la défaillance cardiaque <sup>46-48</sup>, et que cette condition touche actuellement 4.8 millions de personnes aux États-Unis avec 500 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année <sup>10,11</sup> et affectera 20% de la population d'Amérique du Nord maintenant âgée de plus de 40 ans <sup>12</sup>.

## **2. Effet des hormones sexuelles sur la morphologie et la fonction cardiaques**

La morphologie du myocarde et celle des cardiomyocytes sont différentes entre les mâles et les femelles à l'âge adulte. Les mâles présentent une masse cardiaque plus

élevée <sup>199</sup> et des cardiomyocytes plus grands que les femelles. Les hormones sexuelles semblent fortement impliquées dans ces différences de morphologie <sup>209-211</sup>. À partir de ces données, nous avons voulu vérifier si les hormones mâles et femelles influençaient les dimensions des cardiomyocytes et si la présence de PE dans la nourriture pouvait modifier leur impact. Pour cela, nous avons utilisé des mâles et des femelles WKY gonadectomisés sur les deux sortes de nourritures. Nos résultats montrent que les grandeurs des cardiomyocytes ne sont pas affectées de la même manière par la castration selon que les animaux consomment une alimentation avec ou sans PE. Il semble que chez les mâles WKY, la castration n'a aucun effet sur les dimensions des cardiomyocytes en présence de PE alors qu'en l'absence de PE, la castration provoque une diminution de la longueur et de la largeur des cardiomyocytes, ce qui maintient le ratio L/l (Fig 5, p39). Ceci est en accord avec d'autres études qui montrent que la castration diminue le poids du cœur <sup>209-211</sup> et la taille des cardiomyocytes <sup>237</sup> alors que la testostérone l'augmente <sup>208,237</sup>. Chez les femelles WKY et WKHA, la situation est inversée. La gonadectomie n'entraîne aucun effet sur les dimensions des cardiomyocytes en absence de PE dans la nourriture alors qu'en présence de PE, elle provoque une légère augmentation de la longueur des cellules chez les deux souches ainsi qu'une augmentation du ratio L/l chez les WKHA (Fig 5, p39; fig 6, p41). Ceci concorde également avec des études montrant que l'ovariectomie augmente le poids du cœur <sup>209,210,404</sup> (sachant qu'une augmentation du poids du cœur est corrélée avec une augmentation de la taille des cellules) alors que l'administration d'œstrogènes restaure le poids du cœur à la normale <sup>211,212</sup>. Ces études ne montrent pas d'hypertrophie, puisque le ratio poids du cœur /poids du corps ne varie pas, et présentent seulement une augmentation du poids du myocarde associée à une augmentation du poids du corps. Les variations dans les dimensions des cardiomyocytes que nous observons chez les animaux castrés ou ovariectomisés ne peuvent être attribuables au gain de poids associé à la gonadectomie puisque les changements observés ne sont pas les mêmes en fonction de la présence ou de l'absence de PE dans l'alimentation, et que la présence de PE dans la diète n'affecte ni le poids du corps, ni le poids du cœur (Tab IV, p52; tab V, p54). D'autre part, il a été montré que l'ovariectomie provoquait une augmentation de la pression artérielle <sup>404,405</sup>. Cependant, Tanase et al. ont montré que le poids relatif du cœur n'est pas altéré par la pression artérielle tant que

celle-ci ne dépasse pas 140 mmHg <sup>119</sup>. Or l'ovariectomie ne provoque pas d'augmentation de la pression artérielle au-dessus de 140mmHg <sup>404,405</sup> et il est improbable que les variations dans les dimensions des cardiomyocytes que nous observons soient imputables à une augmentation de la pression artérielle. Ceci reste cependant à vérifier dans des expériences subséquentes.

La présence de testostérone semble donc augmenter la longueur et la largeur des cellules alors que les hormones sexuelles femelles, et très certainement les œstrogènes, possèdent des effets inverses et diminuent la longueur des cellules. Cependant, les hormones sexuelles n'agissent pas de la même manière suivant qu'elles soient en présence ou non de PE. Il semble que les PE soient permissifs sur les effets des œstrogènes puisque tous deux agissent dans le même sens sur les cardiomyocytes et que les œstrogènes ne possèdent pas d'effets en l'absence de PE. Ainsi, la présence des PE est nécessaire pour obtenir les effets des œstrogènes. Nous avons montré que la présence de PE dans l'alimentation n'altère pas les concentrations plasmatiques d'œstrogènes ou de progestérone (Tab XI, p65). Une hypothèse expliquant l'effet des hormones sexuelles femelles seulement en présence de PE serait que ces composés pourraient réguler de façon positive les récepteurs œstrogéniques et agir en synergie avec les œstrogènes. De ce point de vue, il a été montré que la génistéine, administrée pendant la période néonatale, régule de façon positive les ER $\alpha$  <sup>406</sup> et que les PE augmentent le taux de liaison des récepteurs œstrogéniques aux ERE <sup>407</sup>. D'autre part, chez le mâle, la présence de PE dans l'alimentation semble inhiber les effets potentiels de la testostérone sur les cardiomyocytes puisque cette hormone n'agit qu'en l'absence de ces composés. Nos résultats ne montrent pas de diminution de concentration plasmatique de testostérone par les PE (Tab XI). Cependant, deux études récentes ont montré une régulation négative des AR en présence de PE dans la nourriture <sup>408</sup> ou de concentrations physiologiques de génistéine <sup>409</sup>. D'autre part, la génistéine possède des effets anti-androgènes <sup>410</sup>. Aussi, l'équol est un anti-androgène qui lie et séquestre la 5'dihydrotestosterone, ce qui abolit les effets physiologiques régulés par les androgènes <sup>411</sup>. Même si cette dernière étude est limitée au niveau de la prostate, ces différentes observations pourraient expliquer le



manque d'effet de la testostérone sur les cardiomyocytes en présence de PE soit par régulation négative des AR, soit par séquestration des androgènes.

Nos données sur la gonadectomie et l'alimentation montrent qu'avec un environnement stéroïdien nul, c'est-à-dire chez des animaux castrés et ne consommant pas de PE par la nourriture, les différences qui existent entre mâles et femelles dans les dimensions des cardiomyocytes sont abolies (au niveau de la longueur des cardiomyocytes et du ratio L/l) (Fig 8, p44). Ainsi, l'orchidectomie diminue la taille des cardiomyocytes alors que l'ovariectomie l'augmente de façon à ce que la longueur des cellules soit la même entre les deux sexes. Ces données démontrent l'implication des hormones sexuelles mâles et femelles à l'origine des différences qui se retrouvent entre les deux sexes à l'état basal, les femelles ayant des cardiomyocytes plus courts que les mâles. Si l'on établit un parallèle avec la masse cardiaque, ceci concorde avec d'autres études démontrant qu'il n'y a pas de différence dans la masse cardiaque avant la puberté<sup>199,200</sup> chez l'humain, et que la différence entre les sexes commence avec l'apparition des hormones sexuelles<sup>199</sup>.

Nos résultats montrent que les mâles WKHA ne répondent pas plus à la castration qu'à la présence ou l'absence de PE dans l'alimentation (Fig 6, p41). Ce qui signifie que les dimensions des cardiomyocytes de ces animaux ne sont pas affectées par les PE, ni par les hormones sexuelles mâles. A ce stade, nous n'avons pas d'explication concernant ces résultats puisque le mécanisme d'action n'est pas encore défini. Cependant, il semble que ces animaux ne possèdent pas les facteurs nécessaires pour répondre aux PE ou aux hormones sexuelles au niveau des cardiomyocytes. Une fois que le mécanisme d'action des composés et des hormones sera ciblé, les mâles WKHA représenteront un modèle intéressant afin de vérifier si ce mécanisme est altéré dans leur organisme.

Les hormones sexuelles sont impliquées dans la réponse hypertrophique. Plusieurs études ont déjà démontré le rôle protecteur des œstrogènes contre le développement de l'hypertrophie cardiaque en présence d'une surcharge de pression<sup>224,226</sup> ainsi que chez les rats SHHF<sup>231</sup> alors que d'autres ont montré les effets néfastes des œstrogènes<sup>234,235</sup> dans

d'autres modèles. Chez l'humain également l'étude « *The Nurse's Health Study* » supporte un rôle bénéfique des HRT associé à une diminution du risque cardiovasculaires<sup>201</sup> alors que les études WHI<sup>204</sup> et HERS<sup>205</sup> supportent une augmentation de ce risque. Inversement, la testostérone semble impliquée dans le développement de l'HVG<sup>240,241</sup>. Nous avons alors vérifié si les différences de morphologie du myocarde et des cardiomyocytes qui se retrouvent à l'état basal entre les sexes (les femelles possédant des cardiomyocytes plus courts que les mâles, quelque soit la souche) aboutissent à un meilleur pronostic chez les femelles que chez les mâles soumis à une surcharge de volume. Chez les rats WKY, 12 semaines après la chirurgie, les femelles ne présentent aucun signe d'hypertrophie alors que chez les mâles, la masse ventriculaire augmente de 18% et la cavité du VG de 28% (Tab II, p50; tab III, p51). Ces derniers ne présentent cependant pas de signe de défaillance cardiaque puisque le poids des poumons n'augmente pas et que la constante de temps tau et la LVEDP restent normales (Tab VIII, p61). Ceci semble indiquer que les mâles développent de l'hypertrophie excentrique en réponse à la fistule AV alors que les femelles ne sont pas affectées. Cependant, les deux sexes ne présentent pas de signes de dysfonction du myocarde ou de défaillance cardiaque. La différence entre les deux sexes se retrouve également chez les animaux consommant la diète sans PE puisque la masse ventriculaire augmente de 26% pour les femelles et de 44% pour les mâles (Tab IV, p52; tab V, p54). Ces données s'accompagnent également d'une dilatation de la cavité du VG plus prononcée chez les mâles que chez les femelles. Les deux sexes ne présentent pas d'altérations dans les différents indices de contractilité mais démontrent néanmoins une augmentation significative de la constante de temps tau sans altération de la LVEDP (Tab IX, p62). Les mâles, autant que les femelles, présentent donc des signes de dysfonction diastolique précoce mais l'HVG reste plus prononcée chez les mâles. En ce qui concerne les WKHA, la différence dans la réponse hypertrophique entre les sexes est perdue mais ceci pourrait s'expliquer par le fait que 12 semaines après la chirurgie, les deux sexes semblent déjà en décompensation cardiaque (le poids des poumons augmentant de 25% chez les femelles et de 35% chez les mâles (Tab II, p50; tab III, p51), la constante de temps tau augmentant également chez les deux sexes (Tab VIII, p61)). Nos résultats démontrent que les femelles sont protégées par rapport aux mâles contre l'hypertrophie due à une surcharge

de volume. Elles présentent une réponse hypertrophique de moins grande amplitude accompagnée d'une fonction cardiaque conservée par rapport aux mâles. Ceci est en accord avec d'autres modèles d'hypertrophie cardiaque qui démontrent un meilleur pronostic chez les femelles en présence d'une surcharge de pression <sup>34,193</sup>, d'un infarctus du myocarde <sup>198</sup> ou d'une défaillance cardiaque <sup>197</sup>. D'autre part, Gardner et al. ont démontré que, pour une HVG comparable, les femelles avaient des cœurs moins dilatés et une mortalité négligeable par rapport aux mâles, 8 semaines après création d'une fistule AV <sup>196</sup>. Nos résultats sont en accord avec le fait que l'hypertrophie semble associée à une détérioration progressive de la fonction cardiaque et un élargissement de la cavité du VG et qu'elle n'est pas nécessaire pour compenser l'augmentation de stress sur la paroi puisque les femelles WKY ne présentent pas de signe d'HVG par rapport aux mâles et sont en meilleure condition. En résumé, la fonction cardiaque reste la même entre les deux sexes d'une même souche mais les femelles présentent une meilleure adaptation à la surcharge de volume par rapport aux mâles avec une hypertrophie et une dilatation ventriculaire moins prononcées.

Plusieurs études ont incriminé les hormones sexuelles autant mâles <sup>208,240</sup> que femelles <sup>224,226,231,241</sup> dans les différences de réponse suite à un stimulus hypertrophique. De plus, une étude récente a démontré que l'ovariectomie provoque une dilatation ventriculaire plus prononcée suite à la création d'une fistule AV par rapport aux femelles intactes <sup>233</sup>. Nos résultats montrent que les hormones sexuelles semblent responsables des différences morphologiques du myocarde et des cardiomyocytes entre les deux sexes puisque les œstrogènes diminuent la longueur des cellules alors que la testostérone l'augmente. Nos données sont en accord avec les différentes publications. Le dimorphisme sexuel observé dans notre étude en réponse à une surcharge de volume pourrait donc être dû à des effets opposés des hormones sexuelles mâles et femelles sur le myocarde.

### 3. Effet des gènes sur la morphologie et la fonction cardiaques

La masse cardiaque est un trait quantitatif complexe déterminé en partie par les facteurs génétiques <sup>114-117</sup> et en partie par les facteurs environnementaux <sup>118</sup>. Plusieurs QTLs ont été associés à la masse cardiaque chez le rat par analyse de liaison génétique <sup>135-140,142</sup>. D'autre part, l'HVG est vraisemblablement le résultat des effets de multiples gènes interagissant indépendamment ou en synergie avec d'autres gènes et/ou l'environnement. De plus en plus de gènes semblent impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque <sup>129,132,133</sup> mais aucun ne peut être tenu pour seul responsable du phénotype hypertrophique. L'étude des gènes responsables du développement de l'HVG est donc une tâche ardue et même si certains gènes ont été associés à des phénotypes hypertrophiques, beaucoup de composantes sont à prendre en compte (l'héritabilité polygénique, l'hétérogénéité des loci, les interactions génétiques) et augmentent le degré de complexité dans la compréhension des mécanismes à l'origine de l'HVG. Les différents modèles animaux permettent de réduire cette complexité génétique grâce à l'utilisation de souches consanguines et à la possibilité de contrôler leur environnement. Entre autre, les souches de rats WKY et WKHA présentent un intérêt majeur dans l'étude des facteurs génétiques à l'origine de la masse cardiaque puisque le phénotype relié à la masse cardiaque est dissocié de celui relié à la pression artérielle. En effet, les deux souches possèdent la même pression artérielle normale mais les WKHA ont une masse cardiaque plus élevée que les WKY <sup>163</sup>.

D'autre part, les souches WKY et WKHA ne présentent pas les mêmes caractéristiques de dimensions des cardiomyocytes. En effet, les mâles WKY et WKHA présentent des cardiomyocytes de même longueur mais de largeur différente, ceux des WKHA étant plus larges, ce qui leur confère un ratio L/l plus petit (Tab I, p38). Chez les femelles, c'est la longueur des cardiomyocytes qui diffère alors que la largeur reste la même entre les deux souches. Les femelles WKHA ont des cardiomyocytes plus courts, et en conséquence un ratio L/l plus petit également (Tab I, p38). Ainsi, quel que soit le sexe, les WKHA possèdent un ratio L/l plus petit que les WKY. Etant donné l'importance du ratio L/l dans le maintien d'une fonction cardiaque adéquate <sup>32,42,45</sup> et les différences

de masse cardiaque qu'il existe entre ces souches, nous avons voulu vérifier si des différences dans la morphologie du myocarde et des cardiomyocytes à l'état basal entre les WKY et les WKHA pouvaient aboutir à des réponses hypertrophiques différentes en présence d'une surcharge de volume.

