

Université de Montréal

**Récepteurs aux estrogènes et remodelage
cardiaque chez l'animal adulte ayant subi un
environnement foetal défavorable**

Par

Lynda Abdelguerfi

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

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

Octobre 2006

©, Lynda Abdelguerfi, 2006



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:

**Récepteurs aux estrogènes et remodelage
cardiaque chez l'animal adulte ayant subi un
environnement foetal défavorable**

Présenté par :

Lynda Abdelguerfi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau
Président rapporteur

Dre Michèle Brochu
Directrice de recherche

Dr André Tremblay
Membre du jury

Résumé

Des études épidémiologiques ont rapporté une relation solide entre la restriction de croissance intra utérine (RCIU) et l'augmentation de l'incidence de l'hypertension et des maladies cardiaques. Notre modèle animal où une RCIU est induite par une diète faible en sodium donnée à la rate pour la dernière semaine de gestation supporte cette observation. En effet, les rats issus de cet environnement foetal défavorable (EFD) ont une pression artérielle élevée. Dans ce modèle, les femelles à l'âge adulte démontrent un remodelage cardiaque. De plus, l'expression de la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+/K^+ ATPase est diminuée au niveau de leur ventricule gauche. Par ailleurs, l'activité de cette pompe est régulée par les oestrogènes. Ces hormones inhibent l'hypertrophie des cardiomyocytes et leur suppression augmente le remodelage cardiaque. Nous croyons donc qu'une altération des récepteurs aux estrogènes (ERs) au niveau du cœur des rates EFD induit une altération du transport ionique, en particulier celui du sodium, ce qui contribue à l'apparition d'un remodelage cardiaque. Nos objectifs sont de mesurer l'expression des ERs et l'activité de la Na^+/K^+ ATPase dans le cœur des EFD et des témoins. Pour ce faire, des rates ont été sacrifiées à 5 et 12 semaines et des foetus ont été prélevés à 22 jours de gestation. Les mesures ont été effectuées sur les ventricules gauches. Lorsque comparés aux témoins, les EFD de 5 semaines démontrent une plus faible expression (ARNm) des $\text{ER}\alpha$. Par contre, l'expression des $\text{ER}\beta$ et l'activité de la Na^+/K^+ ATPase sont similaires entre les deux groupes à différents âges. Ces résultats suggèrent que la diminution des $\text{ER}\alpha$ peut prédisposer les rates aux effets hypertrophiques attribués à l'augmentation de la pression artérielle. Des modifications épigénétiques ou une baisse des oestrogènes peuvent être à l'origine de la réduction des $\text{ER}\alpha$.

Mots clés : programmation foetale, restriction de croissance intra utérine, Na^+/K^+ ATPase,

Abstract

Epidemiological studies have indicated strong associations between intrauterine growth restriction (IUGR) and increased incidence of hypertension and cardiac disease. Our animal model where an IUGR is induced by a low sodium diet given to female rats for the last week of gestation supports this contention. Indeed, the rats born from this unfavorable fetal environment (UFE) have a raised blood pressure. In this model, the females at the adulthood show a cardiac remodeling. In addition, the expression of the sub-unit $\beta 1$ of the Na^+/K^+ ATPase is decreased in their left ventricle. The activity of this pump is regulated by estrogens. These hormones inhibit cardiomyocytes hypertrophy and their removal increased cardiac remodeling. We thus believe that an alteration of estrogen receptors (ERs) in female's rat heart induces a deterioration of ionic transports, particularly the sodium one, which contributes to the appearance of cardiac remodeling. The aim of this study is to measure ERs expression and Na^+/K^+ ATPase activity in the heart of UFE and controls. Female rats were sacrificed at 5 and 12 weeks and fetuses were taken at 22 days of gestation. Measurements have been done on the left ventricle. When compared to controls, the 5 week UFE exhibit lower expression (mRNA) of $\text{ER}\alpha$. The expression of $\text{ER}\beta$ and the activity of Na^+/K^+ ATPase are similar between the two groups at different ages. These results suggest that the reduction in $\text{ER}\alpha$ can predispose female rats to hypertrophic effect attributed to the increase of the blood pressure but this is not related to Na^+/K^+ ATPase activity. Epigenetic modifications or diminution of estrogens could be at the origin of the reduction of $\text{ER}\alpha$.

Key words: Fetal programming, intrauterine growth restriction, Na^+/K^+ ATPase

Table des matières

Page de titre	I
Page d'identification du jury	II
Résumé en français	III
Résumé en anglais	IV
Table des matières	V
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des sigles et abréviations	IX
Dédicace	XI
Remerciements	XII

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
A. LA RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTERINE ET SES CONSEQUENCES.....	1
1. <i>La programmation fœtale</i>	3
2. <i>Les conséquences sur le cœur</i>	4
B. LE CŒUR	6
1. <i>Le développement embryologique du cœur</i>	6
2. <i>Anatomie du cœur</i>	7
3. <i>L'Hypertrophie cardiaque</i>	9
3.1 L'hypertrophie cellulaire du cardiomyocyte	13
3.2 Voies d'activation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque	14
3.3 Altération génique et protéique au cours de l'hypertrophie cardiaque.....	16
3.4 Dimorphisme entre femmes et hommes	17
C. LES ŒSTROGENES	18
1. <i>Introduction</i>	18
2. <i>Les récepteurs aux œstrogènes</i>	21
2-1. Structure	21
2-2. Aspect transcriptionnel.....	23
3. <i>La signalisation des œstrogènes dans le système cardiovasculaire</i>	24
3-1. Expression des ERs dans le cœur	24
3-2. Effets génomiques des œstrogènes.....	24
3-3. Effets non-génomiques des œstrogènes	25
4. <i>Rôle des œstrogènes dans l'hypertrophie cardiaque</i>	28
5. <i>Mécanismes d'inhibition de l'hypertrophie par les œstrogènes</i>	29
D. LA POMPE SODIUM/POTASSIUM NA⁺/K⁺ ATPASE	31
1. <i>Définition</i>	31
2. <i>Rôle physiologique</i>	31
3. <i>Structure</i>	32
4. <i>Implication de la pompe dans l'hypertrophie cardiaque</i>	33
5. <i>Mécanisme d'action des œstrogènes sur la Na⁺/K⁺ ATPase dans le myocarde</i>	34
E. LE MODELE ANIMAL DE RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTERINE.....	35
F. HYPOTHESE DU PROJET DE RECHERCHE	36
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE 38	
A. ANIMAUX	38
B. WESTERN BLOT DE ERα ET β	39
C. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL	40
D. TRANSCRIPTION INVERSE-PCR DE ERα ET β.....	42
E. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA NA⁺/K⁺ ATPASE	44
F. ANALYSE STATISTIQUE	45
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS 47	
A. EXPRESSION PROTEIQUE DES RECEPTEURS AUX ESTROGENES.	47
B. EXPRESSION GENIQUE DES RECEPTEURS AUX ESTROGENES.....	47
C. L'ACTIVITE DE LA NA⁺/K⁺ ATPASE	50
CHAPITRE 4 : DISCUSSION 52	
LISTE DE REFERENCE 60	

Liste des tableaux

Tableau I : Les causes de l'hypertrophie cardiaque.....	11
Tableau II : Condition du PCR des différents gènes.....	43
Tableau III : Séquence des différentes amorces.....	43

Liste des figures

- Figure 1 : Vue droite et gauche du cœur humain** (Anatomie du cœur humain - C. Cabrol, R. Vialle, H. Guérin-Surville)..... 8
- Figure 2: Structure des ventricules dans des conditions normales (A), lors de l'hypertrophie concentrique (B) et lors de l'hypertrophie excentrique (B)** (Frohlich *et al.*, 1992)..... 13
- Figure 3 : Les différentes voies impliquées dans la synthèse du 17 β oestradiol.** ST, sulfotransferase; GT, glucuronosyltransferase; EAT, ester acyltransferase; 17-HSD, 17-hydroxysteroid dehydrogenase (Dubey *et al.*, 2004).
..... 20
- Figure 4 : Structure des domaines de ER alpha (A) et ER bêta (B) humain** (Koehler *et al.*, 2005) 23
- Figure 5: *Modèle suggéré des mécanismes d'interaction entre le récepteur aux œstrogènes α et la signalisation d'IGF-1R.*** ER α se lie à IGF-1R et active la cascade de signalisation de ce récepteur. (Kahlert *et al.*, 2000)..... 27
- Figure 6: Mécanisme d'inhibition de l'hypertrophie par l'E2** (Gray *et al.*, 2001). 30
- Figure 7: Structure de la sous unité α (en vert) et β (en rouge) de la Na⁺/K⁺ ATPase** (Blanco and Mercer, 1998). 33
- Figure 8 : Gel représentant la migration de l'ARN extrait de six ventricules gauches de fœtus témoins.** 41
- Figure 9: Gel représentant la migration de l'ARNm de ER α extrait du VG des femelles de 5 semaines témoins (A) et EFD (B).**..... 47
- Figure 10: Gel représentant la migration de l'ARNm du GAPDH extrait du VG des femelles de 5 semaines témoins (A) et EFD (B).**..... 48
- Figure 11: Expression génique (ARNm) des ER α dans les ventricules gauches des femelles de 5 semaines (A) et de 12 semaines (B) et des ER β dans les ventricules gauches des femelles fœtus (C) et de 5 semaines.** Chaque groupe comporte 6 animaux. Les résultats du PCR de ER ont été rapportés sur le GAPDH correspondant 50
- Figure 12: Activité de la Na⁺/K⁺ATPase dans le ventricule gauche des femelles de 5 semaines (A) et de 12 semaines (B).**.....51