En observant les cœurs des WKY et WKHA 12 semaines après la création d'une fistule AV, il est évident que les deux souches ne répondent pas de la même façon à la surcharge de volume. Les femelles WKY ne présentent aucun signe d'hypertrophie alors que chez les femelles WKHA, la masse ventriculaire augmente de 48%, la cavité du VG de 131% et le poids des poumons de 25% (Tab III, p51). La longueur des cardiomyocytes des femelles WKHA augmente de 16% mais celle des femelles WKY augmente de 10% (Tab III, p51), ce qui suggère encore une fois que l'élongation des cardiomyocytes précède la dilatation ventriculaire <sup>23,28</sup>. D'autre part, le ratio L/l augmente chez les femelles WKHA par rapport aux femelles WKY chez qui il reste stable. L'augmentation significative du poids des poumons, du ratio L/l des cardiomyocytes et de la constante de temps tau sans altération des autres indices de contractilité (LVEDP, LVESP, dP/dt (-) et dP/dt (+)) (Tab VIII, p61) suggèrent que les femelles WKHA présentent une dysfonction diastolique isolée précoce et évoluent vers la décompensation cardiaque. Enfin, étant donné que les femelles résistent mieux à la surcharge de volume que les mâles <sup>196</sup>, un groupe de femelles WKY et un de WKHA ayant subi une fistule AV ont été sacrifiés 20 semaines après la chirurgie. Les résultats montrent un taux de mortalité nul chez les WKY mais de 45% chez les WKHA (données non présentées). En ce qui concerne les mâles, les WKY présentent une hypertrophie de 18% et une dilatation ventriculaire de 28% en comparaison aux WKHA qui présentent une hypertrophie de 51% et une dilatation ventriculaire de 83% (Tab II, p50). De plus, tout comme les femelles, les mâles WKY n'ont presque pas d'augmentation du poids des poumons (+ 5%) contrairement aux WKHA (+ 36%). La longueur des cardiomyocytes est la même entre les deux souches mais le ratio L/l augmente chez les WKHA (+ 8%) et pas chez les WKY (Tab II, p50). Les mâles WKHA présentent donc également des signes de défaillance cardiaque traduits par l'augmentation significative du poids des poumons, du ratio L/l et de la constante de temps tau (Tab VIII, p61). Nos résultats montrent que les WKHA présentent des signes

évidents d'hypertrophie excentrique, de dysfonction diastolique précoce et de transition vers la défaillance cardiaque contrairement aux WKY, quelque soit le sexe. Même si les WKHA ne possèdent pas des cardiomyocytes plus longs que les WKY, le ratio L/l est plus petit chez les mâles et femelles WKHA par rapport aux WKY. Il semble donc jouer un rôle dans le développement de l'HVG étant donné l'état des WKHA 12 semaines après la chirurgie et son implication dans le maintien d'une fonction cardiaque adéquate<sup>32,42,45</sup>. Nos résultats comparatifs des souches de rat montrent qu'un ratio L/l altéré est prédictif d'une future détérioration du myocarde en réponse à la surcharge de volume.

Des résultats antérieurs dans le laboratoire ont permis d'identifier une région d'intérêt sur le chromosome 5 (bande 5q36) associée à la masse du ventricule gauche et à la concentration ventriculaire en ANF chez les mâles et uniquement à cette dernière variable chez les femelles<sup>142</sup>. Cette région contient le gène *Nppa*, gène précurseur de l'ANF. Le rôle protecteur de l'ANF dans le développement de l'hypertrophie cardiaque est bien établi<sup>166-171</sup>. Le laboratoire a également montré que les mâles et femelles WKHA possèdent une concentration en ANF plus faible que les WKY et qu'une concentration basse en ANF corrélait avec une masse cardiaque élevée<sup>142</sup>. D'autre part, les mâles présentent des différences de largeur des cardiomyocytes, les WKHA ayant des cardiomyocytes plus larges que les WKY. Des études utilisant les lignées congéniques dérivées des souches WKY et WKHA et contenant la région d'intérêt du chromosome 5 ont montré que la largeur des cardiomyocytes corrèle avec ce locus chez les mâles<sup>43</sup>. Par contre, contrairement aux mâles, les lignées congéniques n'ont montré aucun lien entre la longueur des cardiomyocytes et le locus chez les femelles (les cardiomyocytes des femelles WKHA et WKY différant pour la longueur et non pour la largeur)<sup>43</sup>. Ce qui signifie que la longueur des cellules est contrôlée par des régions du génome différentes de celles qui contrôlent la largeur. Ce locus s'avère donc être relié à la masse cardiaque, à la largeur des cardiomyocytes et à la concentration en ANF chez les mâles mais seulement à la concentration en ANF chez les femelles. Étant donné l'importance de la morphologie du myocarde et des cardiomyocytes à l'état basal, nous avons émis l'hypothèse que, chez les mâles, mais pas chez les femelles, ce locus était impliqué dans la protection contre l'hypertrophie cardiaque chez les WKY. Pour ce faire, nous avons

utilisé les lignées congéniques dérivées des WKY et WKHA. Ces lignées sont les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) et les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) contenant respectivement le fragment d'intérêt de la souche WKHA dans le génome de la souche WKY et le fragment d'intérêt de la souche WKY dans celui de la souche WKHA.

Chez les mâles des deux lignées congéniques, on retrouve une hypertrophie de type excentrique. Cependant, il semble que les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) développent une hypertrophie un peu plus prononcée que les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) (Tab VI, p58). En effet, le poids des ventricules augmente de 44%, la surface des ventricules de 48% et la cavité du VG de 67% pour les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245). En comparaison, ces valeurs augmentent de 36%, 31% et 45% respectivement pour les WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245). Le poids des poumons augmente également davantage chez les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245). Ces résultats démontrent que les WKY contenant le locus du chromosome 5 de la souche WKHA présentent une hypertrophie comparable à celle des WKHA et que les WKHA contenant le locus de la souche WKY présentent une hypertrophie un peu plus grande mais comparable à celle des WKY. Chez les souches parentales, ce sont les mâles WKHA qui développent le plus d'hypertrophie en réponse à la fistule AV et chez les souches congéniques, ce sont les WKY contenant un fragment de la souche WKHA. Ce locus contenant le gène *Nppa* et impliqué dans les différences de concentration en ANF, de masse cardiaque et de largeur des cardiomyocytes entre les mâles WKY et WKHA semble également impliqué dans les différences observées dans la réponse hypertrophique entre les deux souches. Ces résultats montrent que le locus D5Cfd50-D5Rat245 des WKHA est nécessaire pour induire l'hypertrophie excentrique et la détérioration du myocarde observée puisque les WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) et les WKHA développent de l'HVG. Cependant, il n'est pas suffisant puisque cette lignée congénique ne présente pas les mêmes signes de détérioration qui s'observent chez les WKHA. La souche WKHA possède certainement plusieurs loci qui expliqueraient sa tendance à la défaillance cardiaque en présence d'une surcharge de volume. De même l'introduction du locus WKY chez les WKHA n'est pas suffisante pour induire un effet protecteur puisque les WKY présentent moins d'hypertrophie que les WKHA contenant

le locus WKY. Chez les femelles, la situation est différente. Les femelles des lignées congéniques WKY.WKHA-(D5Cfd50/D5Rat245) et WKHA.WKY-(D5Cfd50/D5Rat245) répondent de la même manière à la surcharge de volume (Tab VII, p59). Ce qui fait que les WKHA contenant le locus WKY sont hypertrophiées alors que la souche parentale WKY ne l'est pas et les WKY contenant le locus WKHA sont hypertrophiées mais moins que la souche parentale WKHA qui présente des signes évidents de décompensation cardiaque. Le locus identifié sur le chromosome 5 ne semble donc pas être à l'origine des différences observées dans la réponse hypertrophique à la surcharge de volume chez les femelles. Cependant, dans les lignées congéniques, les WKY contenant le locus des WKHA ne sont plus protégées contre le développement de l'HVG et les WKHA contenant le locus des WKY ne sont pas en décompensation cardiaque. Ces données démontrent que même si le locus du chromosome 5 n'est pas à l'origine des différences observées entre les WKY et les WKHA en réponse à la surcharge de volume, il est néanmoins impliqué d'une certaine manière dans le processus hypertrophique chez les femelles puisque la différence est perdue entre les deux lignées.

En résumé le locus D5Cfd50-D5Rat245 du chromosome 5 chez le rat apparaît lié à la réponse hypertrophique en présence d'une surcharge de volume chez les mâles mais pas chez les femelles WKY et WKHA. Ce locus couvre une région de 8 millions de paires de base (~8 cM), ce qui constitue une région de taille modeste, son implication dans la réponse hypertrophique et la susceptibilité à la défaillance cardiaque représente donc un intérêt potentiel. Le locus de la souche WKHA est nécessaire pour observer la détérioration du myocarde mais n'est pas suffisant. D'autres loci sont certainement impliqués dans le pronostic défavorable associé aux WKHA. Le locus de la souche WKY, quant à lui, ne semble pas suffisant pour protéger contre l'hypertrophie cardiaque. Le ratio L/I est plus petit chez les mâles WKHA comparativement aux WKY. Le locus interagit sur ce paramètre et sur la largeur des cardiomyocytes, ce qui expliquerait la décompensation cardiaque observée chez les WKHA. Ces résultats impliquent donc le ratio L/I dans la détermination de la réponse à l'HVG et la susceptibilité à la défaillance cardiaque. Chez les femelles, le locus D5Cfd50-D5Rat245 n'est pas corrélé à la réponse hypertrophique. Les femelles WKHA présentent également un pronostic défavorable



comparativement aux femelles WKY ainsi qu'un ratio L/l plus petit mais il apparaît que ce dernier et la longueur des cardiomyocytes sont régulés par des régions du génome différentes de celles des mâles.

#### **4. Limitations**

Les effets que nous observons sur les cardiomyocytes dus à la présence de PE dans l'alimentation chez le rat doivent être considérés prudemment avant d'être extrapolés à l'humain. Les quantités d'isoflavone retrouvées chez l'humain dont la nourriture est à base de soya (adulte : 1 mg/kg/jour; enfant : 4.5-8 mg/kg/jour) sont plus basses que celles retrouvées dans la nourriture des rongeurs (15-20 mg/kg/jour). Cependant, les différences dans les expositions alimentaires à la daidzéine et à la génistéine entre l'humain et le rat ne se reflètent pas dans les niveaux plasmatiques alors que les demi-vies des isoflavones chez les deux espèces sont similaires<sup>286</sup>. Ceci signifie qu'il faut prendre en considération les caractéristiques pharmacocinétiques différentes (absorption, métabolisme et distribution) avant d'établir des comparaisons entre espèces<sup>412</sup>.

D'autre part, la présence de PE dans la nourriture des rongeurs affecte les cardiomyocytes des rats mâles et femelles WKY, des femelles WKHA ainsi que des souris de la souche 129/J. Par contre, ces composés ne possèdent aucun effet chez les rats mâles WKHA ainsi que chez les souris des souches A/J et C57BL/6J. Il reste que les mécanismes d'action exacts par lesquels les PE agiraient ne sont pas encore connus. L'identification de ces mécanismes est d'une grande importance afin de mieux comprendre pourquoi certaines souches répondent aux PE, et d'autres non. Cette identification est également nécessaire avant de pouvoir transposer ces résultats à l'humain.

## Chapitre 5 : CONCLUSIONS

La présence de phytoestrogènes dans la nourriture des rats consanguins pendant la gestation et la lactation a des effets sur le cœur de leur progéniture pendant l'âge adulte, incluant des effets sur la morphologie et/ou la fonction cardiaque et des effets cardioprotecteurs. La présence de ces composés (et plus particulièrement de la génistéine et de la daidzéine) dans l'alimentation maternelle diminue la longueur des cardiomyocytes, la surface des ventricules et la cavité du ventricule gauche et préserve la fonction diastolique des animaux adultes (lorsque comparés à des rats dont les mères n'ont reçu aucun phytoestrogène dans leur nourriture). Inversement, les animaux dont les mères n'ont pas reçu de phytoestrogènes dans leur alimentation présentent des caractéristiques d'hypertrophie ventriculaire excentrique et évoluent vers la défaillance cardiaque en présence d'une surcharge de volume. Une explication possible de ces données serait que les phytoestrogènes activeraient (via les récepteurs œstrogéniques) des mécanismes épigénétiques pendant la période périnatale, ce qui aurait pour effet de programmer le niveau d'expression de certains gènes de façon permanente durant la vie adulte. Ces résultats présentent un intérêt par extension à l'humain étant donné que les phytoestrogènes sont des composés qui se retrouvent facilement dans l'alimentation chez l'humain, en grande majorité dans les fèves de soya.

Les hormones sexuelles mâle et femelle affectent également les dimensions des cardiomyocytes et sont impliquées dans les différences qui existent entre les deux sexes, les hormones sexuelles femelles diminuant la longueur des cardiomyocytes et les androgènes l'augmentant. D'autre part les hormones sexuelles agissent de façon différente en présence ou en absence de phytoestrogènes, ce qui suggère une interaction de ces composés avec les récepteurs œstrogéniques et androgéniques. Enfin, les hormones sexuelles peuvent également être impliquées dans la réponse hypertrophique à la surcharge de volume car elles sont associées à un meilleur pronostic chez les femelles WKY. Cet effet pourrait toutefois dépendre de la souche de rat, car il n'a pas été observé chez les femelles WKHA.

L'hypertrophie cardiaque est régulée par l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Les rats WKHA présentent non seulement une diminution du ratio L/I de leurs cardiomyocytes par rapport aux rats WKY, mais aussi une plus faible résistance à la défaillance cardiaque en présence d'une surcharge de volume. Nous avons montré précédemment que le locus D5Cfd50-D5Rat245 sur le chromosome 5 était associé à des changements du ratio L/I des cardiomyocytes issus de croisements entre les rats WKY et WKHA. De façon intéressante, l'introduction du locus D5Cfd50-D5Rat245 d'origine WKHA dans des rats WKY chez les mâles, mais pas chez les femelles, affecte non seulement le ratio L/I des cardiomyocytes dans la nouvelle souche congénique, mais aussi la résistance à la décompensation cardiaque.

Pris dans leur ensemble, nos résultats démontrent que des facteurs tant génétiques qu'environnementaux qui affectent la morphologie des cardiomyocytes et du myocarde corrélient avec une moindre résistance du cœur face à la transition d'une forme compensée à une forme décompensée de la défaillance cardiaque. Ces résultats présentent un intérêt clinique majeur étant donné que la défaillance cardiaque est présente de façon épidémique chez l'humain.

## Chapitre 6 : PERSPECTIVES

La suite du projet sera consacrée à la compréhension des mécanismes à l'origine de l'effet des PE sur les cardiomyocytes. Dans un premier temps, des souches de souris KO pour l'un ou l'autre des récepteurs œstrogéniques seront utilisées. Ces souches sont les ERK $\alpha$  (« *Estrogen Receptor-alpha KnockOut* ») et les ERK $\beta$  (« *Estrogen Receptor-beta KnockOut* ») provenant de chez Taconic (Germantown, NY, USA). Ces deux souches ainsi que la souche parentale (C57BL/6) et des souris double KO (générées à l'IRCM) seront placées sur les deux sortes d'alimentation (avec ou sans PE). Après deux générations, pour éviter tout transfert de PE de la mère à sa progéniture chez les animaux consommant la diète sans PE, les cardiomyocytes de ces différentes souches seront observés afin de déterminer si les PE agissent via l'un ou l'autre des récepteurs œstrogéniques ou via les deux.