Figure 12: Activité de la Na⁺/K⁺ATPase dans le ventricule gauche des femelles de 5 semaines (A) et de 12 semaines (B).....51

Liste des sigles et abréviations

- °C : Degré Celsius.
- β-MHC : *β Myosin Heavy Chain* (chaîne lourde β de la myosine).
- Aa : Acides aminés.
- AD : Auricule droite.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire.
- ADP : Adénosine di-phosphate.
- AF-1: *Activation function domain-1* (domaine de transactivation -1 du récepteur).
- AF-2 : *Activation function domain-2* (domaine de liaison au ligand).
- AG : Auricule gauche.
- aMLC-1: *Atrial Myosin Light Chain 1* (chaîne légère de la myosine atriale 1).
- ANP: *Atrial Natriuretic Peptide*. (peptide natriurétique de l'oreillette).
- Ang II: Angiotensine II..
- Ao : Aorte.
- AP : Artère pulmonaire.
- ARN: Acide Ribonucléique.
- ARNm : Acide Ribonucléique messenger.
- ATP: Adénosine Tri-Phosphate.
- BSA : *Bovine serum albumin* (albumine de sérum bovin)
- CAT : Constriction aortique transverse
- CSF-1 : *Colony-Stimulating Factor 1* (facteur de prolifération et de différenciation des précurseurs monocytaires).
- DEPC: Diéthyl Pyrocarbonate.
- DBD : *DNA Binding Domain* (domaine de liaison à l'ADN).
- E2: 17 β-oestradiol.
- ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensinogène.
- EFD: Environnement foetal défavorable.
- EGF: *Epidermal growth factor* (facteur de croissance épidermique).
- eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase* (oxyde nitrique synthase endothéliale).
- ERs: Récepteurs aux oestrogènes.
- ERα: Récepteurs aux oestrogènesα.
- ERβ: Récepteurs aux oestrogènesβ.
- ERE : *Estrogen response element* (élément de réponse aux oestrogènes).
- ERK1/2 : *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* (protéine kinase activée par des signaux extracellulaires).
- ET1 : Endothéline.
- EtBr : Bromure d'éthidium.
- HSP : Protéines de choc thermique.
- HTA : Hypertension artérielle.

- HVG : Hypertrophie du ventricule gauche.
iNOS: *Inductible nitric oxide synthase* (oxyde nitrique synthase inductible).
IGF-1: *Insulin like growth factor 1*(facteur de croissance analogue à l'insuline-1).
K+: Potassium.
kDa : Kilo dalton.
LBD: *Ligand binding domain* (domaine de liaison au ligand).
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases* (protéine-kinases activées par les mitogènes).
MCIP1: *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein* (protéine modulatrice interagissant avec la calcineurine).
NA+: Sodium.
NF-AT: *Nuclear Factor of Activated T cells* (facteurs nucléaires des cellules T activées).
NOS : *Nitric oxide synthase* (oxyde nitrique synthase).
OD : Oreillette droite.
OG : Oreillette gauche.
p38 MAPK : *p38 Mitogen-activated protein kinase* (p38 protéine-kinases activées par les mitogènes).
Pb: Paire de base.
PCR: *Polymerase chain reaction*. (amplification en Chaîne par Polymérase).
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase.
PKC : Protéine kinase C.
RCIU : Restriction de Croissance Intra Utérine.
RT-PCR: *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse).
SDS: *Sodium dodecyl sulfate, detergent* (sodium dodécylsulfate).
SRC : *steroid receptor coactivator* (co-activateur des récepteurs stéroïdiens).
S/U : Sous unité.
T3: L'hormone thyroïdienne.
TNF- α : *Tumor necrosis factor α* (facteur nécrosant des tumeurs α).
TGF- β : *Transforming growth factor β* (facteurs de croissance transformants).
VD : Ventricule droit.
VG: Ventricule gauche.
Vci : Veine cave inférieure
Vcs : Veine cave supérieure.

Dédicace

Je dédie mon ouvrage à mes deux enfants Ryan et Rania. C'est eux qui remplissent ma vie et j'espère leur servir de guide dans la leur.

Remerciements

En premier lieu, je remercie du fond du cœur mon cher mari qui m'a soutenu tout au long de mes études. C'est grâce à lui si j'ai pu mener à bout mon mémoire.

Mes remerciements les plus sincères vont aussi à mes parents qui, malgré la distance qui nous sépare, m'ont toujours encouragée à aller de l'avant.

Au laboratoire, je remercie Annie pour tout le temps et l'aide qu'elle m'a apportés.

Finalement, je remercie ma directrice de recherche Michèle Brochu. J'insiste à dire que c'est une femme modèle pour la société. Elle sait faire la part des choses et diriger aussi bien son laboratoire que sa maison.



L'étiquette

**Récepteurs aux estrogènes et remodelage
cardiaque chez l'animal adulte ayant subi un
environnement foetal défavorable**

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Lynda Abdelguerfi

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Pendant des milliers d'années, l'homme a été une espèce rare dont le nombre augmentait lentement. Les progrès de la médecine ont permis d'améliorer la croissance des populations, d'abord dans les pays riches puis dans le reste du monde. Dans notre société nord-américaine d'aujourd'hui, la structure démographique est en constante évolution. La population vieillit et vit de plus en plus longtemps. Les femmes ont moins d'enfants et retardent de plus en plus leur première grossesse. Il devient essentiel de mieux comprendre l'influence de l'environnement foetal sur le devenir de l'enfant. Tout au cours de mes études, je me suis intéressée aux effets à long terme d'un environnement foetal défavorable sur le cœur. Ainsi dans cette première partie, je ferai une revue de la littérature sur les conditions entourant le développement foetal et certains aspects reliés à l'hypertrophie cardiaque.

A. La restriction de croissance intra-utérine et ses conséquences

L'hypotrophie foetale ou la RCIU (Restriction de Croissance Intra Utérine) est la troisième cause de mortalité périnatale après la prématurité et les malformations. Elle est définie par un retard de croissance du poids ou de la taille ou du périmètre crânien ou du périmètre abdominal, dont la valeur est située en dessous du dixième percentile pour l'âge gestationnel. Cette définition implique la détermination de l'âge gestationnel par la connaissance

de la date de fécondation et la connaissance des caractéristiques biométriques d'un fœtus pour un âge donné. Lors de la RCIU, le fœtus n'atteint pas son potentiel de croissance en raison de l'influence négative exercée par un ou plusieurs facteurs.

Ainsi, plusieurs facteurs pathophysiologies sont impliqués dans le développement d'une RCIU incluant des causes d'ordre maternelle, placentaire ou fœtal. Il peut s'agir de la réduction de nourriture, de la disponibilité de l'oxygène, de l'ingestion de médicament, des malformations placentaires, de la réduction du débit placentaire et des infections ou des malformations congénitales. Des études animales récentes ont démontré que l'exposition du fœtus à l'hypoxie, aux glucocorticoïdes, au tabac, à l'alcool et à la cocaïne pouvait induire une RCIU et ainsi augmenter le risque de plusieurs maladies à l'âge adulte (Maulik, 2006). Parmi tous les stress auxquels les fœtus sont exposés, l'hypoxie est peut être le plus important. Plusieurs conditions peuvent l'induire chez le fœtus. Les femmes qui vivent en haute altitude font de l'hypoxie. De plus les fœtus des mères qui fument durant la grossesse ou de celles qui sont exposées à la pollution (monoxyde de carbone) sont exposés à l'hypoxie chronique. En outre, plusieurs conditions cliniques chez les femmes enceintes, incluant l'anémie, l'insuffisance placentaire et la pré-éclampsie peuvent induirent un stress hypoxique chez le fœtus (Zhang, 2005).

1. La programmation foetale

En 1986, l'épidémiologiste anglais David J. P. Barker avait constaté que les maladies coronariennes étaient la principale cause de décès chez certains hommes présentant peu de risques connus à cet égard. Ils étaient minces, non fumeurs et leur taux de cholestérol sanguin était bas (Barker and Osmond, 1986). Il a donc cherché à comprendre si d'autres facteurs pouvaient être impliqués. Les travaux qui ont suivi sont à la base du développement et de l'étude d'une «hypothèse Barker des origines précoces». En 1989, Barker a émis l'hypothèse qu'un environnement foetal défavorable (EFD) pouvait avoir des conséquences à l'âge adulte. Cela a été confirmé depuis par plusieurs autres études menées notamment en Europe (Jendryczko, 1996 1 /id), aux États-Unis (Adabag, 2001) et en Asie (Kim *et al.*, 2006), qui ont établi de façon convaincante le lien étroit entre la restriction de croissance intra-utérine (avec le faible poids qui en résulte à la naissance) et un risque accru de maladie chronique à un stade ultérieur de la vie. Valdez a rapporté que le risque de maladie ischémique du cœur augmente de 1.72 fois pour chaque livre en moins à la naissance. Ce constat était indépendant du sexe, de l'ethnicité, du statut socio-économique ou de l'obésité (Valdez *et al.*, 1994). Cependant, les raisons pour lesquelles un bébé né avec un faible poids pouvait être enclin à la maladie cardiaque à l'âge adulte n'étaient pas claires.

Durant la décennie passée, la "programmation foetale" a émergé comme étant la raison la plus plausible pour expliquer les résultats épidémiologiques. La programmation dépend d'une fenêtre de temps critique qui correspond à la période de développement de chaque organe. Sayer postule que le patron d'expression de certains gènes peut être modifié par des stimuli qui arrivent pendant une période critique du développement foetal ou embryonnaire (Sayer *et al.*, 1997). Selon Barker, les réponses physiologiques et métaboliques qui se produisent à l'âge adulte sont influencées par les changements structuraux et fonctionnels que subissent certains organes durant la programmation embryonnaire et foetal (Barker, 1992). L'altération de la nutrition ou du statut endocrinien de l'embryon ou du foetus durant la gestation peut induire un phénomène d'adaptation qui pourrait produire des changements permanents dans la structure des organes, la physiologie et le métabolisme. Ces changements, qui sont bénéfiques à court terme pour le foetus, prédisposeront l'individu aux maladies cardiovasculaires, métaboliques et endocriniennes lors de sa vie adulte (Barker, 1992).

2. Les conséquences sur le coeur

Les effets à court terme d'une restriction de croissance sont connus mais, durant ces dernières années, la recherche a démontré que les effets à long terme sont tout aussi importants. Les modèles expérimentaux sur les animaux ont confirmé le lien entre l'environnement foetal défavorable et

l'apparition de plusieurs maladies à l'âge adulte. Le cœur des fœtus est particulièrement sensible, c'est un des organes vitaux qui est très affecté par une RCIU.

Une hypoxie chronique durant la gestation perturbe la fonction cardiaque fœtale, altère l'expression de certains gènes cardiaques, augmente le taux d'apoptose, altère le cycle cellulaire et induit l'hypertrophie des myocytes fœtaux (Zhang, 2005). Ces altérations à court terme ne sont pas sans conséquence sur le cœur des adultes. Des études récentes ont démontré que l'exposition chronique de rates à l'hypoxie (10.5% d'oxygène) durant leur troisième semaine de gestation augmentait la susceptibilité du cœur de leur progéniture à l'âge adulte en vers l'ischémie. En effet, la taille de l'infarctus était plus importante (Li *et al.*, 2003). De même, une plus grande taille d'infarctus est observée suite à une occlusion d'une artère coronarienne chez des rats de 12 semaines nés de mères exposées à la fumée secondaire du tabac durant toute la gestation (Zhu *et al.*, 1997). L'administration intrapéritonéale de cocaïne à des rates durant la troisième semaine de gestation augmente la vulnérabilité des cœurs de leur progéniture mâles à l'ischémie. L'infarctus induit est plus grand et le taux d'apoptose est plus élevé (Bae *et al.*, 2005). L'alcool lors de la gestation donne lieu à une restriction de croissance intra-utérine. À l'âge adulte (10 à 12 semaines), des rats nés de mères ayant ingéré de l'éthanol (6 g/kg/jour) du jour 8 au jour 20 de la gestation ont une fonction contractile cardiaque réduite (Ren *et al.*, 2002).

B. Le cœur

1. Le développement embryologique du cœur

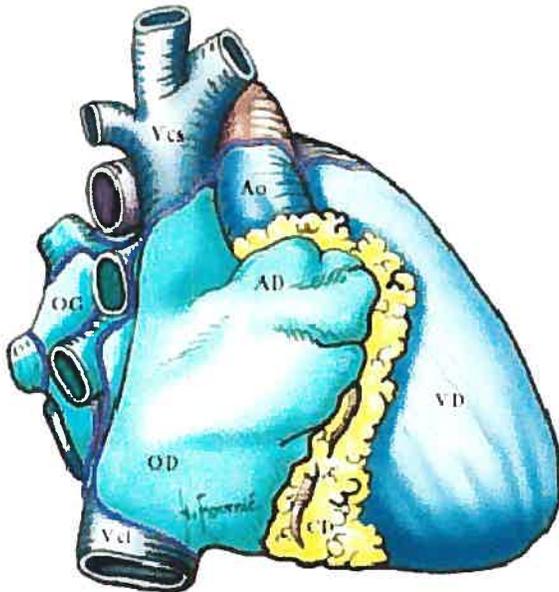
Chez l'humain, le cœur, qui est dérivé du mésoblaste, commence à se développer avant la fin de la troisième semaine de grossesse. Au cours de la vie intra-utérine, il joue un rôle indispensable dans la croissance du fœtus. La formation des tubes endothéliaux est la première étape du développement du cœur. Ces tubes s'unissent pour former le tube cardiaque primitif qui pompe le sang à partir de la quatrième semaine de gestation. Ensuite, ce tube se divise en cinq régions : le ventricule, le bulbus cordis, l'oreillette, le sinus veineux et le tronc artériel. Vers la septième semaine de grossesse, le septum interauriculaire se forme dans la région auriculaire et divise celle-ci en oreillettes droite et gauche. L'ouverture du septum est constituée par le foramen ovale, ou trou de Botal. Le sang qui entre dans le cœur droit doit contourner les poumons. Il passe par le foramen ovale pour se rendre au cœur gauche. Ce trou se referme après la naissance et forme la fosse ovale. Un septum interventriculaire se développe également et divise la région ventriculaire en ventricules droit et gauche. Le bulbus cordis et le tronc artériel se séparent en deux vaisseaux, l'aorte (qui émerge du ventricule gauche) et l'artère pulmonaire (qui émerge du ventricule droit) (Tortora and Grabowski, 2003).

2. Anatomie du cœur

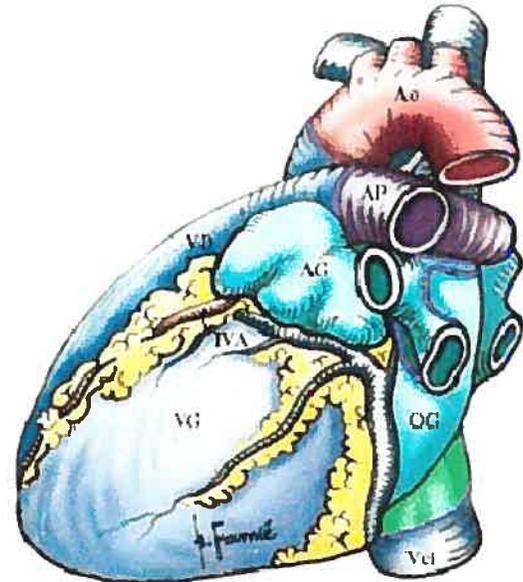
Le cœur est un organe musculaire creux. Il est formé de quatre chambres : deux oreillettes ou atriums et deux ventricules. Le ventricule gauche (VG) est séparé du ventricule droit (VD) par le septum interventriculaire. L'oreillette droite (OD) reçoit en haut la veine cave supérieure (Vcs) et en bas la veine cave inférieure (Vci) et se prolonge par l'auricule droite (AD). Le ventricule droit donne naissance à l'artère pulmonaire (AP) qui se bifurque en branches droite et gauche, au dessous de la crosse aortique à laquelle elle est reliée par le ligament artériel (Figure 1). L'oreillette gauche (OG) reçoit les deux veines pulmonaires gauches et se prolonge par l'auricule gauche (AG). Le ventricule gauche cardiaque forme l'apex du cœur. À l'instar du ventricule droit, sa paroi est beaucoup plus dense. Le sang éjecté du ventricule gauche aboutit dans l'aorte (Ao), la plus grosse artère du corps qui distribue le sang vers l'organisme (Figure 1).