D'autre part, étant donné que les PE agissent dans une fenêtre de temps correspondant à la gestation et à la lactation chez l'animal et que ces composés pourraient affecter l'expression des gènes de façon permanente durant cette période par des mécanismes épigénétiques, il serait intéressant de considérer quels gènes sont affectés par les phytoœstrogènes présents dans l'alimentation. Pour cela, des mâles et femelles WKY seront sacrifiés à l'âge de trois semaines et constitueront deux groupes; dans le premier, la mère aura consommé la diète sans PE, dans le deuxième, la mère aura consommé des PE pendant le temps de la gestation et de la lactation. La progéniture n'aura été exposée aux PE que par la mère et cela suffit, comme nous l'avons montré, à obtenir des effets des PE sur les cardiomyocytes de ces animaux à l'âge adulte. Les cœurs de ces animaux seront prélevés, l'ARN extrait et analysé par « *microarray* » afin de déterminer le profil d'expression des gènes cardiaques et de savoir quels gènes sont affectés par les PE. Les promoteurs de ces gènes seront ensuite criblés pour des modifications épigénétiques (méthylation des cytosines et des histones, acétylation des histones).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Levy,D., Garrison,R.J., Savage,D.D., Kannel,W.B. & Castelli,W.P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1561-1566 (1990).
2. Schillaci,G. *et al.* Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension* **35**, 580-586 (2000).
3. Koren,M.J., Devereux,R.B., Casale,P.N., Savage,D.D. & Laragh,J.H. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann. Intern. Med.* **114**, 345-352 (1991).
4. Haider,A.W., Larson,M.G., Benjamin,E.J. & Levy,D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1454-1459 (1998).
5. Verdecchia,P. *et al.* Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 1829-1835 (2001).
6. Cooper,R.S. *et al.* Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. *Am. J. Cardiol.* **65**, 441-445 (1990).
7. Vakili,B.A., Okin,P.M. & Devereux,R.B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am. Heart J.* **141**, 334-341 (2001).
8. Jacob,R. & Gulch,R.W. The functional significance of ventricular geometry for the transition from hypertrophy to cardiac failure. Does a critical degree of structural dilatation exist? *Basic Res. Cardiol.* **93**, 423-429 (1998).
9. Norton,G.R. *et al.* Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 664-671 (2002).
10. Ho,K.K., Pinsky,J.L., Kannel,W.B. & Levy,D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **22**, 6A-13A (1993).
11. Berry,C., Murdoch,D.R. & McMurray,J.J. Economics of chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **3**, 283-291 (2001).
12. Redfield,M.M. *et al.* Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* **289**, 194-202 (2003)

13. Redfield,M.M. Heart failure--an epidemic of uncertain proportions. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1442-1444 (2002).
14. Towbin,J.A. & Bowles,N.E. Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr. Cardiol. Rep.* **2**, 475-480 (2000).
15. Villard,E. Genetics and dilated cardiomyopathy. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* **96**, 1049-1053 (2003).
16. Mestroni,L. *et al.* Genetic factors in dilated cardiomyopathy. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* **89 Spec No 2**, 15-20 (1996).
17. Kurrelmeyer,K. *et al.* Cardiac remodeling as a consequence and cause of progressive heart failure. *Clin. Cardiol.* **21**, I14-I19 (1998).
18. Schork,N.J. Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* **29**, 145-149 (1997).
19. Gerdes,A.M. The use of isolate myocytes to evaluate myocardial remodeling. *Trends Cardiovasc.Med.* **2**, 152-155. (1992).
20. Katz,A.M. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **16**, 245-249 (2002).
21. Calderone,A., Takahashi,N., Izzo,N.J., Jr., Thaik,C.M. & Colucci,W.S. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* **92**, 2385-2390 (1995).
22. Gerdes,A.M. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J. Card Fail.* **8**, S264-S268 (2002).
23. Grossman,W., Jones,D. & McLaurin,L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest* **56**, 56-64 (1975).
24. Hamrell,B.B., Roberts,E.T., Carkin,J.L. & Delaney,C.L. Myocyte morphology of free wall trabeculae in right ventricular pressure overload hypertrophy in rabbits. *J. Mol. Cell Cardiol.* **18**, 127-138 (1986).
25. Zierhut,W., Zimmer,H.G. & Gerdes,A.M. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ. Res.* **69**, 609-617 (1991).
26. Smith,S.H. & Bishop,S.P. Regional myocyte size in compensated right ventricular hypertrophy in the ferret. *J. Mol. Cell Cardiol.* **17**, 1005-1011 (1985).
27. Gerdes,A.M., Campbell,S.E. & Hilbelink,D.R. Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest* **59**, 857-861 (1988).

28. Gerdes,A.M. *et al.* Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **86**, 426-430 (1992).
29. Liu,Z., Hilbelink,D.R. & Gerdes,A.M. Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas. 2. Long-term effects. *Circ. Res.* **69**, 59-65 (1991).
30. Yamamoto,K. *et al.* Regulation of cardiomyocyte mechanotransduction by the cardiac cycle. *Circulation* **103**, 1459-1464 (2001).
31. Tamura,T., Onodera,T., Said,S. & Gerdes,A.M. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 2175-2181 (1998).
32. Gerdes,A.M., Onodera,T., Wang,X. & McCune,S.A. Myocyte remodeling during the progression to failure in rats with hypertension. *Hypertension* **28**, 609-614 (1996).
33. Linzbach,A.J. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am. J. Cardiol.* **5**, 370-382 (1960).
34. Douglas,P.S. *et al.* Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1118-1125 (1998).
35. Brower,G.L., Henegar,J.R. & Janicki,J.S. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am. J. Physiol* **271**, H2071-H2078 (1996).
36. Brower,G.L. & Janicki,J.S. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H674-H683 (2001).
37. Wang,X. *et al.* Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J. Appl. Physiol* **94**, 752-763 (2003).
38. Bai,S.L., Campbell,S.E., Moore,J.A., Morales,M.C. & Gerdes,A.M. Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and number in rats. *Anat. Rec.* **226**, 207-212 (1990).
39. Korecky,B. & Rakusan,K. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. *Am. J. Physiol* **234**, H123-H128 (1978).
40. Campbell,S.E., Gerdes,A.M. & Smith,T.D. Comparison of regional differences in cardiac myocyte dimensions in rats, hamsters, and guinea pigs. *Anat. Rec.* **219**, 53-59 (1987).
41. Kozlovskis,P.L. *et al.* Regional increase in isolated myocyte volume in chronic myocardial infarction in cats. *J. Mol. Cell Cardiol.* **23**, 1459-1466 (1991).

42. Gerdes,A.M. & Capasso,J.M. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **27**, 849-856 (1995).
43. Boutin-Ganache,I., Picard,S. & Deschepper,C.F. Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently. *Physiol Genomics* **12**, 61-67 (2002).
44. Liu,Z., Hilbelink,D.R., Crockett,W.B. & Gerdes,A.M. Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas. 1. Developing and established hypertrophy. *Circ. Res.* **69**, 52-58 (1991).
45. Gerdes,A.M., Kellerman,S.E. & Schocken,D.D. The failing heart., pp. 197-205 (New York, 1995).
46. Vasan,R.S., Larson,M.G., Benjamin,E.J., Evans,J.C. & Levy,D. Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1350-1355 (1997).
47. Sandvik,L. *et al.* Heart volume and cardiovascular mortality. A 16 year follow-up study of 1984 healthy middle-aged men. *Eur. Heart J.* **14**, 592-596 (1993).
48. Lauer,M.S., Evans,J.C. & Levy,D. Prognostic implications of subclinical left ventricular dilatation and systolic dysfunction in men free of overt cardiovascular disease (the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **70**, 1180-1184 (1992).
49. Cohn,J.N. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation* **91**, 2504-2507 (1995).
50. Kim,S. *et al.* Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension* **25**, 1252-1259 (1995).
51. Ohta,K., Kim,S. & Iwao,H. Role of angiotensin-converting enzyme, adrenergic receptors, and blood pressure in cardiac gene expression of spontaneously hypertensive rats during development. *Hypertension* **28**, 627-634 (1996).
52. Farivar,R.S., Crawford,D.C., Chobanian,A.V. & Brecher,P. Effect of angiotensin II blockade on the fibroproliferative response to phenylephrine in the rat heart. *Hypertension* **25**, 809-813 (1995).
53. Izumo,S., Nadal-Ginard,B. & Mahdavi,V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 339-343 (1988).
54. Lattion,A.L., Michel,J.B., Arnauld,E., Corvol,P. & Soubrier,F. Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am. J. Physiol* **251**, H890-H896 (1986).



55. Susic,D., Nunez,E., Frohlich,E.D. & Prakash,O. Angiotensin II increases left ventricular mass without affecting myosin isoform mRNAs. *Hypertension* **28**, 265-268 (1996).
56. Imamura,S. *et al.* Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. *Am. J. Physiol* **260**, H73-H79 (1991).
57. Izumo,S. *et al.* Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J. Clin. Invest* **79**, 970-977 (1987).
58. Schwartz,K. *et al.* Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ. Res.* **59**, 551-555 (1986).
59. Chapman,D., Weber,K.T. & Eghbali,M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.* **67**, 787-794 (1990).
60. Villarreal,F.J. & Dillmann,W.H. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am. J. Physiol* **262**, H1861-H1866 (1992).
61. Molkenin,J.D. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228 (1998).
62. Taigen,T., De Windt,L.J., Lim,H.W. & Molkenin,J.D. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 1196-1201 (2000).
63. Bueno,O.F. *et al.* Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4586-4591 (2002).
64. Naga Prasad,S.V., Esposito,G., Mao,L., Koch,W.J. & Rockman,H.A. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**, 4693-4698 (2000).
65. Shioi,T. *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537-2548 (2000).
66. Kunisada,K. *et al.* Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 346-352 (1998).
67. Kunisada,K. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 315-319 (2000).
68. Bueno,O.F. *et al.* The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ. Res.* **88**, 88-96 (2001).

69. Bueno, O.F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 6341-6350 (2000).
70. Wang, Y. *et al.* Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 2161-2168 (1998).
71. Glennon, P.E. *et al.* Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **78**, 954-961 (1996).
72. Zhang, S. *et al.* The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J. Clin. Invest* **111**, 833-841 (2003).
73. Wettschureck, N. *et al.* Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat. Med.* **7**, 1236-1240 (2001).
74. D'Angelo, D.D. *et al.* Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 8121-8126 (1997).
75. Akhter, S.A. *et al.* Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* **280**, 574-577 (1998).
76. Nicol, R.L. *et al.* Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **20**, 2757-2767 (2001).
77. Marino, T.A., Cassidy, M., Marino, D.R., Carson, N.L. & Houser, S. Norepinephrine-induced cardiac hypertrophy of the cat heart. *Anat. Rec.* **229**, 505-510 (1991).
78. Colucci, W.S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. *Clin. Cardiol.* **21**, I20-I24 (1998).
79. Harri, M.N. Metabolic and cardiovascular responses to prolonged noradrenaline load and their antagonism by beta blockade in the rat. *Acta Physiol Scand.* **104**, 402-414 (1978).
80. Teerlink, J.R., Pfeffer, J.M. & Pfeffer, M.A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ. Res.* **75**, 105-113 (1994).
81. Brown, L., Sernia, C., Newling, R. & Fletcher, P. Cardiac responses after norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**, 316-323 (1992).

82. Li,P. *et al.* Gene expression profile of cardiomyocytes in hypertrophic heart induced by continuous norepinephrine infusion in the rats. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 2200-2209 (2003).
83. Dostal,D.E. & Baker,K.M. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am. J. Hypertens.* **5**, 276-280 (1992).
84. Lako-Futo,Z. *et al.* Evidence for a functional role of angiotensin II type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process in vivo in the rat heart. *Circulation* **108**, 2414-2422 (2003).
85. Baker,K.M., Chernin,M.I., Wixson,S.K. & Aceto,J.F. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol* **259**, H324-H332 (1990).
86. Jouannot,P. & Hatt,P.Y. Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am. J. Physiol* **229**, 355-364 (1975).
87. Rockman,H.A., Knowlton,K.U., Ross,J. & Chien,K.R. In vivo murine cardiac hypertrophy: A novel model to identify genetic signaling mechanisms that activate an adaptive physiological response. *Circulation* **87-suppl VII**, 14-21 (1993).
88. Mercadier,J.J. *et al.* Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **49**, 525-532 (1981).
89. Toffolo,R.L. & Ianuzzo,C.D. Myofibrillar adaptations during cardiac hypertrophy. *Mol. Cell Biochem.* **131**, 141-149 (1994).
90. Teiger,E. *et al.* Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest* **97**, 2891-2897 (1996).
91. Weinberg,E.O. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* **90**, 1410-1422 (1994).
92. Cutilletta,A.F., Dowell,R.T., Rudnik,M., Arcilla,R.A. & Zak,R. Regression of myocardial hypertrophy. I. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen. *J. Mol. Cell Cardiol.* **7**, 761-780 (1975).
93. JOHNS,T.N. & OLSON,B.J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* **140**, 675-682 (1954).
94. Jugdutt,B.I., Hutchins,G.M., Bulkley,B.H. & Becker,L.C. Myocardial infarction in the conscious dog: three-dimensional mapping of infarct, collateral flow and region at risk. *Circulation* **60**, 1141-1150 (1979).

95. Jugdutt,B.I. The dog model of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J. Card Fail.* **8**, S472-S475 (2002).
96. Litwin,S.E., Katz,S.E., Morgan,J.P. & Douglas,P.S. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* **89**, 345-354 (1994).
97. Pfeffer,M.A. *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**, 503-512 (1979).
98. Goldman,S. & Raya,T.E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J. Card Fail.* **1**, 169-177 (1995).
99. Garcia,R. & Diebold,S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc. Res.* **24**, 430-432 (1990).
100. Ruzicka,M., Keeley,F.W. & Leenen,F.H. The renin-angiotensin system and volume overload-induced changes in cardiac collagen and elastin. *Circulation* **90**, 1989-1996 (1994).
101. Morganroth,J., Maron,B.J., Henry,W.L. & Epstein,S.E. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann. Intern. Med.* **82**, 521-524 (1975).
102. Penpargkul,S. & Scheuer,J. The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J. Clin. Invest* **49**, 1859-1868 (1970).
103. Oscai,L.B., Mole,P.A. & Holloszy,J.O. Effects of exercise on cardiac weight and mitochondria in male and female rats. *Am. J. Physiol* **220**, 1944-1948 (1971).
104. Hickson,R.C., Hammons,G.T. & Holoszy,J.O. Development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol* **236**, H268-H272 (1979).
105. Scheuer,J. & Tipton,C.M. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu. Rev. Physiol* **39**, 221-251 (1977).
106. de Simone,G., Devereux,R.B., Roman,M.J., Alderman,M.H. & Laragh,J.H. Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension* **23**, 600-606 (1994).
107. Amann,K., Rychlik,I., Miltenberger-Milteny,G. & Ritz,E. Left ventricular hypertrophy in renal failure. *Kidney Int. Suppl* **68**, S78-S85 (1998).
108. Gardin,J.M. *et al.* Relationship of cardiovascular risk factors to echocardiographic left ventricular mass in healthy young black and white adult men and women. The CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. *Circulation* **92**, 380-387 (1995).

109. Lind,L., Andersson,P.E., Andren,B., Hanni,A. & Lithell,H.O. Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J. Hypertens.* **13**, 433-438 (1995).
110. Coca,A. & De la,S.A. Salt sensitivity and left ventricular hypertrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **432**, 91-101 (1997).
111. Galderisi,M., Anderson,K.M., Wilson,P.W. & Levy,D. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **68**, 85-89 (1991).
112. Lauer,M.S., Anderson,K.M., Kannel,W.B. & Levy,D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA* **266**, 231-236 (1991).
113. Nunez,D.J., Clifford,C.P., al Mahdawi,S. & Dutka,D. Hypertensive cardiac hypertrophy--is genetic variance the missing link? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 107-117 (1996).
114. Verhaaren,H.A. *et al.* Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am. J. Cardiol.* **68**, 661-668 (1991).
115. Maron,B.J., Nichols,P.F., III, Pickle,L.W., Wesley,Y.E. & Mulvihill,J.J. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am. J. Cardiol.* **53**, 1087-1094 (1984).
116. Post,W.S., Larson,M.G., Myers,R.H., Galderisi,M. & Levy,D. Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension* **30**, 1025-1028 (1997).
117. Greaves,S.C., Roche,A.H., Neutze,J.M., Whitlock,R.M. & Veale,A.M. Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *Br. Heart J.* **58**, 259-266 (1987).
118. Garner,C. *et al.* Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension* **36**, 740-746 (2000).
119. Tanase,H., Yamori,Y., Hansen,C.T. & Lovenberg,W. Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* **4**, 864-872 (1982).
120. Gardin,J.M. *et al.* Sex, age, and disease affect echocardiographic left ventricular mass and systolic function in the free-living elderly. The Cardiovascular Health Study. *Circulation* **91**, 1739-1748 (1995).
121. Seidman,C.E. & Seidman,J.G. Mutations in cardiac myosin heavy chain genes cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol. Biol. Med.* **8**, 159-166 (1991).

122. Anan,R. *et al.* Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* **93**, 280-285 (1994).
123. Thierfelder,L. *et al.* Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* **77**, 701-712 (1994).
124. Kimura,A. *et al.* Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* **16**, 379-382 (1997).
125. Mogensen,J. *et al.* Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* **103**, R39-R43 (1999).
126. Bonne,G. *et al.* Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* **11**, 438-440 (1995).
127. Satoh,M. *et al.* Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 411-417 (1999).
128. Vikstrom,K.L. & Leinwand,L.A. Contractile protein mutations and heart disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 97-105 (1996).
129. Arnett,D.K., de las,F.L. & Broeckel,U. Genes for left ventricular hypertrophy. *Curr. Hypertens. Rep.* **6**, 36-41 (2004).
130. Kurland,L. *et al.* Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type 1 antagonist treatment in hypertensive patients. *J. Hypertens.* **19**, 1783-1787 (2001).
131. Kurland,L. *et al.* Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am. J. Hypertens.* **15**, 389-393 (2002).
132. Mialet,P.J. *et al.* Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat. Med.* **9**, 1300-1305 (2003).
133. Jamshidi,Y. *et al.* Peroxisome proliferator--activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension. *Circulation* **105**, 950-955 (2002).
134. Lander,E.S. & Schork,N.J. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2048 (1994).

135. Pravenec, M. *et al.* Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J. Clin. Invest* **96**, 1973-1978 (1995).
136. Innes, B.A., McLaughlin, M.G., Kapuscinski, M.K., Jacob, H.J. & Harrap, S.B. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* **31**, 741-746 (1998).
137. Pravenec, M. *et al.* Genetic isolation of a blood pressure quantitative trait locus on chromosome 2 in the spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* **19**, 1061-1064 (2001).
138. Cicila, G.T., Choi, C., Dene, H., Lee, S.J. & Rapp, J.P. Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm. Genome* **10**, 112-116 (1999).
139. Kato, N. *et al.* Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related traits in four segregating populations derived from Dahl hypertensive rats. *Mamm. Genome* **10**, 259-265 (1999).
140. Tsujita, Y. *et al.* Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **279**, H2062-H2067 (2000).
141. Sebki, A. *et al.* Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats: results from an F344xWKY cross. *Hypertension* **33**, 949-953 (1999).
142. Deschepper, C.F. *et al.* Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ. Res.* **88**, 223-228 (2001).
143. Hasenfuss, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **39**, 60-76 (1998).
144. Gill, T.J., III, Smith, G.J., Wissler, R.W. & Kunz, H.W. The rat as an experimental animal. *Science* **245**, 269-276 (1989).
145. Jacob, H.J. & Kwitek, A.E. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 33-42 (2002).
146. Gibbs, R.A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521 (2004).
147. Pennacchio, L.A. & Rubin, E.M. Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome. *J. Clin. Invest* **111**, 1099-1106 (2003).
148. Kwitek, A.E. *et al.* Automated construction of high-density comparative maps between rat, human, and mouse. *Genome Res.* **11**, 1935-1943 (2001).

149. Brudno,M. *et al.* Automated whole-genome multiple alignment of rat, mouse, and human. *Genome Res.* **14**, 685-692 (2004).
150. Twigger,S.N. *et al.* Integrative genomics: in silico coupling of rat physiology and complex traits with mouse and human data. *Genome Res.* **14**, 651-660 (2004).
151. Harrap,S.B. *et al.* The hypertrophic heart rat: a new normotensive model of genetic cardiac and cardiomyocyte hypertrophy. *Physiol Genomics* **9**, 43-48 (2002).
152. McBride,M.W. *et al.* Functional genomics in rodent models of hypertension. *J. Physiol* (2003).
153. Hamet,P. *et al.* Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* **26**, 642-648 (1995).
154. Okamoto,K. & Aoki,K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* **27**, 282-293 (1963).
155. Hallback,M., Isaksson,O. & Noresson,E. Consequences of myocardial structural adaptation on left ventricular compliance and the Frank-Starling relationship in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand.* **94**, 259-270 (1975).
156. Dahl,L.K., Heine,M. & Tassinari,L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nauchni. Tr. Vissh. Med. Inst. Sofiia* **194**, 480-482 (1962).
157. Inoko,M., Kihara,Y., Morii,I., Fujiwara,H. & Sasayama,S. Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol* **267**, H2471-H2482 (1994).
158. Iwai,J. Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* **9 suppl I**, I18-I20. (1987).
159. Gomez,A.M. *et al.* Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* **276**, 800-806 (1997).
160. Haas,G.J., McCune,S.A., Brown,D.M. & Cody,R.J. Echocardiographic characterization of left ventricular adaptation in a genetically determined heart failure rat model. *Am. Heart J.* **130**, 806-811 (1995).
161. Deschepper,C.F., Prescott,G., Hendley,E.D. & Reudelhuber,T.L. Genetic characterization of novel strains of rats derived from crosses between Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats, and comparisons with their parental strains. *Lab Anim Sci.* **47**, 638-646 (1997).
162. Hendley,E.D. & Ohlsson,W.G. Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Am. J. Physiol* **261**, H583-H589 (1991).



163. Deschepper,C.F., Picard,S., Thibault,G., Touyz,R. & Rouleau,J.L. Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H149-H155 (2002).
164. Masciotra,S., Picard,S. & Deschepper,C.F. Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ. Res.* **84**, 1453-1458 (1999).
165. Rapp,J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* **80**, 135-172 (2000).
166. John,S.W. *et al.* Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* **267**, 679-681 (1995).
167. Oliver,P.M. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14730-14735 (1997).
168. Chusho,H. *et al.* Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology* **141**, 3807-3813 (2000).
169. Knowles,J.W. *et al.* Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J. Clin. Invest* **107**, 975-984 (2001).
170. Kishimoto,I., Rossi,K. & Garbers,D.L. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 2703-2706 (2001).
171. Holtwick,R. *et al.* Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J. Clin. Invest* **111**, 1399-1407 (2003).
172. Markel,P. *et al.* Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat. Genet.* **17**, 280-284 (1997).
173. Hayward,C.S., Kelly,R.P. & Collins,P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc. Res.* **46**, 28-49 (2000).
174. Adams,K.F., Jr. *et al.* Relation between gender, etiology and survival in patients with symptomatic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**, 1781-1788 (1996).
175. Adams,K.F., Jr. *et al.* Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study. *Circulation* **99**, 1816-1821 (1999).
176. Gustafsson,F. *et al.* Female sex is associated with a better long-term survival in patients hospitalized with congestive heart failure. *Eur. Heart J.* **25**, 129-135 (2004).

177. Marcus,R. *et al.* Sex-specific determinants of increased left ventricular mass in the Tecumseh Blood Pressure Study. *Circulation* **90**, 928-936 (1994).
178. Levy,D. *et al.* Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann. Intern. Med.* **108**, 7-13 (1988).
179. US bureau of the census. Statistical Abstract of the United States. 177th ed. (1997). Washington DC, US bureau of the census. Report.
180. Ho,K.K., Anderson,K.M., Kannel,W.B., Grossman,W. & Levy,D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* **88**, 107-115 (1993).
181. Gordon,T., Kannel,W.B., Hjortland,M.C. & McNamara,P.M. Menopause and coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **89**, 157-161 (1978).
182. de Simone,G. *et al.* Gender differences in left ventricular anatomy, blood viscosity and volume regulatory hormones in normal adults. *Am. J. Cardiol.* **68**, 1704-1708 (1991).
183. Aurigemma,G.P., Silver,K.H., McLaughlin,M., Mauser,J. & Gaasch,W.H. Impact of chamber geometry and gender on left ventricular systolic function in patients > 60 years of age with aortic stenosis. *Am. J. Cardiol.* **74**, 794-798 (1994).
184. Buonanno,C. *et al.* Left ventricular function in men and women. Another difference between sexes. *Eur. Heart J.* **3**, 525-528 (1982).
185. Carroll,J.D. *et al.* Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* **86**, 1099-1107 (1992).
186. Bommer,W.J. *et al.* Left ventricular systolic function in the cardiovascular health study. *Circulation* **92(8 Suppl I)**, I-335-I-336. (2004). Abstract.
187. Villari,B. *et al.* Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur. Heart J.* **16**, 1410-1419 (1995).
188. Hayward,C.S., Kalnins,W.V. & Kelly,R.P. Gender-related differences in left ventricular chamber function. *Cardiovasc. Res.* **49**, 340-350 (2001).
189. Douglas,P.S. *et al.* 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.* **73**, 548-554 (1995).
190. Crabbe,D.L. *et al.* Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 300-306 (2003).

191. Luchner,A. *et al.* Gender-specific differences of cardiac remodeling in subjects with left ventricular dysfunction: a population-based study. *Cardiovasc. Res.* **53**, 720-727 (2002).
192. Krumholz,H.M., Larson,M. & Levy,D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am. J. Cardiol.* **72**, 310-313 (1993).
193. Weinberg,E.O. *et al.* Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**, 264-273 (1999).
194. Pfeffer,J., Pfeffer,M., Fletcher,P. & Braunwald,E. Alterations of cardiac performance in rats with established spontaneous hypertension. *Am. J. Cardiol.* **44**, 994-998 (1979).
195. Pfeffer,J., Pfeffer,M.A. & Braunwald,E. Perspectives in cardiovascular research: Myocardial hypertrophy and failure., pp. 827-935 (Raven Press, New York,1983).
196. Gardner,J.D., Brower,G.L. & Janicki,J.S. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J. Card Fail.* **8**, 101-107 (2002).
197. Tamura,T., Said,S. & Gerdes,A.M. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension* **33**, 676-680 (1999).
198. Litwin,S.E., Katz,S.E., Litwin,C.M., Morgan,J.P. & Douglas,P.S. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology* **91**, 173-183 (1999).
199. de Simone,G., Devereux,R.B., Daniels,S.R. & Meyer,R.A. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension* **26**, 979-983 (1995).
200. de Simone,G. *et al.* Interaction between body size and cardiac workload: influence on left ventricular mass during body growth and adulthood. *Hypertension* **31**, 1077-1082 (1998).
201. Stampfer,M.J. *et al.* Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N. Engl. J. Med.* **325**, 756-762 (1991).
202. Lim,W.K., Wren,B., Jepson,N., Roy,S. & Caplan,G. Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy. *Am. J. Cardiol.* **83**, 1132-4, A9 (1999).
203. Modena,M.G., Muia,N., Jr., Aveta,P., Molinari,R. & Rossi,R. Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension* **34**, 1041-1046 (1999).
204. Rossouw,J.E. *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* **288**, 321-333 (2002).

205. Hulley,S. *et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* **280**, 605-613 (1998).
206. Grohe,C. *et al.* Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* **416**, 107-112 (1997).
207. Krieg,M., Smith,K. & Bartsch,W. Demonstration of a specific androgen receptor in rat heart muscle: relationship between binding, metabolism, and tissue levels of androgens. *Endocrinology* **103**, 1686-1694 (1978).
208. Marsh,J.D. *et al.* Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 256-261 (1998).
209. Schaible,T.F., Malhotra,A., Ciambone,G. & Scheuer,J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ. Res.* **54**, 38-49 (1984).
210. Malhotra,A., Buttrick,P. & Scheuer,J. Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. *Am. J. Physiol* **259**, H866-H871 (1990).
211. Scheuer,J., Malhotra,A., Schaible,T.F. & Capasso,J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. *Circ. Res.* **61**, 12-19 (1987).
212. Wallen,W.J., Cserti,C., Belanger,M.P. & Wittnich,C. Gender-differences in myocardial adaptation to afterload in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **36**, 774-779 (2000).
213. Ren,J. *et al.* Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **284**, H1800-H1807 (2003).
214. Weiner,C.P. *et al.* Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 5212-5216 (1994).
215. Huang,A., Sun,D., Kaley,G. & Koller,A. Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 1351-1356 (1997).
216. Hishikawa,K. *et al.* Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* **360**, 291-293 (1995).
217. Chen,Z. *et al.* Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest* **103**, 401-406 (1999).

218. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *JAMA* **273**, 199-208 (1995).
219. Pelzer,T. *et al.* 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 192-200 (2000).
220. Dubey,R.K., Gillespie,D.G., Jackson,E.K. & Keller,P.J. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension* **31**, 522-528 (1998).
221. Lee,H.W. & Eghbali-Webb,M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 1359-1368 (1998).
222. Mercier,I., Colombo,F., Mader,S. & Calderone,A. Ovarian hormones induce TGF-beta(3) and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovasc. Res.* **53**, 728-739 (2002).
223. Grohe,C. *et al.* Effects of moexiprilat on oestrogen-stimulated cardiac fibroblast growth. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1350-1354 (1997).
224. van Eickels,M. *et al.* 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **104**, 1419-1423 (2001).
225. Clerk,A., Michael,A. & Sugden,P.H. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J. Cell Biol.* **142**, 523-535 (1998).
226. Babiker,F.A. *et al.* 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* **109**, 269-276 (2004).
227. Deng,Y. & Kaufman,S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. *Life Sci.* **53**, 689-696 (1993).
228. Hong,M. *et al.* Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 213-218 (1992).
229. Nickenig,G. *et al.* Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* **97**, 2197-2201 (1998).
230. Wassmann,S. *et al.* Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* **103**, 435-441 (2001).