Le sang circule à sens unique dans le cœur. Il passe des oreillettes aux ventricules, puis aux grosses artères. Pour empêcher le sang de refluer, le cœur est doté de structures composées de collagènes (les valvules) (Tortora and Grabowski, 2003).

Figure 1 : Vue droite et gauche du cœur humain (Anatomie du cœur humain - C. Cabrol, R. Vialle, H. Guérin-Surville)



- vue droite du cœur -
(d'après L. Delbecq)



- vue gauche du cœur -
(d'après L. Delbecq)

Les parois cardiaques sont composées de trois couches tissulaires qui sont successivement, à partir de la lumière, l'endocarde, le mur midventriculaire et l'épicarde. L'endocarde est une mince membrane qui tapisse les cavités cardiaques, les valves et les cordages. Il comporte un endothélium en continuité avec celui des gros vaisseaux caves, pulmonaires et aortique. Le mur midventriculaire est le tissu musculaire cardiaque où l'épaisseur dépend de la fonction des cavités. Il est plus épais où les pressions s'exercent le plus

(ventricules plus qu'oreillettes et ventricule gauche davantage que ventricule droit).

Le mur midventriculaire constitue le substratum fondamental de la paroi cardiaque. Il est constitué de cellules musculaires cardiaques striées que l'on nomme myocytes. Bien que ces cellules soient striées, le muscle cardiaque est involontaire tout comme les fibres musculaires lisses. L'environnement conjonctif est riche en capillaires sanguins et en fibres nerveuses. On observe 3 variétés de myocytes : les cardiomyocytes contractiles, les cellules cardionectrices et les cellules myoendocrines qui ont une fonction endocrine. L'épicarde qui tapisse l'extérieur du cœur est en fait le feuillet viscéral de la séreuse péricardique. Il se réfléchit ensuite au niveau des gros troncs artériels pour se continuer par le feuillet pariétal (médiastinal) du péricarde. L'espace péricardique, situé entre les deux feuillets, contient une faible quantité de liquide (50 à 75 ml) ce qui facilite les mouvements du cœur.

3. L'Hypertrophie cardiaque

Les conditions pathologiques cardiaques sont parmi les causes majeures de mortalité non accidentelle en occident (Lenfant, 1994). L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), en dehors de toute insuffisance cardiaque, est un facteur de risque indépendant de mortalité cardiovasculaire, en particulier du fait de troubles du rythme ventriculaire paroxystique qu'elle favorise (Foley *et al.*, 1998), (Goodwin and Oakley,

1972). Par contre, le traitement de l'HVG par un inhibiteur de l'enzyme de conversion (captopril) permet de réduire la mortalité cardiovasculaire (Rials *et al.*, 1997), (Devereux *et al.*, 1993). L'hypertrophie du ventricule gauche n'est pas toujours néfaste. En effet, chez certains sportifs, une augmentation du volume du ventricule gauche est observée (cœur d'athlète). Cette HVG se distingue des hypertrophies pathologiques par le fait qu'elle est accompagnée par une angiogénèse de sorte que le ratio perfusion sur masse musculaire est maintenu (White *et al.*, 1998).

L'hypertrophie cardiaque est souvent la conséquence d'une demande de travail accrue pour le cœur. Par exemple lors de conditions pathologiques comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle, c'est un mécanisme compensatoire. Ainsi, il s'agit d'un mécanisme d'adaptation du myocarde en réponse à des variations de la post-charge (HTA, sténose aortique), de la pré-charge (insuffisance mitrale ou aortique) ou au cours du remodelage pariétal qui survient dans l'évolution d'une cardiopathie ischémique (Katz, 1990;Cohn, 1995) (Tableau 1). La charge par cellule cardiaque individuelle peut augmenter suite à un changement de la pression systolique, au volume ventriculaire ou suite à la perte cellulaire. Cette adaptation lui permet de maintenir ou d'augmenter le débit cardiaque (compensation). Elle permet la réduction de la tension pariétale et, de ce fait, la réduction de la consommation en oxygène du myocarde. Bien que cette situation soit bénéfique pour l'organisme à court terme, une hypertrophie trop accentuée

conduira à long terme à la mort. L'hypertrophie ventriculaire gauche est associée à une augmentation des fréquences des arythmies ventriculaires en l'absence de maladie coronarienne (Ghali *et al.*, 1991). La phase terminale de l'hypertrophie est le déclenchement de la défaillance cardiaque, un désordre cardiaque commun avec des résultats fortement défavorables (Cleland *et al.*, 1998)

Tableau I : Les causes de l'hypertrophie cardiaque.

Surcharge

Pression systolique : hypertension, sténose aortique.

Volume : régurgitation aortique et mitrale, fistule artérioveineuse

Réactive (perte de cardiomyocytes)

Segmentaire : infarctus de myocarde

Diffuse : myocardite, cardiomyopathie

Myopathies

Primaire : idiopathique

Secondaire : diminution de la contractilité

Physiologique et hormonale

Croissance normale

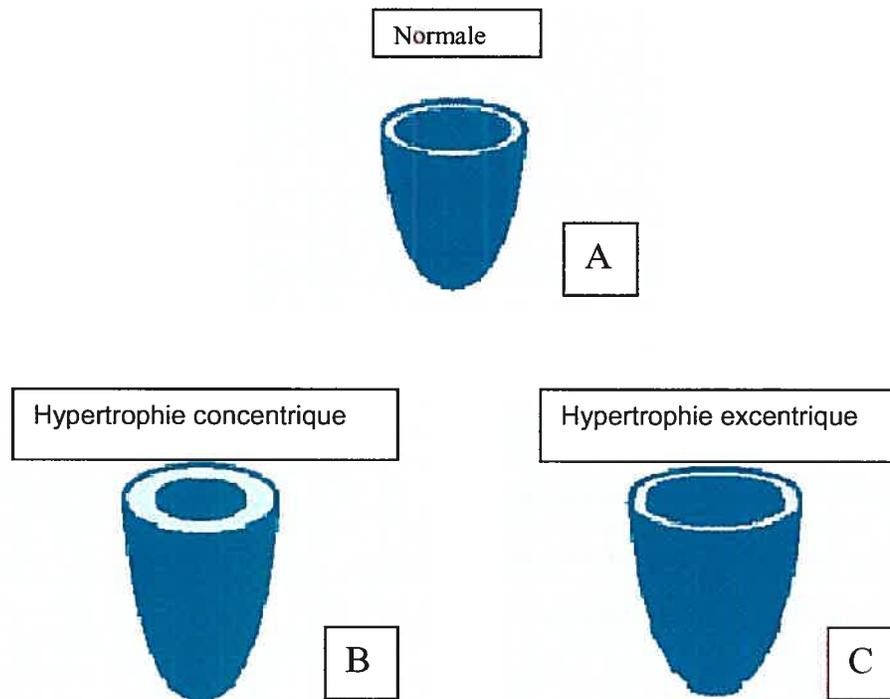
Hyperthyroïdisme

Exercice

Catécholamine

Sur le plan anatomique, l'hypertrophie cardiaque est définie par une augmentation de la masse totale du cœur, relative à la surface corporelle. Au niveau histologique, elle est caractérisée par une augmentation de la taille des myocytes, sans prolifération (sans hyperplasie). Cependant, d'autres cellules présentes dans le myocarde, en particulier les cellules endothéliales des vaisseaux coronariens et les fibroblastes des espaces interstitiels, augmentent en taille et prolifèrent, avec pour conséquence une production excessive de matrice extracellulaire et de collagène, entraînant des lésions irréversibles de fibrose myocardique (Weber *et al.*, 1989). D'un point de vue morphologique, l'HVG peut être séparée en deux catégories : l'hypertrophie concentrique qui se produit par surcharge de pression. Elle est caractérisée par un épaississement de la paroi ventriculaire due à l'addition de nouveaux sarcomères en parallèle (Lorell and Grossman, 1987) sans que la chambre ventriculaire ne varie (Figure 2 B). L'hypertrophie excentrique se produit lors d'une surcharge volumique et donne lieu à un allongement des myofibrilles grâce à l'addition de nouveaux sarcomères en série et à une dilatation de la chambre ventriculaire sans que l'épaisseur de la paroi ne soit affectée (Grossman *et al.*, 1975) (Figure 2 C).

Figure 2: Structure des ventricules dans des conditions normales (A), lors de l'hypertrophie concentrique (B) et lors de l'hypertrophie excentrique (C). (Frohlich *et al.*, 1992).