231. Sharkey,L.C. *et al.* Effect of ovariectomy and estrogen replacement on cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc- fa cp rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 1527-1537 (1999).
232. Pelzer,T., de Jager,T., Muck,J., Stimpel,M. & Neyses,L. Oestrogen action on the myocardium in vivo: specific and permissive for angiotensin-converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* **20**, 1001-1006 (2002).
233. Brower,G.L., Gardner,J.D. & Janicki,J.S. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol. Cell Biochem.* **251**, 89-95 (2003).
234. Smith,P.J. *et al.* Effects of estrogen replacement on infarct size, cardiac remodeling, and the endothelin system after myocardial infarction in ovariectomized rats. *Circulation* **102**, 2983-2989 (2000).
235. van Eickels,M. *et al.* 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 2084-2092 (2003).
236. Hugel,S. *et al.* Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**, 1427-1434 (1999).
237. Cavasin,M.A., Sankey,S.S., Yu,A.L., Menon,S. & Yang,X.P. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **284**, H1560-H1569 (2003).
238. Kinson,G.A., Layberry,R.A. & Hebert,B. Influences of anabolic androgens on cardiac growth and metabolism in the rat. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **69**, 1698-1704 (1991).
239. Morano,I. *et al.* Regulation of myosin heavy chain expression in the hearts of hypertensive rats by testosterone. *Circ. Res.* **66**, 1585-1590 (1990).
240. Li,Y. *et al.* Androgen Contributes to Gender-Related Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Mice Lacking the Gene Encoding Guanylyl Cyclase-A. *Endocrinology* **145(2)**:951-958. (2003).
241. Cabral,A.M., Vasquez,E.C., Moyses,M.R. & Antonio,A. Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats. *Hypertension* **11**, I93-I97 (1988).
242. Dohrn,M., Faure,W., Poll,H. & Blotevogel,W. Tokokinine, stoffe mit sexualhormonartiger wirkung aus pflanzenzellen. *Med. Klin.* **22**, 1417-1424 (1926).

243. Bennetts,H.W., Underwood,E.J. & Shier,F.L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J.* **22**, 2-12 (1946).
244. Bradbury,R.B. & White,D.E. Estrogens and related substances in plants. *Vitam. Horm.* **12**, 207-233 (1954).
245. Farnsworth,N.R., Bingel,A.S., Cordell,G.A., Crane,F.A. & Fong,H.S. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *J. Pharm. Sci.* **64**, 717-754 (1975).
246. Kurzer,M.S. & Xu,X. Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 353-381 (1997).
247. Setchell,K.D. & Adlercreutz,H. Role of the gut flora in toxicity and cancer., pp. 315-345 (London,1988).
248. Rowland,I. *et al.* Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.* **89 Suppl 1**, S45-S58 (2003).
249. Rimbach,G. *et al.* Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim. Biophys. Acta* **1670**, 229-237 (2004).
250. Holder,C.L., Churchwell,M.I. & Doerge,D.R. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3764-3770 (1999).
251. Doerge,D.R., Chang,H.C., Churchwell,M.I. & Holder,C.L. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **28**, 298-307 (2000).
252. Joannou,G.E., Kelly,G.E., Reeder,A.Y., Waring,M. & Nelson,C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **54**, 167-184 (1995).
253. King,R.A. Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1496S-1499S (1998).
254. Kelly,G.E., Nelson,C., Waring,M.A., Joannou,G.E. & Reeder,A.Y. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin. Chim. Acta* **223**, 9-22 (1993).
255. Axelson,M. *et al.* The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem. J.* **201**, 353-357 (1982).
256. Setchell,K.D., Brown,N.M. & Lydeking-Olsen,E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* **132**, 3577-3584 (2002).

257. Morton, M.S., Wilcox, G., Wahlqvist, M.L. & Griffiths, K. Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *J. Endocrinol.* **142**, 251-259 (1994).
258. Setchell, K.D., Borriello, S.P., Hulme, P., Kirk, D.N. & Axelson, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**, 569-578 (1984).
259. Adlercreutz, H. *et al.* Determination of lignans and isoflavonoids in plasma by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Detect. Prev.* **18**, 259-271 (1994).
260. Adlercreutz, H. *et al.* Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1093-1100 (1991).
261. Adlercreutz, H. *et al.* Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Anal. Biochem.* **225**, 101-108 (1995).
262. King, R.A. & Bursill, D.B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 867-872 (1998).
263. Murphy, P.A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food. Technol.* **36**, 62-64 (1982).
264. Wang, H.J. & Murphy, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1666-1673 (1994).
265. Eldridge, A.C. & Kwolek, W.F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 394-396 (1983).
266. Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y. & Bondi, A. A new isoflavone from soy beans. *Phytochemistry* **22**, 237-239. (1973).
267. Walter, E.D. Genistin ( an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans. *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 3273-3276. (1941).
268. Munro, I.C. *et al.* Soy isoflavones: a safety review. *Nutr. Rev.* **61**, 1-33 (2003).
269. Nakamura, Y., Tsuji, S. & Tonogai, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *J. AOAC Int.* **83**, 635-650 (2000).
270. Nagata, C. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int. J. Epidemiol.* **29**, 832-836 (2000).



271. Wakai,K. *et al.* Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutr. Cancer* **33**, 139-145 (1999).
272. Kim,J. & Kwon,C. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on National Nutrition Survey. *Nutr. Res.* **21**, 947-953 (2001).
273. Jones,A.E., Price,K.R. & Fenwick,G.R. Development and application of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of phytoestrogens. *J. Sci. Food Agric.* **46**, 357-364 (1989).
274. De Kleijn,M.J. *et al.* Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J. Nutr.* **131**, 1826-1832 (2001).
275. Strom,S.S. *et al.* Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutr. Cancer* **33**, 20-25 (1999).
276. Adlercreutz,H. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* **12**, 605-623 (1998).
277. Setchell,K.D. & Cassidy,A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**, 758S-767S (1999).
278. Adlercreutz,H., Markkanen,H. & Watanabe,S. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* **342**, 1209-1210 (1993).
279. Adlercreutz,H. *et al.* Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* **215**, 5-18 (1993).
280. Morton,M.S., Arisaka,O., Miyake,N., Morgan,L.D. & Evans,B.A. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J. Nutr.* **132**, 3168-3171 (2002).
281. Setchell,K.D., Zimmer-Nechemias,L., Cai,J. & Heubi,J.E. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* **350**, 23-27 (1997).
282. Setchell,K.D., Zimmer-Nechemias,L., Cai,J. & Heubi,J.E. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1453S-1461S (1998).
283. Franke,A.A. & Custer,L.J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin. Chem.* **42**, 955-964 (1996).
284. Irvine,C.H., Shand,N., Fitzpatrick,M.G. & Alexander,S.L. Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1462S-1465S (1998).

285. Adlercreutz,H., Yamada,T., Wahala,K. & Watanabe,S. Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 737-743 (1999).
286. Degen,G.H., Janning,P., Diel,P. & Bolt,H.M. Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* **128**, 145-157 (2002).
287. Thigpen,J.E. *et al.* Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci.* **49**, 530-536 (1999).
288. Brown,N.M. & Setchell,K.D. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* **81**, 735-747 (2001).
289. Thigpen,J.E., Setchell,K.D., Goelz,M.F. & Forsythe,D.B. The phytoestrogen content of rodent diets. *Environ. Health Perspect.* **107**, A182-A183 (1999).
290. Murphy,P.A., Farmakalidis,E. & Johnson,L.D. Isoflavone content of soya-based laboratory animal diets. *Food Chem. Toxicol.* **20**, 315-317 (1982).
291. Odum,J. *et al.* Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicol. Sci.* **61**, 115-127 (2001).
292. Boettger-Tong,H. *et al.* A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspect.* **106**, 369-373 (1998).
293. Doerge,D.R., Churchwell,M.I. & Delclos,K.B. On-line sample preparation using restricted-access media in the analysis of the soy isoflavones, genistein and daidzein, in rat serum using liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 673-678 (2000).
294. Doerge,D.R., Churchwell,M.I., Chang,H.C., Newbold,R.R. & Delclos,K.B. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* **15**, 105-110 (2001).
295. Hughes,C.L., Liu,G., Beall,S., Foster,W.G. & Davis,V. Effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **229**, 108-117 (2004).
296. Lamartiniere,C.A., Moore,J., Holland,M. & Barnes,S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 120-123 (1995).
297. Fritz,W.A., Coward,L., Wang,J. & Lamartiniere,C.A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* **19**, 2151-2158 (1998).

298. Shutt,D.A. & Cox,R.I. Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J. Endocrinol.* **52**, 299-310 (1972).
299. Tang,B.Y. & Adams,N.R. Effect of equol on oestrogen receptors and on synthesis of DNA and protein in the immature rat uterus. *J. Endocrinol.* **85**, 291-297 (1980).
300. Morito,K. *et al.* Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 351-356 (2001).
301. Arora,A., Nair,M.G. & Strasburg,G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 133-141 (1998).
302. Drane,H.M., Patterson,D.S., Roberts,B.A. & Saba,N. Oestrogenic activity of soya-bean products. *Food Cosmet. Toxicol.* **18**, 425-427 (1980).
303. Miksicek,R.J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* **44**, 37-43 (1993).
304. Farmakalidis,E., Hathcock,J.N. & Murphy,P.A. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food Chem. Toxicol.* **23**, 741-745 (1985).
305. Miksicek,R.J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 44-50 (1995).
306. Kuiper,G.G. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263 (1998).
307. Martin,P.M., Horwitz,K.B., Ryan,D.S. & McGuire,W.L. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* **103**, 1860-1867 (1978).
308. Brzozowski,A.M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758 (1997).
309. Casanova,M. *et al.* Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.* **51**, 236-244 (1999).
310. Miksicek,R.J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**, 153-160 (1994).
311. Nagel,S.C., vom Saal,F.S. & Welshons,W.V. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 300-309 (1998).

312. Akiyama,T. *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595 (1987).
313. Ogawara,H. *et al.* Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J. Antibiot. (Tokyo)* **42**, 340-343 (1989).
314. Markovits,J. *et al.* Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **49**, 5111-5117 (1989).
315. Okura,A., Arakawa,H., Oka,H., Yoshinari,T. & Monden,Y. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 183-189 (1988).
316. Huang,J., Nasr,M., Kim,Y. & Matthews,H.R. Genistein inhibits protein histidine kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15511-15515 (1992).
317. Matsukawa,Y. *et al.* Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* **53**, 1328-1331 (1993).
318. Traganos,F., Ardelt,B., Halko,N., Bruno,S. & Darzynkiewicz,Z. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.* **52**, 6200-6208 (1992).
319. Li,Y., Upadhyay,S., Bhuiyan,M. & Sarkar,F.H. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene* **18**, 3166-3172 (1999).
320. Fotsis,T. *et al.* Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2690-2694 (1993).
321. Pratt,D.E. & Birac,P.M. Source of antioxydant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* **44**, 1720-1722. (1979).
322. Wei,H., Bowen,R., Cai,Q., Barnes,S. & Wang,Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 124-130 (1995).
323. Record,I.R., Dreosti,I.E. & Mcinerney,J.K. The antioxydant activity of genistein *in vitro*. *J. Nutr. Biochem.* **6**, 481-485. (1995).
324. Cassidy,A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 399-417 (1996).
325. Knight,D.C. & Eden,J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* **87**, 897-904 (1996).
326. Messina,M.J., Persky,V., Setchell,K.D. & Barnes,S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer* **21**, 113-131 (1994).

327. Murkies,A.L., Wilcox,G. & Davis,S.R. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 297-303 (1998).
328. Morton,M.S. *et al.* Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* **32**, 122-128 (1997).
329. Severson,R.K., Nomura,A.M., Grove,J.S. & Stemmermann,G.N. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res.* **49**, 1857-1860 (1989).
330. Ziegler,R.G. *et al.* Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1819-1827 (1993).
331. Stanford,J.L., Herrinton,L.J., Schwartz,S.M. & Weiss,N.S. Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Epidemiology* **6**, 181-183 (1995).
332. Adlercreutz,H. *et al.* Progress in Cancer Research and Therapy: Hormones and Cancer 3., pp. 409-412 (New York,1988).
333. Watanabe,S. & Koessel,S. Colon cancer: an approach from molecular epidemiology. *J.Epidemiol.* **3**, 47-61. (1993).
334. Kagan,A. *et al.* Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J. Chronic. Dis.* **27**, 345-364 (1974).
335. Dunn,J.E. Cancer epidemiology in populations of the United States--with emphasis on Hawaii and California--and Japan. *Cancer Res.* **35**, 3240-3245 (1975).
336. Shimizu,H. *et al.* Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br. J. Cancer* **63**, 963-966 (1991).
337. Robinson,D., Kawamura,T., Hinohara,S., Sakamoto,Y. & Takahashi,T. Levels of cardiovascular risk factors in Japanese people living in the UK. *J. Cardiovasc. Risk* **2**, 449-458 (1995).
338. Soy protein and coronary heart disease. Federal register, 57699-57733. (1999). Report.
339. Bierman,E. & Glomset,J. Williams textbook of endocrinology., pp. 1367-1395 (Saunders 8th ed., Philadelphia,1992).
340. Sirtori,C.R., Even,R. & Lovati,M.R. Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **676**, 188-201 (1993).

341. Jenkins,D.J. *et al.* Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 365-372 (2002).
342. Teede,H.J. *et al.* Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 3053-3060 (2001).
343. De Kleijn,M.J., van der Schouw,Y.T., Wilson,P.W., Grobbee,D.E. & Jacques,P.F. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S.women: the Framingham study. *J. Nutr.* **132**, 276-282 (2002).
344. Sirtori,C.R., Agradi,E., Conti,F., Mantero,O. & Gatti,E. Soybean-protein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. *Lancet* **1**, 275-277 (1977).
345. Terpstra,A.H., van Tintelen,G. & West,C.E. The effect of semipurified diets containing different proportions of either casein or soybean protein on the concentration of cholesterol in whole serum, serum lipoproteins and liver in male and female rats. *Atherosclerosis* **42**, 85-95 (1982).
346. Terpstra,A.H., West,C.E., Fennis,J.T., Schouten,J.A. & van der Veen,E.A. Hypocholesterolemic effect of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 1-7 (1984).
347. Anthony,M.S., Clarkson,T.B., Hughes,C.L., Jr., Morgan,T.M. & Burke,G.L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* **126**, 43-50 (1996).
348. Nagata,C., Takatsuka,N., Kurisu,Y. & Shimizu,H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J. Nutr.* **128**, 209-213 (1998).
349. Crouse,J.R., III *et al.* 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.* **159**, 2070-2076 (1999).
350. Carroll,K.K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J. Am. Diet. Assoc.* **91**, 820-827 (1991).
351. Anderson,J.W., Johnstone,B.M. & Cook-Newell,M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* **333**, 276-282 (1995).
352. Greaves,K.A., Parks,J.S., Williams,J.K. & Wagner,J.D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J. Nutr.* **129**, 1585-1592 (1999).