3.1 L'hypertrophie cellulaire du cardiomyocyte.

Plusieurs phénomènes sont observés lors de l'hypertrophie du cardiomyocyte. La membrane cellulaire devient irrégulière (Bugaisky *et al.*, 1983). Le noyau s'hypertrophie et on note une augmentation de la ploïdie (Hatt, 1977); la membrane produit de nombreuses accumulations conduisant à des aspects de pseudo-inclusions (Behrendt, 1977). La chromatine perd son aspect condensé, ce qui signe une activation de la transcription des gènes. Les structures cellulaires impliquées dans les phénomènes de

synthèse protéiques sont modifiées. Les mitochondries sont plus petites mais plus nombreuses. Les ribosomes libres se multiplient. Les grains de glycogène augmentent. Le réticulum endoplasmique rugueux prend une forme hélicoïdale. Les bandes Z s'épaississent (Gorza *et al.*, 1981), deviennent irrégulières; des néofilaments s'accumulent sous la membrane. Ces aspects qui se retrouvent aussi chez l'embryon humain, sont en faveur du processus de synthèse de nouveaux sarcomères.

3.2 Voies d'activation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque

La masse et la fonction cardiaque sont étroitement liées aux modifications hémodynamiques nécessaires à l'adaptation physiologique ou pathologique de l'organisme. Les mécanismes exacts du déclenchement de l'HVG sont mal connus. Cependant, certains facteurs jouent un rôle important dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. L'étirement cellulaire (Yamazaki *et al.*, 1995), certains agonistes vaso-actifs tel que l'angiotensine Ang II, l'endothéline ET1 et les catécholamines qui agissent sur des récepteurs à 7 passages transmembranaires, (Bhambi and Eghbali, 1991b), l'hormone thyroïdienne (T3) (BEZNAK, 1963), les cytokines (TNF- α (Tumor necrosis factor α), CSF-1 (Colony-Stimulating Factor 1) et certain facteurs de croissance (IGF-1 (Insulin like growth factor 1) et TGF- β (Transforming growth factor β)) qui stimulent des récepteurs tyrosines kinases (Sugden and Clerk, 1998) semblent être impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.

L'étirement cellulaire, induit par l'augmentation de la pré-charge ou de la post-charge, joue un rôle central dans l'induction de la réponse hypertrophique (Clerk and Sugden, 1997). Ce stimulus mécanique doit être transmis à l'échelon cellulaire en signal biochimique, dans le but d'induire la croissance cellulaire. L'étirement cellulaire peut induire la réponse hypertrophique en activant des canaux ioniques spécifiques couplés secondairement aux protéines kinases C par l'intermédiaire de médiateurs produits par l'activation de la phospholipase C (Crozatier, 1996). L'étirement cellulaire entraîne également la synthèse locale d'Ang II et d'ET1 (Yamazaki *et al.*, 1996; Sadoshima and Izumo, 1997).

L'angiotensine II (Ang II) induit une synthèse protéique dans des cardiomyocytes en culture (Baker *et al.*, 1992). De plus, une augmentation des niveaux d'angiotensinogène et de l'ARNm de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ECA) est rapportée lors de l'HVG chez le rat (Schunkert *et al.*, 1990). L'administration d'inhibiteur de l'ECA peut prévenir ou induire la régression de l'HVG (Linz *et al.*, 1989). Le développement de l'hypertrophie semble être due à un système rénine-angiotensine cardiaque endogène qui est indépendant du système circulant (Fareh *et al.*, 1995).

L'endothéline est un puissant peptide vasoconstricteur. Il existe trois isoformes de l'endothéline (ET1, ET2 et ET3). Ces peptides peuvent se lier à deux récepteurs différents ETA et ETB. ETA prédomine dans les

cardiomyocytes (Sugden and Clerk, 2005). L'endothéline 1 induit *in vitro* l'hypertrophie des cardiomyocytes (Suzuki *et al.*, 1991). Il a été démontré qu'une partie des effets hypertrophiques de l'angiotensine II était reliée à la stimulation de la synthèse d'endothéline 1 par les fibroblastes (Gray *et al.*, 1998).

L'importance de l'adrénaline dans le développement de l'hypertrophie a été mise en évidence par Bhambi et Eghbali (Bhambi and Eghbali, 1991a). Ils ont démontré que des injections d'adrénaline chez le rat provoquent une HVG et dès la première heure du traitement, les contenus en ARNm pour le collagène I et pour le TGF- β sont significativement augmentés. Après trois jours de traitement, le contenu en collagène du coeur est aussi augmenté.

3.3 Altération génique et protéique au cours de l'hypertrophie cardiaque

L'expression des gènes varie en fonction de l'âge. Normalement les cardiomyocytes des adultes sont différenciés et ont perdu la capacité de proliférer. Lors de l'hypertrophie, une ré-induction du programme d'expression des gènes fœtaux est généralement remarquée au niveau des cardiomyocytes. La réexpression du phénotype fœtal d'une série d'ARNm tels ceux codant pour l'actine α -squelettique et pour la chaîne lourde β de la myosine β -MHC est observée dans le myocarde lors de l'hypertrophie induite par une surcharge de pression (Izumo *et al.*, 1987) (Schwartz *et al.*, 1981) et

lors d'infusion d'AngII ou de norépinéphrine (Calderone *et al.*, 1995) , (Kim *et al.*, 1995), (Omura *et al.*, 1994). Cependant, l'expression de ces gènes ne varie pas lorsque l'hypertrophie suit une surcharge de volume (Calderone *et al.*, 1995). Une réexpression marquée du gène de l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) dans le ventricule est induite lors des surcharges hémodynamiques, qu'elles soient d'ordre volumique ou pressive (Lattion *et al.*, 1986; Mercadier *et al.*, 1989). Celle-ci est également observée dans le ventricule humain au stade de l'insuffisance cardiaque où des taux élevés d'ANP ont été retrouvés dans le sang prélevé de la veine interventriculaire antérieure, indiquant que le ventricule défaillant sécrète de l'ANP (Yasue *et al.*, 1989).

Une surcharge hémodynamique de pression entraîne chez le rat une augmentation de la densité de microtubules et une réorganisation des filaments de desmine en faisceaux longitudinaux (Samuel *et al.*, 1984). Le tissu conjonctif, ou fibrose, augmente en volume au cours de l'hypertrophie cardiaque en réponse à une surcharge de pression (Lundgren *et al.*, 1988). L'expression des gènes des collagènes de type I et III est augmentée lorsque l'hypertrophie est induite par surcharge de volume et infusion de d'Ang II ou de norépinéphrine (Michel *et al.*, 1986; Chapman *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1995).

3.4 Dimorphisme entre femmes et hommes

Il existe des disparités entre les hommes et les femmes en ce qui concerne la masse cardiaque. Le cœur des hommes est plus gros (Vriz *et al.*, 1997), le

ratio masse cardiaque sur poids corporel est plus élevé que celui des femmes (de *et al.*, 1995). De plus, la réponse des deux sexes aux stimuli hypertrophiques est différente. Par exemple, en réponse à une sténose aortique chez des patients de plus de 60 ans, les femmes présentent une hypertrophie concentrique alors que les hommes développent une hypertrophie excentrique (Aurigemma and Gaasch, 1995). Il a été démontré que, suite à l'hypertension, les femmes sont plus à risque de développer une hypertrophie du ventricule gauche que les hommes (Devereux *et al.*, 1987). De plus, les variations circadiennes de la tension artérielle des femmes seulement influencent le degré de l'HVG, ce qui indique que la structure ventriculaire peut être charge-dépendante chez les femmes plutôt que chez les hommes suite à l'hypertension (Vriz *et al.*, 1997).