353. Simons,L.A., von Konigsmark,M., Simons,J. & Celermajer,D.S. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.* **85**, 1297-1301 (2000).
354. Desroches,S., Mauger,J.F., Ausman,L.M., Lichtenstein,A.H. & Lamarche,B. Soy Protein Favorably Affects LDL Size Independently of Isoflavones in Hypercholesterolemic Men and Women. *J. Nutr.* **134**, 574-579 (2004).
355. Cassidy,A., Bingham,S. & Setchell,K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br. J. Nutr.* **74**, 587-601 (1995).
356. Anthony,M.S., Clarkson,T.B., Bullock,B.C. & Wagner,J.D. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2524-2531 (1997).
357. Kirk,E.A., Sutherland,P., Wang,S.A., Chait,A. & LeBoeuf,R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* **128**, 954-959 (1998).
358. Potter,S.M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.* **125**, 606S-611S (1995).
359. Ruiz-Larrea,M.B. *et al.* Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic. Res.* **26**, 63-70 (1997).
360. Wilcox,J.N. & Blumenthal,B.F. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J. Nutr.* **125**, 631S-638S (1995).
361. Nestel,P.J. *et al.* Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 3392-3398 (1997).
362. Deodato,B. *et al.* Cardioprotection by the phytoestrogen genistein in experimental myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 1683-1690 (1999).
363. Ji,E.S., Yue,H., Wu,Y.M. & He,R.R. Effects of phytoestrogen genistein on myocardial ischemia/reperfusion injury and apoptosis in rabbits. *Acta Pharmacol. Sin.* **25**, 306-312 (2004).
364. Zhai,P. *et al.* Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H1223-H1232 (2001).
365. Ogura,T., Shuba,L.M. & McDonald,T.F. L-type Ca<sup>2+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes treated with modulators of tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol* **276**, H1724-H1733 (1999).

366. Liew,R., Stagg,M.A., Chan,J., Collins,P. & MacLeod,K.T. Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.* **61**, 66-76 (2004).
367. Katsube,Y., Yokoshiki,H., Nguyen,L., Yamamoto,M. & Sperelakis,N. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> current in neonatal and adult rat ventricular myocytes by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. *Eur. J. Pharmacol.* **345**, 309-314 (1998).
368. Wang,Y.G. & Lipsius,S.L. Genistein elicits biphasic effects on L-type Ca<sup>2+</sup> current in feline atrial myocytes. *Am. J. Physiol* **275**, H204-H212 (1998).
369. Yokoshiki,H., Sumii,K. & Sperelakis,N. Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**, 807-814 (1996).
370. Liew,R., Williams,J.K., Collins,P. & MacLeod,K.T. Soy-derived isoflavones exert opposing actions on Guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 985-993 (2003).
371. Gao,Z., Lau,C.P., Wong,T.M. & Li,G.R. Protein tyrosine kinase-dependent modulation of voltage-dependent potassium channels by genistein in rat cardiac ventricular myocytes. *Cell Signal.* **16**, 333-341 (2004).
372. Weiss,J.L., Frederiksen,J.W. & Weisfeldt,M.L. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J. Clin. Invest* **58**, 751-760 (1976).
373. Touyz,R.M., Fareh,J., Thibault,G. & Schiffrin,E.L. Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **28**, 797-805 (1996).
374. Gerdes,A.M., Kriseman,J. & Bishop,S.P. Morphometric study of cardiac muscle: the problem of tissue shrinkage. *Lab Invest* **46**, 271-274 (1982).
375. Brockway,B.P., Mills,P.A. & Azar,S.H. A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clin. Exp. Hypertens. A* **13**, 885-895 (1991).
376. Sventek,P., Li,J.S., Grove,K., Deschepper,C.F. & Schiffrin,E.L. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **27**, 49-55 (1996).
377. Goldwyn,S., Lazinsky,A. & Wei,H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol. Drug Interact.* **17**, 261-289 (2000).
378. Gutierrez,C. & Blanchard,D.G. Diastolic heart failure: challenges of diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **69**, 2609-2616 (2004).



379. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur. Heart J.* **19**, 990-1003 (1998).
380. Little, W.C. & Downes, T.R. Clinical evaluation of left ventricular diastolic performance. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **32**, 273-290 (1990).
381. Huang, M., LeBlanc, M.H. & Hester, R.L. Evaluation of the needle technique for producing an arteriovenous fistula. *J. Appl. Physiol* **77**, 2907-2911 (1994).
382. Schertel, E.R. Assessment of left-ventricular function. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **46 Suppl 2**, 248-254 (1998).
383. Kissling, G., Takeda, N. & Vogt, M. Left ventricular end-systolic pressure-volume relationships as a measure of ventricular performance. *Basic Res. Cardiol.* **80**, 594-607 (1985).
384. Hanrath, P., Mathey, D.G., Siegert, R. & Bleifeld, W. Left ventricular relaxation and filling pattern in different forms of left ventricular hypertrophy: an echocardiographic study. *Am. J. Cardiol.* **45**, 15-23 (1980).
385. Lorell, B.H., Paulus, W.J., Grossman, W., Wynne, J. & Cohn, P.F. Modification of abnormal left ventricular diastolic properties by nifedipine in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **65**, 499-507 (1982).
386. Steine, K., Stugaard, M. & Smiseth, O. Mechanisms of diastolic intraventricular regional pressure differences and flow in the inflow and outflow tracts. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 983-990 (2002).
387. Cingolani, O.H., Yang, X.P., Cavasin, M.A. & Carretero, O.A. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **41**, 249-254 (2003).
388. Wigle, E.D. Malvern (ed.), pp. 373-389 (USA, 1994).
389. Esposito, G. *et al.* Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* **105**, 85-92 (2002).
390. Mathew, J. *et al.* Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation* **104**, 1615-1621 (2001).
391. Verdecchia, P. *et al.* Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* **97**, 48-54 (1998).
392. Klein, S.L., Wisniewski, A.B., Marson, A.L., Glass, G.E. & Gearhart, J.P. Early exposure to genistein exerts long-lasting effects on the endocrine and immune systems in rats. *Mol. Med.* **8**, 742-749 (2002).

393. Murrill,W.B. *et al.* Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* **17**, 1451-1457 (1996).
394. Brown,N.M., Wang,J., Cotroneo,M.S., Zhao,Y.X. & Lamartiniere,C.A. Prepubertal genistein treatment modulates TGF-alpha, EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Mol. Cell Endocrinol.* **144**, 149-165 (1998).
395. Foster,W.G., Younglai,E.V., Boutross-Tadross,O., Hughes,C.L. & Wade,M.G. Mammary gland morphology in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein. *Toxicol. Sci.* **77**, 91-100 (2004).
396. Waterland,R.A. & Jirtle,R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5293-5300 (2003).
397. Cooney,C.A., Dave,A.A. & Wolff,G.L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* **132**, 2393S-2400S (2002).
398. Bygren,L.O., Edvinsson,S. & Brostrom,G. Change in food availability during pregnancy: Is it related to adult sudden death from cerebro- and cardiovascular disease in offspring? *Am. J. Human Biol.* **12**, 447-453 (2000).
399. Nye,A.C. *et al.* Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3437-3449 (2002).
400. Hong,T. *et al.* Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 259-264 (2004).
401. Day,J.K. *et al.* Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.* **132**, 2419S-2423S (2002).
402. National Academy of Sciences. Diet, nutrition and cancer. Washington, DC (1982).
403. Adlercreutz,H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* **201**, 3-23 (1990).
404. Mercier,I. *et al.* Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 685-692 (2002).
405. Hernandez,I. *et al.* 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **279**, R1599-R1605 (2000).
406. Jefferson,W.N., Couse,J.F., Padilla-Banks,E., Korach,K.S. & Newbold,R.R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and

multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol. Reprod.* **67**, 1285-1296 (2002).

407. Kostelac,D., Rechkemmer,G. & Briviba,K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7632-7635 (2003).

408. Lund,T.D., Munson,D.J., Adlercreutz,H., Handa,R.J. & Lephart,E.D. Androgen receptor expression in the rat prostate is down-regulated by dietary phytoestrogens. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 5 (2004).

409. Bektic,J. *et al.* Androgen receptor regulation by physiological concentrations of the isoflavonoid genistein in androgen-dependent LNCaP cells is mediated by estrogen receptor beta. *Eur. Urol.* **45**, 245-251 (2004).

410. Rosenberg Zand,R.S., Jenkins,D.J. & Diamandis,E.P. Genistein: a potent natural antiandrogen. *Clin. Chem.* **46**, 887-888 (2000).

411. Lund,T.D. *et al.* Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biol. Reprod.* **70**, 1188-1195 (2004).

412. Whitten,P.L. & Patisaul,H.B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ. Health Perspect.* **109 Suppl 1**, 5-20 (2001).

## **ANNEXE : PUBLICATION ORIGINALE**

### **1. Contribution des auteurs:**

L'ensemble de ce travail n'aurait pu être possible sans la contribution de plusieurs personnes. A ce titre, voici, précisément, la description de la contribution fournie par chaque personne dans la réalisation de ce travail.

Je me suis occupée du travail se rapportant à l'histologie et à la morphologie des cœurs, à l'isolement des cardiomyocytes et à l'ensemble de leurs mesures, à la mise en place du protocole et à l'ensemble de l'analyse des résultats qui a été fait.

Les tâches ont été réparties du fait qu'il existe deux animaleries à l'IRCM (l'une stérile et l'autre non) et que l'accès à l'animalerie stérile ne permet pas l'accès à l'animalerie conventionnelle. Étant donné que je m'occupais des lignées congéniques à l'animalerie stérile, je ne pouvais pas avoir accès à l'autre. Mlle Sonia Bélanger, technicienne en santé animale, s'est ainsi occupée d'opérer les animaux en créant la fistule aorto-veineuse et elle s'est occupée également du gavage des animaux. Le sacrifice des animaux a été fait par Mme Sylvie Picard, assistante de recherche et par Mlle Sonia Bélanger. Enfin, la technicienne du service de physiologie animale de l'IRCM était en charge d'effectuer les gonadectomies sur les animaux, les mesures de contractilité et la prise de pression artérielle nécessitant une expertise dans l'utilisation des appareils utilisés.

## 2. Déclaration des coauteurs de l'article :

Nom de l'étudiante : Emmanuelle Souzeau.

Sigle et titre du programme : Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en physiologie.

**Titre de l'article: Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood.**

Liste des auteurs : Emmanuelle Souzeau (B.Sc.), Sonia Bélanger, Sylvie Picard (B.Sc.) and Christian F. Deschepper (MD).

Soumis à: J. Am. Coll. Cardiol. le 11 novembre 2004 (JACC111004-3665).

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Emmanuelle Souzeau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Effets combinés des gènes, du sexe et de l'environnement sur la morphologie et la fonction des cardiomyocytes de rat adulte ».

CF DESCHEPPER	CF Deschepper	14 dec 2004
Coauteur	Signature	Date
S. Picard		14 dec 2004
Coauteur	Signature	Date
S. Bélanger	Sonia Bélange	14 dec 2004
Coauteur	Signature	Date

### 3. Manuscrit

**Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood.**

Emmanuelle Souzeau (B.Sc.), Sonia Bélanger, Sylvie Picard (B.Sc.)

and Christian F. Deschepper (MD)

Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montreal (QC) Canada H2W 1R7

**Brief title: Dietary isoflavones and cardioprotection**

**Financial support:** This work was supported grant HL69122 from the NIH/NHLBI, by grant MOP-64391 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), and by a CIHR Group Grant to the IRCM Multidisciplinary Research Group in Hypertension.

**Address for correspondence:** Christian F. Deschepper  
IRCM  
110, Pine Ave West  
Montréal (QC) Canada H2W 1R7  
Tel: (514) 987 5759  
Fax: (514) 987 5585  
E-mail: christian.deschepper@ircm.qc.ca

**STRUCTURED ABSTRACT (250 words)**

**Objectives:** The aim of this study was to test whether dietary isoflavones could affect the structure and function of the myocardium and the cardiomyocytes (CMs) that comprise it.

**Background:** In adult rats, elongation of CMs correlates with dilatation of cardiac ventricles and increased susceptibility to heart failure. Although sex steroids may constitute one possible factor that affects the dimensions of CMs, studies on their effects in rodents is complicated by the fact that most commercial soy-based diets (SBD) also contain abundant phytoestrogens (PE).

**Methods:** We fed inbred WKY rats and/or their mothers with either a PE-free casein-based diet (CBD) or a PE-rich SBD. Ventricular CMs were isolated from the hearts of adult rats for calculation of the length/width (L/W) ratio, and structural and functional evaluations were performed on the myocardium from similarly fed animals.

**Results:** Feeding WKY rat dams during gestation and lactation with SBD caused the CMs of their adult offspring to be shorter than in counterparts originating from mothers fed with CBD. SBD had no such effects when given to rats after weaning, and its effects were replicated by supplementing maternal CBD with the isoflavones daidzein and genistein (the most abundant phytoestrogens in SBD). In contrast to rats whose mothers had received SBD, the hearts of adult rats raised with CBD diet only featured dilated

eccentric hypertrophy and progressed towards congestive heart failure when further challenged.

**Conclusions:** The presence of isoflavones in the maternal diet during gestation and/or lactation provides cardioprotection to the hearts of their offspring during adulthood.

### **CONDENSED ABSTRACT**

When soy-based isoflavones are present in the diet of rat dams during gestation and lactation, they caused the cardiomyocytes of their adult offspring to be shorter than in counterparts originating from mothers fed with an isoflavone-free diet. When soy-based isoflavones are absent from the maternal diet, the hearts of their adult offspring feature dilated eccentric hypertrophy and progress towards congestive heart failure when further challenged. Thus, the presence of isoflavones in the maternal diet may program the hearts of their offspring so that they are better protected during adulthood against the transition from compensated to decompensated heart failure.

### **ABBREVIATIONS**

CM: cardiomyocyte; PE: phytoestrogens; SBD: soy-based diet; CBD: casein-based diet; L/W: length/width; CHF: congestive heart failure; LV: left ventricular; ACF: aorto-caval fistula;



## INTRODUCTION

Congestive heart failure (CHF) is a condition approaching epidemic proportions in industrialized countries and represents an ever increasing burden on their economies (1). It has been estimated that the lifetime risk of developing CHF for those over 40 now represents 20% in the North American population (1). Although recently introduced drugs have improved survival of patients with CHF, the aging of the general population is such that the incidence of CHF will remain high in years to come (2). It has been recognized that left ventricular (LV) geometric remodeling represents a critical factor in the transition from compensated to decompensated cardiac impairment (3;4). In particular, LV dilatation represents a type of remodeling that is associated with an especially poor prognosis (5;6).

Adult cardiomyocytes (CMs) are cells that have a distinct rectangular shape upon which one can measure a defined length and width, and thus calculate a length/width (L/W) ratio. The value of the L/W ratio of CMs is highly conserved across male individuals from several mammalian species (ranging from rodents to man) (7). Within male individuals of a single species (i.e. rats), it has also been shown that the L/W ratio of CMs remains constant during development and aging while the volume of CMs increases by as much as 5-fold (8). Departures from that constrained L/W ratio of CMs occur under certain pathophysiological conditions. For instance, elongated CMs represent the cellular manifestation of dilated ventricular remodeling (9). Importantly, elongation of CMs also correlates closely with impaired mechanical performance of hearts during progression towards failure (10;11).

In addition to the large differences observed under pathophysiological conditions, the L/W ratio of CMs from males has been reported to be slightly higher than that of their female counterparts in 2 different rats strains (12;13). Whether such small differences in the dimensions of CMs have an impact of the morphology and function of corresponding hearts has not been determined. Sex-dependent differences may be explained in part by the effect of sex steroids, because both estrogens and androgens may regulate cardiac mass (14-16). However, one complicating variable in studies on the effects of sex steroids in rodents is that most (if not all) standard commercial laboratory rodent chows are soy-based diets that contain phytoestrogens (PE) at sufficiently high concentrations to affect the physiology of several organs (16;17). From a cardiovascular standpoint, it has for instance been shown that dietary soy can lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats (18) or affect the catabolic rate of myosin heavy chain within skeletal muscle (19). We therefore compared standard PE-rich rodent chow to a PE-free diet to test whether dietary PE could alter cardiac morphology (at the level of either cardiomyocytes or whole-hearts), and if so, whether such changes would impact on the function of corresponding hearts.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and reagents**

WKY/Cfd inbred rats originated from a colony maintained at the “Institut de recherches cliniques de Montréal” (IRCM), as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR). The rats were derived from WKY/Cr parents obtained from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada). The rats received either Ralston Purina’s 5012 rat chow (regular soy-based diet) or TestDiet’s PE-free casein-based 5K96 diet (Ren’s Feed, Oakville, ON, Canada). All experimental rats maintained on casein-based diet originated from a colony where the diet had been administered for at least 2 generations. When gavaged, the rats received orally via a blunted gavage needle 0.5 ml of an aqueous solution of 1% medium-viscosity carboxymethylcellulose (Sigma, St-Louis, MO) containing either no drug (for vehicle) or a suspension of 15 mg/ml of daidzein or genistein (LC Laboratories, Woburn, MA). The daily intake of each compound was calculated to match that of rats eating 5012 rat chow under the same conditions [assuming that the 5012 rat chow contained ~ 250 µg isoflavone / g (17)]. For a rat consuming ~ 30 g of chow per day, this amounted to ~ 7.5 mg of each compound / day. All procedures have been reviewed and approved by the institutional Animal Care Committee.

### **Isolation of cardiomyocytes and videomicroscopy**

Cardiomyocytes were isolated from the hearts of rats either at 12 weeks of age (for unoperated animals) or at 22 weeks of age (when surgery was performed). The hearts were rapidly removed from anesthetized animals previously injected intraperitoneally

with 500 units heparin sulfate, and  $[Ca^{2+}]$ -tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method (cardiac retrograde aortic perfusion), as described previously (20;21). Cardiomyocytes were separated from non-cardiomyocytes by sedimentation on a 6% solution of bovine serum albumin, then fixed for 30 min in 0.08 mol/L phosphate buffer containing 1.5% glutaraldehyde in phosphate buffer at 4°C. Both solutions have been shown to preserve the volume of fixed cells as compared to unfixed ones (22). Fixed cardiomyocytes were allowed to settle in Petri dishes containing 0.15 mol/L phosphate buffer and examined with a Zeiss Axiovert microscope connected to a videocamera that allowed capture of the images as electronic files. Using the Northern Eclipse version 6.0 software from Empix imaging (Mississauga, ON, Canada), ~ 100 cells from each animal were analyzed for determination of cell length (defined as the longest length parallel to the longitudinal axis of the myocyte) and cell surface (calculated on the basis of the manual contour drawn around the myocyte). Cell width was calculated by dividing the value of surface by that of length.

#### **Radiotelemetry measurement of blood pressure.**

Systolic and diastolic blood pressure were continuously and chronically monitored by radiotelemetry, as described previously (23;24). The telemetry transmitters (Datasciences International, St. Paul, MN) were implanted into the abdominal cavity of rats (with the catheter inserted into the distal portion of the descending aorta) at 10 weeks of age. After a 2 week recovery period, values for blood pressure and locomotor activity were recorded every 5 minutes for 10 sec, using the Dataquest ART 2.3 acquisition software (Datasciences International, St. Paul, MN). Hourly averages then were calculated for both variables. The hourly averages were then averaged again either

for the full 24 hour period, or for periods of 6 hours corresponding to night-time activity or day-time rest.

### **Surgery**

All surgeries were performed under isoflurane ventilation. Aorto-caval fistulae (ACF) were performed at 10 weeks of age, as described previously (25). Twelve weeks after surgery, the patency of the fistula was checked by visual inspection in order to exclude from the fistula group those animals where the fistula was no longer functional (an event that occurred in < 10 % of the operated animals). Gonadectomies were all performed at 5 weeks of age, using standard procedures.

### **Hemodynamic measurements**

Before instrumentation, the rats were sedated by intramuscular administration (1.5  $\mu$ l /g body weight) of a 1:1 mix of a sedative (droperidol 2.5 mg/ml) and an analgesic (fentanyl 50  $\mu$ g/ml). A French-2 single sensor pressure catheter (Millar Instruments, Houston, TX) was inserted within the right carotid artery and pushed within the left ventricle. Recording signals were acquired using a PowerLab/8 SP acquisition system (ADInstruments, Colorado Springs, CO). All signals were analyzed using the accompanying software application, and variables calculated using corresponding equations.

### **Cardiac morphology**

The heart from each animal was removed with the ascending aorta attached. A PE90 catheter was inserted into the aorta above the level of insertion of the coronary arteries,

and the heart was infused with a cold isotonic solution containing 100 mM KCl and 50 mM NaCl to arrest the heart in diastole. After diastolic arrest was obtained, the catheter was pushed further into the LV cavity and filled with the same solution in order to obtain an intra-cavital pressure of 15 mmHg, as described previously (20). The hearts were fixed in their distended form by immersion in formalin for 24 hours, so that subsequent morphological comparisons were performed between hearts that had all been fixed under identical standardized intracavital pressure conditions. Sagittal sections (~ 2 mm) were cut at the mid-ventricular level of all fixed hearts. Sections were examined on each side with a stereomicroscope, images were captured as electronic files and analyzed using the Northern Eclipse version 6.0 software. For each heart section, morphological values were calculated by averaging the values obtained for each side of the section.

For determination of organ weight, lungs were weighed immediately after sacrifice, and biventricular cardiac weight was determined after the 24-hour fixation period. The organ weight values were normalized by dividing them by the value of tibia length, as calculated by performing direct measurements on X-ray pictures of the hind legs of each animal.

## RESULTS

We first compared the dimensions of CMs isolated from the hearts of either male or female WKY rats, originating from colonies fed with either regular soy-based diet (SBD) or PE-free casein-based diet (CBD) for at least 2 generations (Table 1). In animals fed with SBD, the length (L) and L/W ratio of CMs was ~5% higher (and significantly so) in males than in females. However, these differences were no longer detectable when the animals were maintained with PE-free CBD. Moreover, the PE content of the diet appeared to affect the dimensions of CMs to a greater extent than the sex of the animals, since CMs of either male or female rats maintained with CBD were ~13% longer than that of their counterparts maintained on SBD. The weight of litters originating from dams maintained with SBD was not different from that of dams maintained with CBD (Table 1).

To determine when during development exposure to PE may affect the dimensions of CMs, we used mothers previously maintained on CBD and reintroduced SBD during either gestation (by switching diets just prior to mating), lactation (by switching diets just after birth) or the combined two periods. After weaning (at about 3 weeks of age), the progeny from all mothers were maintained solely on CBD, and ventricular CMs were isolated when they reached 12 weeks of age. In the adult female progeny, we observed that the L/W ratio of CMs from rats originating from mothers who had received SBD either prior to and/or after birth was smaller than that of CMs from rats whose mothers had not received any dietary PE (Fig. 1). The effects of exposure to SBD during gestation and lactation were additive: the greatest effect was observed when

SBD was given to mothers during both periods, and the L/W ratios of corresponding CMs was similar to that of female rats originating from colonies maintained continuously on SBD. We also observed that when rats maintained on the PE-free CBD were ovariectomized before puberty, the dimensions of CMs isolated from adult rats were not different from that of intact female rats maintained on the same diet. Moreover, there was a clear time-window for the effect of SBD, since reintroducing it between 6 to 12 weeks of age to ovariectomized rats without any prior exposure to PE had no effect on the dimensions of CMs (data not shown).

When using the L/W ratio of CMs as the sole end-point, the effects of dietary PE on the dimensions of male CMs was similar to that observed in females (Fig. 1). However, contrary to female rats, both the width and length of CMs from adult male rats that had been gonadectomized before puberty were smaller than that of CMs from sham-operated counterparts (Fig. 1). This effect of testicular hormones also differed from that of PE because they affected the length and width of CMs in a proportional manner, so that the net effect of the L/W ratio was nil. Consequently, all further experiments were performed using animals from one sex only. By focusing on female progenies, we avoided the possible confounding effects of androgens, since the latter appeared to have effects that were additional to that of dietary PE.

To verify that the effect of SBD may be attributed to PE only, dams that had been maintained prior to mating on CBD were gavaged daily during the combined gestational and lactational periods with either vehicle or a suspension of either daidzein or genistein.



The latter compounds are two isoflavones that represent the most abundant PE in rodent SBD (26;27). We observed that both isoflavones decreased the L/W ratio significantly compared to animals whose mothers had received only vehicle, down to values similar to what we had observed with animals whose mothers had received SBD during the same period (Fig. 2). Thus, isoflavones can account for the entirety of the effect of soy-based diets on the relative dimensions of CMs.

Given the association previously reported between elongated CMs and dilated eccentric hypertrophy (9), we tested whether PE in the maternal diet also had effects on the morphology and function of the hearts of the progeny. Under basal conditions, we observed that in addition to increased CM length, the surfaces defined by LV parenchyma and LV cavity were both significantly higher in rats whose mothers had been maintained with PE-free diet than in rats whose mothers had received SBD (Fig. 3 and Table 2). Such cardiac features define what is referred to as dilated eccentric ventricular hypertrophy. Blood pressure was not different in animals from both groups (Table 3), and therefore could not account for the differences in cardiac morphology. Functionally, we also observed that rats originating from mothers without PE exposure had features of isolated diastolic dysfunction, because the time constant of LV pressure decay ( $\tau$ ) was increased in the absence of alterations of other indices of contractility (Table 3).

Since eccentric dilated ventricular hypertrophy has been associated with adverse cardiovascular prognosis (5;6), we tested whether this condition would predict the

ability to resist the transition from compensated to decompensated heart failure. ACF is a maneuver that induces volume overload and may be accompanied by progressive heart decompensation in rats (28). Surgery was performed at 10 weeks of age to induce ACF in rats originating from mothers who had received either type of diet, and rats were killed 12 weeks after the surgery. In rats originating from mothers who had received SBD, ACF increased the length and surface of CMs by ~10 % and 16 %, respectively (Table 2), but the surgical maneuver did not lead to changes that were detectable at the level of the whole heart (Table 2 and Fig. 3). In contrast, 12 weeks of volume overload did increase the values of LV parenchyma surface, LV cavity surface and adjusted biventricular weight in rats whose mothers had not received any dietary PE, since corresponding values were increased by 16 %, ~26 % and ~37%, respectively. These ventricular changes were accompanied by signs of congestive cardiac failure, since there was a ~17% increase in adjusted lung weight. The dimensions of the CMs also changed to a greater extent than in rats whose mothers had received SBD, since their length and surface were increased by ~16 % and 31 %, respectively.

## DISCUSSION

Isoflavones are compounds that are abundant in most (if not all) commercial standard laboratory rat chows. Our findings show that the presence of isoflavones in maternal diet has long-term consequences on the morphology and function of the hearts of the adult progeny. In humans, there is evidence that isoflavones may have several beneficial effects on cardiovascular health, including effects on plasma lipoprotein concentration and on systemic arterial compliance (an indicator of atherosclerosis extent) (29). However, most of the effects of these compounds have been attributed to exposure during adult life, and they have not previously been shown to have enduring structural effects. Likewise, isoflavones have been reported to inhibit L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in cultured cardiomyocytes (30), but such direct actions *in vitro* are clearly of a different nature than the effects observed in the present study. Of note, genistein (but not daidzein or its metabolites) has anti-tyrosine kinase properties (30), and daidzein (but not genistein) can be metabolized by intestinal flora into the bioactive metabolite equol (31). However, the equivalent potency of both compounds indicates that their effects on the length of CMs cannot be attributed solely to inhibition of tyrosine kinases or intestinal metabolism. When PE were absent from the maternal diet during the combined gestational/lactational period, the increased length of CMs in the adult offspring was accompanied by morphological features of dilated eccentric hypertrophy and isolated diastolic ventricular dysfunction. When these hearts were further challenged by volume overload, they progressed (unlike those of rats whose mothers had been fed with SBD) towards congestive heart failure.

Most strikingly, the effects of perinatal dietary isoflavones persisted in the adult offspring well beyond the time these compounds had been removed from the diet. Interestingly, epidemiological studies in human populations have indicated that poor fetal and infant growth associate with the occurrence of the metabolic syndrome later during adult life (32). Similar findings have been reported in rats (33). However, there is no evidence that the effects of PE on CMs may be due to a similar mechanisms, because the nutritional value of CBD and SBD were similar, and there were no differences in the weight of the neonatal litters originating from mothers fed with either type of diet.

The finding that dietary PE affect the morphology of CMs only when present during the perinatal period is somewhat paradoxical given the fact that the growth of these cells is far from being complete at 3 weeks of age, and that they continue to grow well beyond that age (8). Although one may hypothesize that the perinatal effects are such that later growth can no longer compensate for the early structural changes, this would be surprising in light of the fact that the adult heart retains considerable remodeling capabilities. Alternatively, one may consider the possibility that dietary PE induce epigenetic modifications of genomic DNA within cardiac cells during the perinatal period. Such effects [that are typically accompanied by changes in the acetylation of histones and in the recruitment of regulators of chromatin (34)] may result in the reprogramming of the level of expression of certain cardiac genes, and thus may persist well after PE have been removed from the diet. Accordingly, incorporation of genistein in the diet has been reported to induce changes in the methylation status of several

cytosine guanine dinucleotide (CpG) islands in tissues other than heart (35). Moreover, estrogen receptors themselves can recruit coactivators which modify chromatin structure (36), and isoflavones in particular have been reported to increase the histone acetylation activity of estrogen receptors (37). Chromatin-mediated effects may well lead to modifications of the structural properties of CMs, since histone deacetylases are potent regulators of the LVH transcriptional response (38;38).

At present, we do not know whether estrogen receptors are required to observe the effects of dietary PE on CMs. Neither endogenous ovarian hormones nor PE had any effects on CMs after puberty. Interestingly, administration of diethylstilbestrol has been reported to alter the methylation status of the lactoferrin gene when given to neonatal mice from postnatal days 1 through 5, but not when given after 30 days of age (35). In contrast to either endogenous ovarian hormones or dietary PE, post-pubertal testicular hormones (presumably androgens) increased the size of CMs. This effect is in agreement with the previous report that CMs contain androgen receptors, and that androgens increase protein synthesis in cultured adult CMs (15). Of note, testicular hormones increased both the width and length of CMs in a proportional manner, so that there was no net effect on the L/W ratio (in contrast to the effect of dietary PE). Changes in the dimensions of CMs are believed to have functional consequences mostly when the relative proportions of length vs. width are altered (7;9).

It is somewhat surprising to observe that minute differences in the composition of the maternal diet have cardiac effects whose magnitude is similar to that observed in many

transgenic mouse models of cardiac dysfunction. However striking, it is unclear at present whether the present observations about the effects of PE on the dimensions of CMs can be extended to all mammals. For instance, we have observed that the impact of both types of diet on the dimensions of CMs varied greatly in different strains of inbred mice (E. Souzeau and C.F. Deschepper, unpublished observations). On a broader note, several studies support the hypothesis that diets associated to certain cultures have beneficial health effects (39). For Japanese in particular, some of these effects have been attributed in part to abundance of isoflavones in the diet (40). If the current findings are applicable to humans, that hypothesis might be extended to support the concept that the beneficial effects of certain diets may not be limited to adult consumption, but may derive from early exposure during the development period.