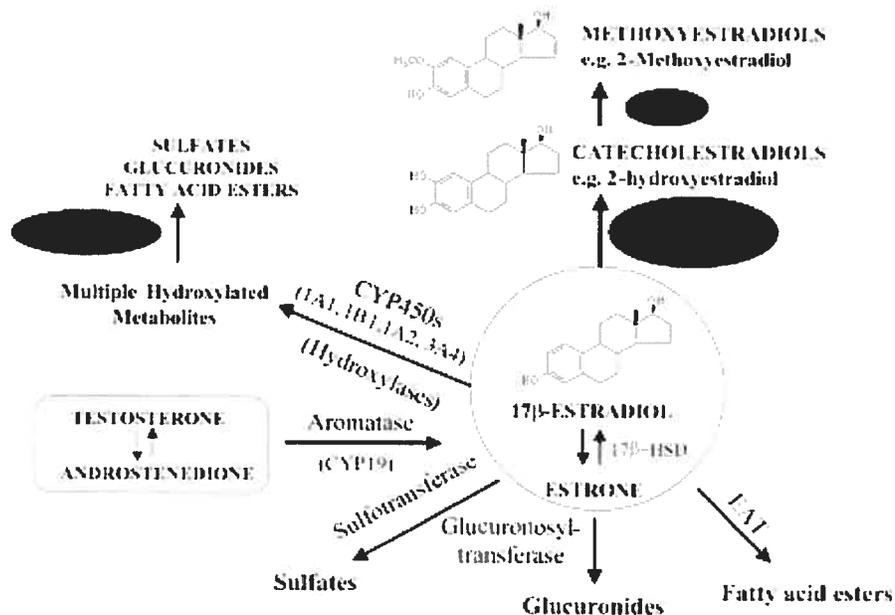
C. Les œstrogènes

1. Introduction

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol. Les œstrogènes endogènes existent sous trois formes, soit l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol. Parmi ceux-ci, l'œstradiol est le plus important. La voie de biosynthèse de l'œstradiol est très bien connue : l'aromatase convertit l'androstènedione en œstrone, et la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase convertit l'œstrone en œstradiol. De plus,

l'aromatase peut métaboliser directement la testostérone en oestradiol (Figure 3). Chez les femmes pré-ménopausées, les oestrogènes circulants sont synthétisés principalement dans les cellules de la granulosa ovarien. Par ailleurs, plusieurs autres organes et tissus produisent de l'oestradiol incluant le tissu adipeux, la peau, les glandes mammaires, le foie, les vaisseaux sanguins et le cœur (Zhu and Conney, 1998; Dubey and Jackson, 2001). L'enzyme responsable de la synthèse de l'oestradiol est retrouvée dans les cardiomyocytes et l'induction de ces derniers en culture par des précurseurs de l'oestrogène induit la production des récepteurs aux oestrogènes α et β (Grohe *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que la biosynthèse locale d'oestrogène dans le cœur est efficace pour produire les récepteurs aux oestrogènes. La présence des ERs n'établit pas sans équivoque la capacité de ces cellules à répondre directement à l'exposition aux oestrogènes. L'activité des ERs est donc démontrée par des expériences de transfection utilisant un plasmide oestrogène-sensible caractérisé par un gène rapporteur, ERE-LUC (Grohe *et al.*, 1997).

Figure 3 : Les différentes voies impliquées dans la synthèse du 17 β oestradiol. ST, sulfotransferase; GT, glucuronosyltransferase; EAT, ester acyltransferase; 17-HSD, 17-hydroxysteroid dehydrogenase (Dubey *et al.*, 2004).



Bien que les œstrogènes soient principalement associés à la reproduction chez les femelles, leur importance sur le système reproducteur mâle et certains phénomènes non liés à la reproduction a aussi été établie. Il a été démontré que les œstrogènes exercent de nombreux effets bénéfiques incluant des effets anti-apoptotiques (Kanda and Watanabe, 2003) et anti-oxydants (Sugishita *et al.*, 2003), des changements bénéfiques dans le métabolisme des lipoprotéines (Bruckert and Turpin, 1995) et de l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Moro *et al.*, 2005). Les œstrogènes augmenteraient

aussi la vasodilatation via l'activation de la eNOS (endothelial nitric oxide synthase), ce qui limite l'hypertrophie et l'ischémie cardiaque (Hatae, 2001).

2. Les récepteurs aux œstrogènes

L'action génomique des œstrogènes passe par des récepteurs. Ces derniers font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, un groupe formé de facteurs de transcription qui sont activés par leur ligand respectif (Ogawa *et al.*, 1998). Les récepteurs œstrogéniques existent sous deux formes (ER α et ER β) (Kuiper *et al.*, 1996; Brandenberger *et al.*, 1997). Ces deux récepteurs ont un haut degré de similarité dans leur structure mais ils varient toutefois quant à leurs localisations intracellulaires et à leurs concentrations dans l'organisme (Couse *et al.*, 1997).

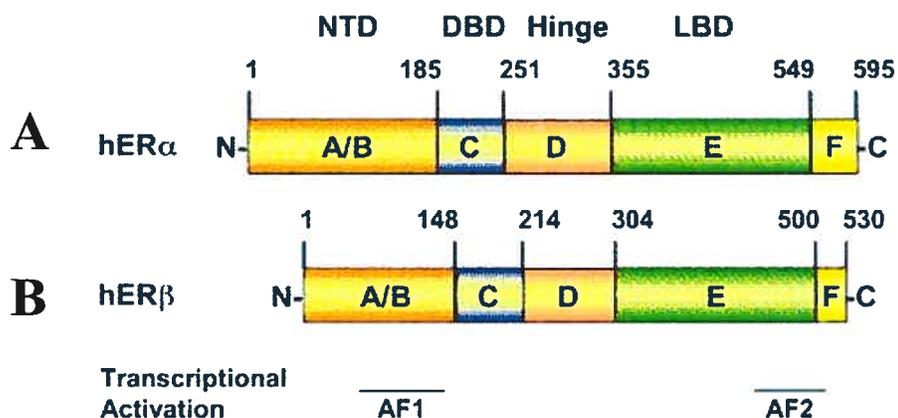
2-1. Structure

ER α contient 595 acides aminés, alors que ER β en contient 530. La structure primaire des deux récepteurs comporte plusieurs domaines, à savoir un domaine N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) central qui se fixe aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) sur le chromosome, un domaine de liaison au ligand (LBD) dans la partie C-terminale qui contient le domaine de dimérisation et deux domaines d'activation de la transcription (Figure 4).

Les deux récepteurs partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles basées sur leur structure moléculaire bien conservée. En particulier, ER α et ER β contiennent deux domaines de transactivation du récepteur (AFs) qui se retrouvent dans la partie N-terminale (AF-1) et la partie C-terminale (AF-2) respectivement (Figure 4). AF-2 est impliqué dans l'activation hormono-dépendante par le recrutement des coactivateurs de la famille des SRC (Glass *et al.*, 1997). D'autre par, l'activité de l'AF-1 est constitutive et ligand indépendante (Metzger *et al.*, 1995).

Des études récentes suggèrent que certaines réponses cellulaires des œstrogènes ne peuvent pas être attribuées ni à ER α ni à ER β . Par exemple, les œstrogènes continuent à protéger contre les blessures vasculaires chez les souris double déficientes ER α et ER β , ce qui pourrait impliquer un troisième récepteur chez ces animaux (Hawkins *et al.*, 2000).

Figure 4 : Structure des domaines de ER alpha (A) et ER bêta (B) humain (Koehler *et al.*, 2005)



2.2 Aspect transcriptionnel

En absence d'hormone, les deux récepteurs se retrouvent complexés aux protéines de choc thermique (HSP), dans un état monomérique incapable de lier l'ADN. La présence de l'hormone induit la libération des ERs des HSP et leur dimérisation, le recrutement des co-activateurs ou co-répresseurs et la régulation de gènes cibles (Sabbah *et al.*, 1989).

ER α et ER β sont capables de former des homodimères et des hétérodimères pour activer les gènes cibles. De plus, les homodimères ER α et les hétérodimères ER α /ER β sont préférentiellement formés par rapport aux homodimères ER β (Cowley *et al.*, 1997). L'existence de surface de

dimérisation fait que le dimère reconnaît un site sur l'ADN où les motifs AGGTCA sont arrangés en palindrome inverse. Le complexe œstrogène-2récepteurs active la transcription (Doevendans and van, 1996). Les ERs peuvent aussi supprimer la transcription de gènes cibles par interaction avec des co-répresseurs (Mendelsohn and Karas, 1999).

3. La signalisation des œstrogènes dans le système cardiovasculaire

3-1. Expression des ERs dans le cœur

Il a été démontré que les ERs sont exprimés dans les cardiomyocytes de rats des deux sexes (Grohe *et al.*, 1997). L'expression des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β varie au cours du développement du cœur chez le rat. En effet, ER α est faiblement exprimé dans les cardiomyocytes d'animaux nouveaux-nés, mais ses taux augmentent chez les adultes. ER β est exprimé à son maximum dans le cœur à la naissance, alors que son expression diminue dramatiquement à l'âge adulte au point qu'elle n'est plus mesurable (Jankowski *et al.*, 2001). Au niveau cellulaire,, il a été démontré que les deux récepteurs se retrouvent dans les noyaux des cellules cardiaques (Taylor and Al-Azzawi, 2000).

3-2. Effets génomiques des œstrogènes

Les effets génomiques des œstrogènes dépendent du tissu et des co-facteurs et co-répresseurs, il s'agit d'un système complexe et il reste encore plusieurs inconnues. Cependant, nous savons que les œstrogènes rentrent dans les

cellules cibles et lient les ERs, ce complexe va moduler la transcription de gènes cibles. Les effets génomiques ont un délai qui est de l'ordre de minutes à quelques heures. Il a été démontré que les œstrogènes stimulent l'expression de l'oxide nitrique synthase inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS) dans les cardiomyocytes (Nuedling *et al.*, 1999). Les œstrogènes diminuent les niveaux d'expression des canaux calcique de type-L. Chez les souris déficientes en ER (ERKO), l'ARNm et les niveaux de protéine des canaux calciques de type-L sont augmentés au niveau du cœur (Johnson *et al.*, 1997).

Les œstrogènes augmentent l'expression du peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) au niveau des cardiomyocytes. La transcription de ce peptide, qui est connu pour ses effets anti-hypertrophiques, est diminuée au niveau des cardiomyocytes suite à une ovariectomie chez la rate. Le traitement de ces dernières au 17- β oestradiol rétablit le changement (Jankowski *et al.*, 2001).

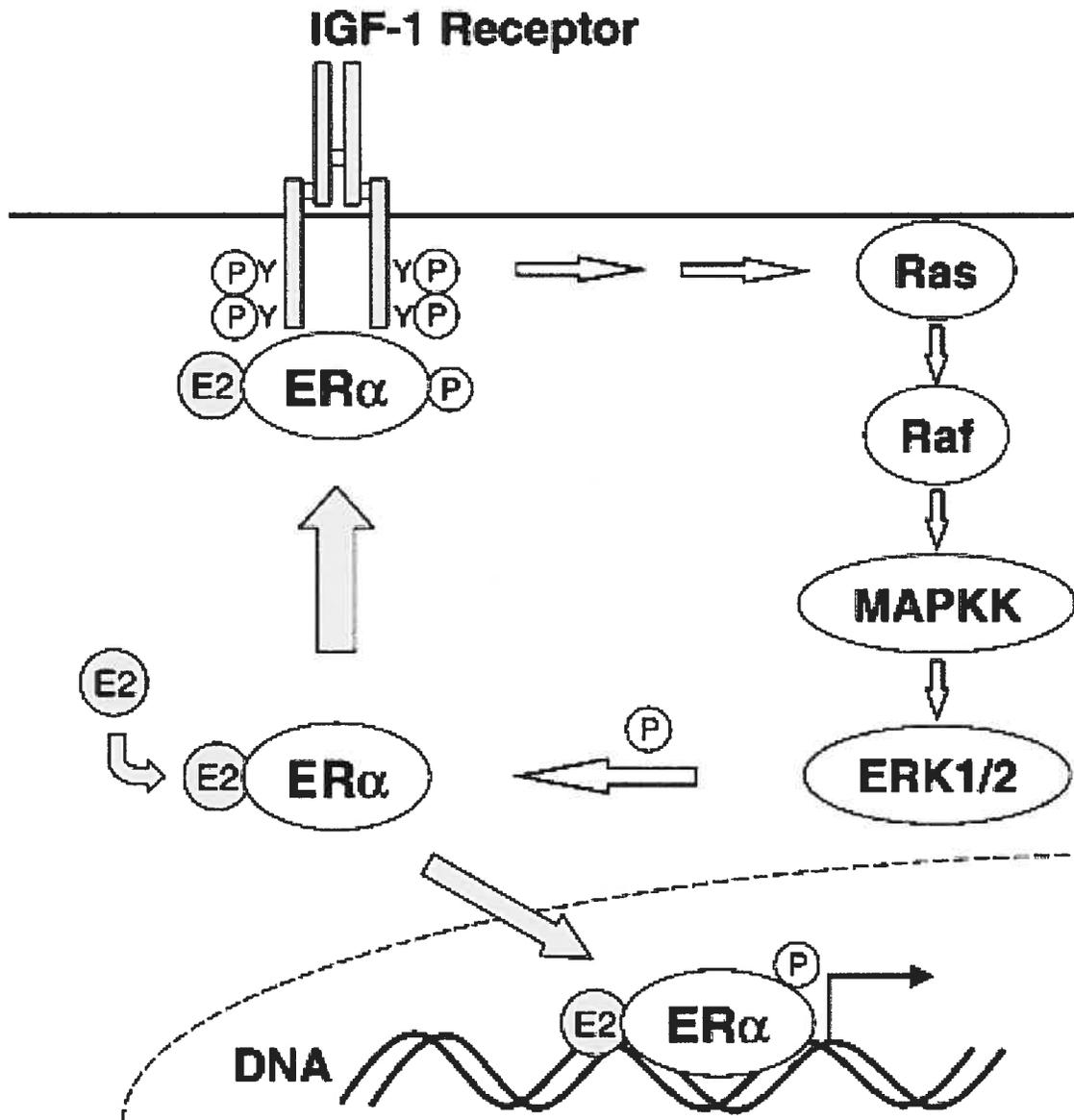
3-3. Effets non-génomiques des œstrogènes

Certains effets des œstrogènes se produisent de façon rapide, ce qui leur attribue des rôles non génomiques. Cependant le mécanisme de transduction du signal des œstrogènes dans le myocarde est mal caractérisé. Certains effets semblent dépendre des ERs, alors que d'autres sont indépendants des ERs. Il a été démontré que l'activité des canaux calciques de type-L était diminuée par les œstrogènes au niveau de neurones neostriales. L'utilisation

de 17- β oestradiol conjugué au BSA (bovine serum albumin) suggère que l'effet de l'œstrogène est membranaire (Mermelstein *et al.*, 1996).

L'IGF1 (insulin-like growth factor) partage des propriétés importantes avec les œstrogènes dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Le 17- β oestradiol, en se liant à son récepteur, active le récepteur IGF 1R en induisant sa phosphorylation. Ce dernier active MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinases Kinase) qui induit la phosphorylation de ERK1/2 (Extracellular-signal regulated kinase 1/2). L'activation de ERK1/2 peut, à son tour, induire la phosphorylation de ER α et ceci peut fournir un mécanisme plausible pour l'activation ligand indépendante de ER α (Figure 5) (Kato *et al.*, 1995).

Figure 5: Modèle suggéré des mécanismes d'interaction entre le récepteur aux œstrogènes α et la signalisation d'IGF-1R. ER α se lie à IGF-1R et active la cascade de signalisation de ce récepteur. (Kahlert et al., 2000)



4. Rôle des œstrogènes dans l'hypertrophie cardiaque

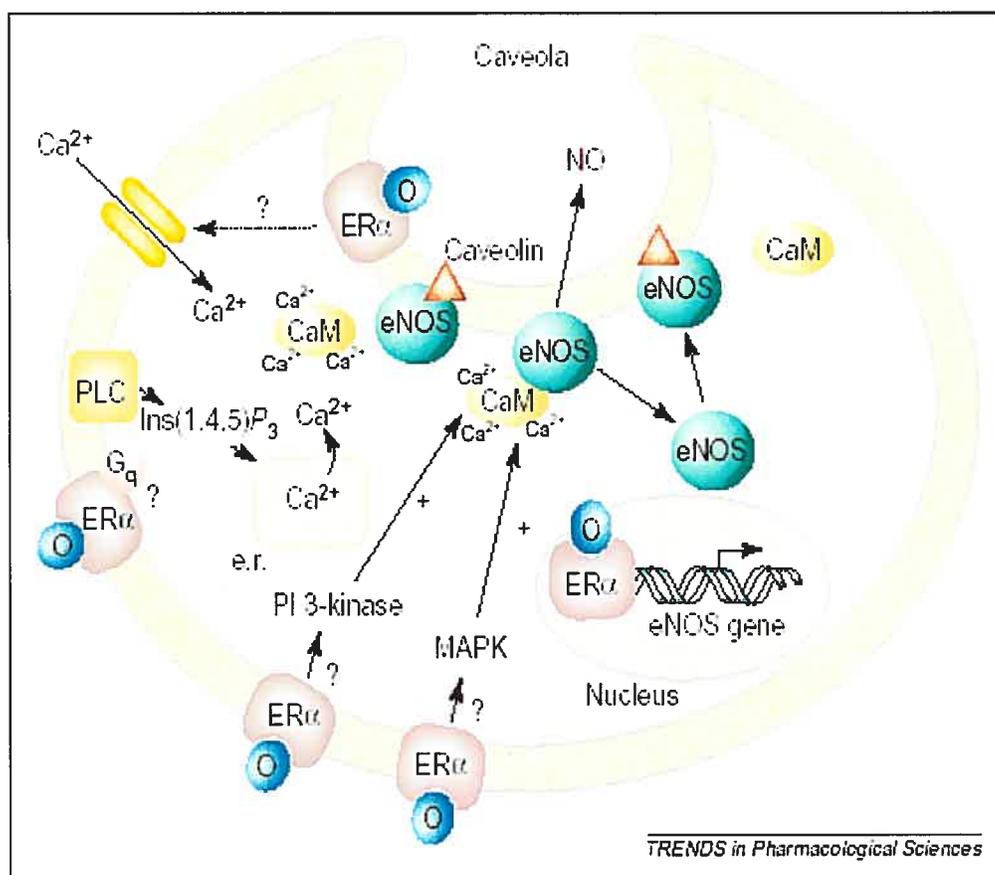
Les oestrogènes inhibent l'hypertrophie *in vitro*. L'ajout de 17- β oestradiol, à des cardiomyocytes en culture, stimulés par l'Ang II ou l'E1, prévient la synthèse protéique et les signes d'hypertrophie cellulaire (Pedram *et al.*, 2005). Les données expérimentales des études sur des modèles animaux suggèrent que l'œstrogène puisse inhiber l'hypertrophie cardiaque. L'ovariectomie chez la rate induit une augmentation du ratio du poids du ventricule gauche sur le poids total accompagné d'une diminution des ERs cardiaques (Xu *et al.*, 2003). Par contre, les auteurs ont observé qu'un supplément œstrogénique après l'ovariectomie prévient le remodelage cardiaque et augmente l'expression de ER β . Les souris déficientes en ER β sont hypertensives et leur cœur est plus gros (Forster *et al.*, 2004). Des souris ovariectomisées, qui ont subi une constriction aortique transverse (CAT), développent 31% moins d'hypertrophie cardiaque lorsqu'elles étaient traitées au 17- β oestradiol durant 4 semaines après la CAT (van *et al.*, 2001a). Dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire induite chez le rat à la monocrotaline (alcaloïde pyrolizidine), l'ajout d'estrogène diminue l'hypertrophie ventriculaire chez les rates ovariectomisées (Ahn *et al.*, 2003). D'après ces études, on peut constater que les oestrogènes ont un rôle important dans la prévention du remodelage cardiaque.