## REFERENCES

1. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JCJ, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community. Appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003;289:194-202.
2. Redfield MM. Heart failure - an epidemic of uncertain proportions. *New Engl J Med* 2002;347:1442-4.
3. Jacob R, Gülch RW. The functional significance of ventricular geometry for the transition from hypertrophy to cardiac failure. Does a critical degree of structural dilatation exist? *Basic Res Cardiol* 1998;93:423-9.

4. Norton GR, Woodiwiss AJ, Gaasch WH et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodelling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:664-71.
5. Katz DM. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:245-9.
6. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Levy D. Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *New Engl J Med* 1997;336:1350-5.
7. Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:849-56.
8. Korecky B, Rakusan K. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and numbers. *Am J Physiol* 1978;234:H123-H128.
9. Gerdes AM. The use of isolated myocytes to evaluate myocardial remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 1992;2:152-5.
10. Kramer CM, Rogers WJ, Park CS et al. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1773-8.
11. Tamura T, Onodera T, Said S, Gerdes AM. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2175-81.

12. Bai S, Campbell SE, Moore JA, Morales MC, Gerdes AM. Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and numbers in rats. *Anat Rec* 1990;226:207-12.
13. Tamura T, Suleman S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension* 1999;33:676-80.
14. van Eickels M, Grohé C, Cleutjens JPM, Jansenn BJ, Wellens HJJ, Doevendans PAF.  $17\beta$ -estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001;104:1419-23.
15. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998;98:256-61.
16. Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 2003;112:302-7.
17. Brown NM, Setchell KDR. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* 2001;81:735-47.
18. Martin DS, Breitkopf NP, Eyster KM, Williams JL. Dietary soy exerts an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 2001;281:R553-R560.



19. Nikawa T, Ikemoto M, Sakai T et al. Effects of a soy protein diet on exercise-induced muscle protein catabolism in rats. *Nutrition* 2002;18:490-5.
20. Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL. Characterization of left ventricular myocardium, isolated cardiomyocytes and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol* 2002;82:H149-H155.
21. Touyz RM, Fareh J, Thibault G, Schiffrin EL. Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996;28:797-805.
22. Gerdes AM, Kriseman J, Bishop SP. Morphometric study of cardiac muscle. The problem of tissue shrinkage. *Lab Invest* 1982;46:271-4.
23. Brockway BP, Mills PA, Azar SH. A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clin Exp Hypertens [A]* 1991;13:885-95.
24. Sventek P, Li J-S, Grove KL, Deschepper CF, Schiffrin EL. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in malignant hypertension induced by L-NAME treatment in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996;27:49-55.
25. Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rats. *Cardiovasc Res* 1990;24:430-2.

26. Thigpen JE, Setchell KDR, Ahlmark KB et al. Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci* 1999;49:530-6.
27. Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol Lett* 2002;128:145-57.
28. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol* 2001;280:H674-H683.
29. Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* 2002;132:566S-9S.
30. Liew R, Williams JK, Collins P, Macleod KT. Soy-derived isoflavones exert opposing actions on guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:985-93.
31. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1191-201.
32. Hales NC, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med J* 2001;60:5-20.
33. Khan I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. Predictive adaptative responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 2004;110:1097-102.
34. Jaenich R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet* 2003;33:245-54.

35. Day JK, Bauer AM, desBordes C et al. Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* 2002;132:2419S-23S.
36. Nye AC, Rajendran RR, Stenoien DL, Mancini MA, Katzenellenbogen BS, Belmont AS. Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptors. *Mol Cell Biol* 2002;22:3437-49.
37. Hong T, Nakagawa T, Pan W-J et al. Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:259-64.
38. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 2002;110:479-88.
39. Simopoulos AP. The mediterranean diets: what is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr* 2001;131:3065S-70S.
40. Kagan A, Harris BR, Winkelstein WJr et al. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chronic Dis* 1974;27:345-64.

**Table 1:** Effects of sex and diet on the dimensions of cardiomyocytes isolated from adult hearts and neonatal whole-body weight.

Group	Sex	Diet	Dimensions of cardiomyocytes			NN BW (g)	
			L ( $\mu\text{m}$ )	W ( $\mu\text{m}$ )	L/W	D 0	D 4
a	M	SBD	125.8 $\pm$ 1.76 <sup>bc</sup>	22.4 $\pm$ 0.29 c	5.72 $\pm$ 0.06 bc	4.71 $\pm$ 0.27	8.07 $\pm$ 1.01
b	F	SBD	119.5 $\pm$ 0.48 <sup>ad</sup>	22.3 $\pm$ 0.17	5.45 $\pm$ 0.04 ad	4.12 $\pm$ 0.38	7.20 $\pm$ 0.86
c	M	CBD	143.1 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	24.5 $\pm$ 0.13 a	5.93 $\pm$ 0.04 a	4.71 $\pm$ 1.13	7.89 $\pm$ 1.14
d	F	CBD	135.4 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	22.7 $\pm$ 0.25	6.09 $\pm$ 0.06 b	4.53 $\pm$ 0.25	7.89 $\pm$ 0.91

All values are means  $\pm$  SEM (n = 5-8). Cardiomyocytes have been isolated from the hearts of adult rats at 12 weeks of age. M: male; F: female; SBD: soy-based diet; CBD: casein based diet; M: male; F: female; L: length; W: width; NN BW: neonatal body weight, measured at either day 0 (D 0) or day 4 (D 4). <sup>abcd</sup> $P \leq 0.01$  vs. groups indicated in superscript. Significance levels were assessed by one-way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc tests.

**Table 2:** Impact of maternal diet on organ features and dimensions of cardiomyocyte under basal conditions or in the presence of volume overload

variable	Soy-based diet (PE-rich)			Casein-based diet (PE-free)		
	sham	ACF	% change	sham	ACF	% change
LV cavity (mm <sup>2</sup> )	22.4 ± 1.24	21.05 ± 3	↓ 6 %	40.9 ± 4.8 <sup>†</sup>	56.1 ± 4.7*	↑ 37 %
LV surface (mm <sup>2</sup> )	97 ± 3.17	91 ± 3.36	↓ 6 %	133.4 ± 2.7 <sup>††</sup>	154.5 ± 3.23**	↑ 16 %
VW / tibia	2.45 ± 0.05	2.43 ± 0.07	↔	2.57 ± 0.12	3.25 ± 0.1**	↑ 26 %
lung weight / tibia	2.77 ± 0.04	2.79 ± 0.03	↔	2.79 ± 0.03	3.27 ± 0.07*	↑ 17 %
CM length (μm)	125.1 ± 0.78	137.4 ± 0.93 <sup>††</sup>	↑ 9.9 %	131.8 ± 0.71 <sup>††</sup>	152.5 ± 0.68**	↑ 15.7 %
CM surface (μm <sup>2</sup> )	2916 ± 32	3381 ± 33 <sup>††</sup>	↑ 15.9 %	3128 ± 18.8 <sup>††</sup>	4097 ± 34**	↑ 31 %

All values are means ± SEM (n = 5-8). LV: left ventricular; VW: biventricular weight; CM: cardiomyocyte; ACF: aorto-caval fistula; <sup>†</sup>*P* ≤ 0.05 vs. sham soy-based diet; <sup>††</sup>*P* ≤ 0.01 vs sham soy-based diet; \**P* ≤ 0.05 vs. sham casein--based diet; \*\**P* ≤ 0.01 vs sham casein--based diet. Significance levels were assessed by one-way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc tests.

**Table 3:** Impact of maternal diet on hemodynamic variables of the female progeny

Variable	Age	Soy-based diet	PE-free diet
Mean 24-hour BP (mmHg)	12 weeks	98.2 ± 2.9	97.4 ± 2.1
Systolic 24-hour BP (mmHg)	12 weeks	117.5 ± 2.7	118.7 ± 1.9
Diastolic 24-hour BP (mmHg)	12 weeks	80.3 ± 3.3	78.1 ± 2.3
LVEDP (mmHg)	22 weeks	1.66 ± 0.62	1.35 ± 0.36
LVESP (mmHg)	22 weeks	129.7 ± 8.03	118.5 ± 3.84
dP/dt (-) (mmHg/s)	22 weeks	7503 ± 375	6670 ± 179
dP/dt (+)(mmHg)	22 weeks	10672 ± 743	9547 ± 295
Tau (ms)	22 weeks	11.04 ± 0.50	15.64 ± 0.93*

All values are means ± SEM (n = 5-6). BP: blood pressure; LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure; LVESP: left ventricular end-systolic pressure;  $P \leq 0.05$  by t-test comparison.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1:** Length, width and L/W ratios of CMs isolated from 12 week-old female (left part) or male (right part) rats. The animals were either intact (gonads +) or have been gonadectomized at 6 weeks of age (gonads -). Their mother had received either a casein-based diet solely (no PE exposure) or a soy-based diet either during gestation (ges), lactation (lac) or the combined two periods (g+l). The dotted lines highlight the values obtained for cardiomyocytes from intact female rats fed with PE-free CBD (for visual comparison with the values from other groups). \* $P < 0.01$  vs. the group of intact rats with no PE exposure, as determined by one-way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc test.

**Fig. 2:** L/W ratios of cardiomyocytes isolated from the 12 week-old offspring of dams fed during the combined gestational-lactational periods with the following diets: only PE-free casein-based diet (CBD), CBD + gavage with vehicle (veh), soy-based diet (SBD), and CBD + gavage with either daidzein (dad) or genistein (gen).

**Fig. 3:** Representative images of sagittal sections of hearts arrested in diastole and fixed under pressurized conditions. All rats have been operated at 10 weeks of age either for sham-surgery or for induction of an aortocaval fistula (ACF). The mothers of the rats have been fed with either a soy-based or a casein-based diet.

Fig. 1

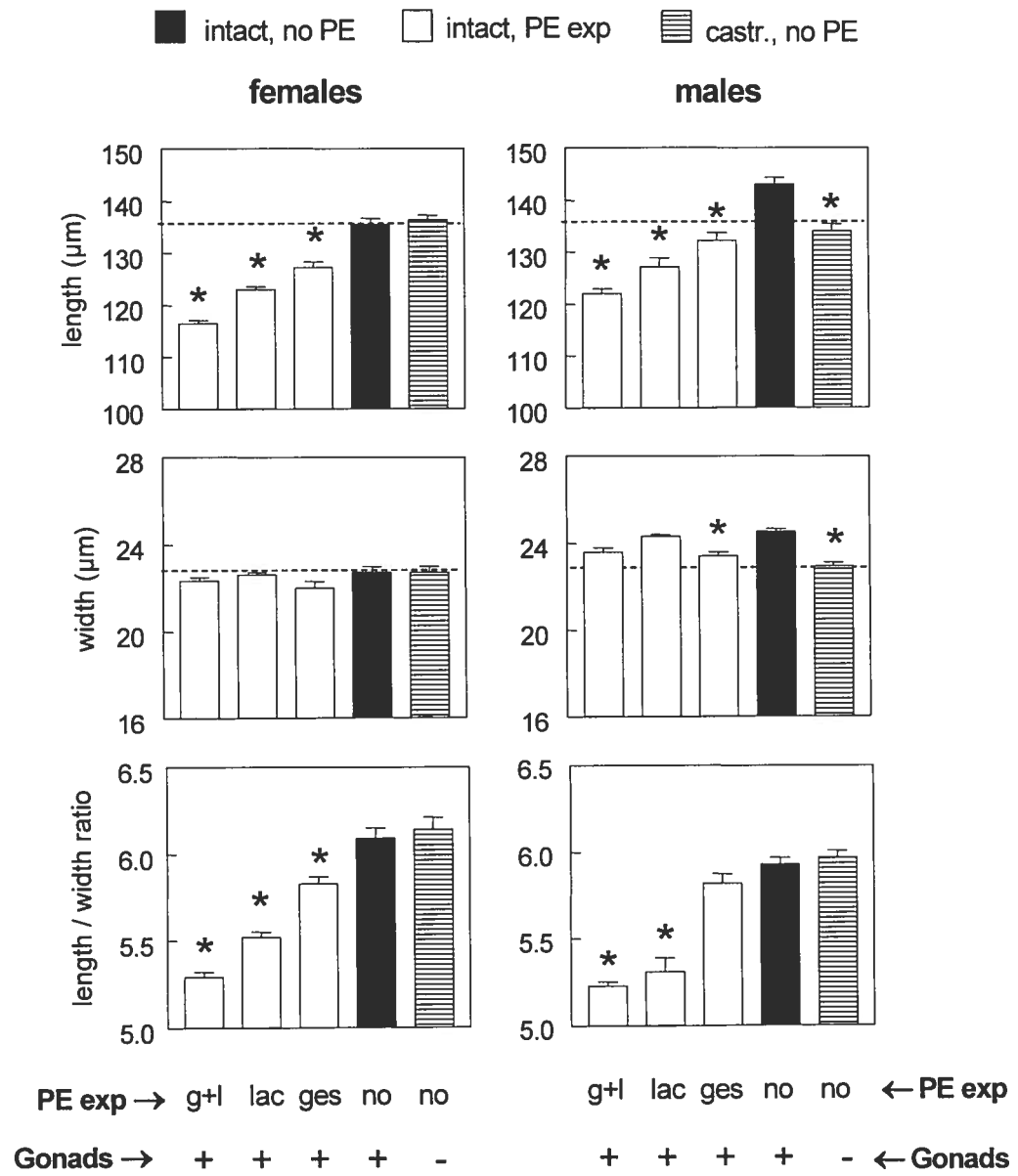




Fig. 2

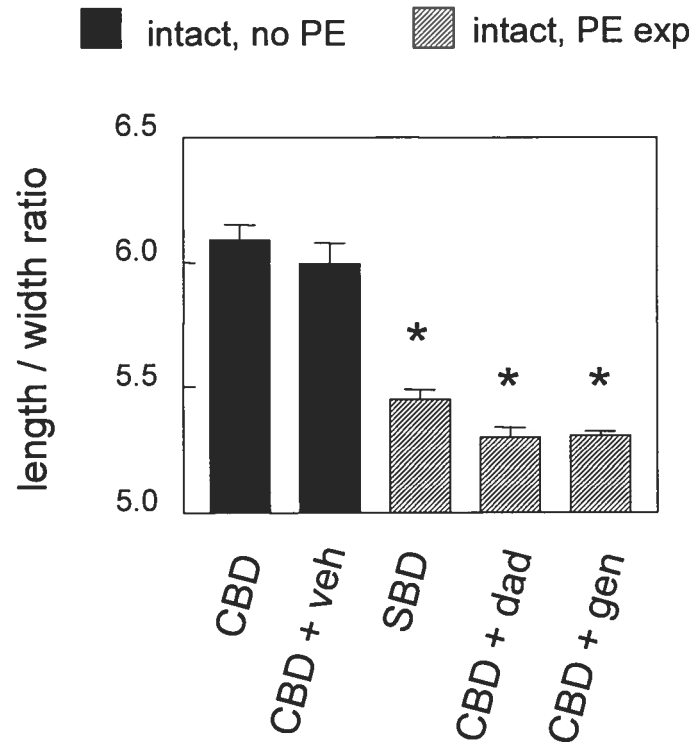


Fig. 3