5. Mécanismes d'inhibition de l'hypertrophie par les œstrogènes

Les mécanismes par lesquels les oestrogènes inhiberaient l'hypertrophie cardiaque ne sont pas bien connus. Cependant, il a été démontré que le 17 β -oestradiol (E2) prévient les effets de l'angiotensine II (AngII) ou de l'endotheline-1 (ET-1) sur la synthèse protéique, l'expression de l'actine squelettique et l'augmentation de la taille des cardiomyocytes de rats en culture. Les auteurs ont démontré que E2 induit le gène de la MCIP1 (Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein1), un inhibiteur de l'activité de la calcineurine qui est impliqué dans la synthèse des protéines, via PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) (Figure 6) (Pedram *et al.*, 2005). Dans cette même étude, on a démontré que dans les cardiomyocytes isolés, E2 inhibe la translocation du facteur de transcription hypertrophique NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) au noyau, empêchant ainsi son activation. L'Ang II induit l'activation de ERK (Extracellular-signal regulated kinase) et PKC (Protéine kinaseC), qui contribuent à l'hypertrophie. E2 inhiberait leur activation (Pedram *et al.*, 2005). Dans une autre étude, il a été démontré que les œstrogènes atténuent la réponse hypertrophique par l'augmentation directe de l'expression de l'ANP qui va agir de façon autocrine/paracrine sur le récepteur de la guanylyl cyclase A (Babiker *et al.*, 2004). Un autre mécanisme d'inhibition de l'hypertrophie par les oestrogènes a été mis en évidence par Van (van *et al.*, 2001b) lors de l'hypertrophie induite par surcharge volumique. La phosphorylation de p38 MAPK est augmentée dans

les cardiomyocytes de souris ovariectomisées suite à l'induction de l'hypertrophie. Le p38 MAPK est important dans le maintien de cette dernière (Clerk *et al.*, 1998). L'administration de 17 β -oestradiol, à des doses physiologiques, bloque l'activation du p38 MAPK (van *et al.*, 2001a). Toutes ces données permettent de voir à quel point les mécanismes par lesquels les oestrogènes inhibent l'hypertrophie sont nombreux. Ils dépendent sûrement du mode d'induction de celle-ci.

Figure 6: Mécanisme d'inhibition de l'hypertrophie par l'E2 (Gray *et al.*, 2001).



D. La pompe sodium/potassium Na^+/K^+ ATPase

1. Définition

La pompe sodium/potassium (Na^+/K^+ ATP-ase) est une protéine transmembranaire qui stabilise et maintient une concentration intra-cellulaire de potassium élevé et de sodium basse. En utilisant l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate inorganique, elle transporte des ions potassium et sodium contre leur gradient de concentration. Pour une molécule d'ATP dégradée, la pompe transporte 3 ions sodium vers l'extérieur de la cellule et 2 ions potassium vers l'intérieur (Levitt, 1980). La ouabaine est un alcaloïde qui bloque cette pompe.

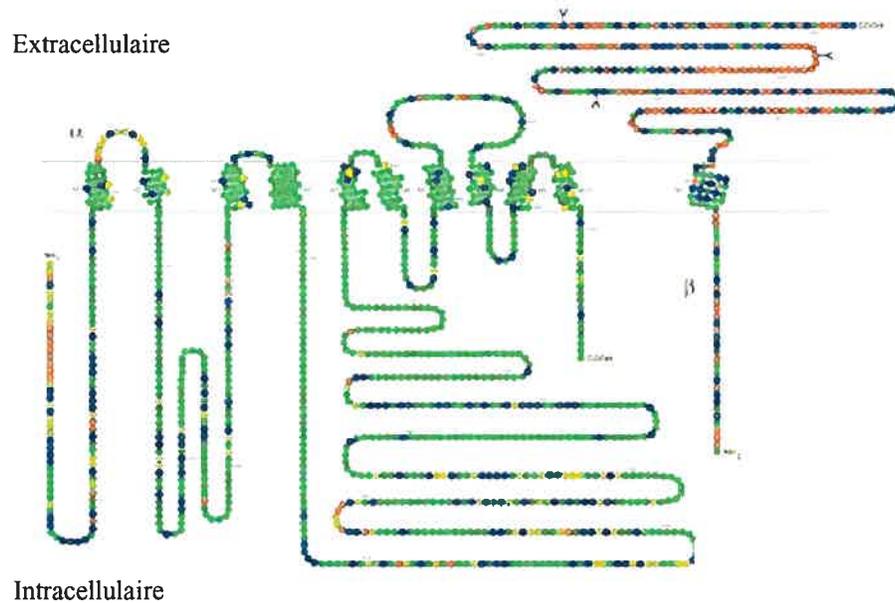
2. Rôle physiologique

Le gradient électrochimique créé par la pompe est important pour le maintien de la balance osmotique de la cellule, du potentiel de repos de la membrane et des propriétés excitables des muscles et des neurones. La différence de potentiel permet le transport secondaire de molécules à travers des transporteurs membranaires (des co-transporteurs), en utilisant le gradient du sodium vers l'intérieur de la cellule, et par les ions potassium vers l'extérieur. Dans les cellules excitables, ce potentiel électrochimique permet le déclenchement de potentiel d'action et de potentiel postsynaptique (Blanco and Mercer, 1998).

3. Structure

La Na⁺/K⁺ ATPase est un oligomère composé de trois sous-unités S/U (α , β et γ). La sous-unité α est responsable de l'action catalytique de l'enzyme. Elle a 10 segments transmembranaires. Il existe 4 isoformes de cette S/U avec un poids moléculaire réparti de 110 à 113 kDa. Le site de liaison à l'ATP et celui de la ouabaïne se retrouve sur cette sous-unité (Figure 7). La sous-unité β aurait une fonction de chaperon. Elle est impliquée dans l'assemblage de l'oligomère et la stabilisation de la structure du complexe protéique. Elle intervient dans la modulation de l'affinité de l'enzyme envers le sodium et le potassium. Elle est composée d'un seul segment transmembranaire qui contient des glycosaccharides et son poids moléculaire est d'environ 60 kDa. Trois isoformes β ont été identifiés (Figure 7). Finalement, la sous-unité γ n'est pas essentielle à l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase. Elle n'est pas exprimée dans tous les types cellulaires. Sa présence dans le néphron modifie l'affinité de l'enzyme avec les ions sodium et potassium (Blanco and Mercer, 1998).

Figure 7: Structure de la sous unité α (en vert) et β (en rouge) de la Na^+/K^+ ATPase (Blanco and Mercer, 1998).



4. Implication de la pompe dans l'hypertrophie cardiaque

Dans le cœur, la Na^+/K^+ ATPase joue un rôle très important dans la réponse inotropique aux glycosides cardiaques (Schwartz *et al.*, 1975) et dans la fonction électrique et contractile du cœur. Le fonctionnement de la pompe est affecté lors de l'hypertrophie. En effet il a été prouvé que l'activité de la Na^+/K^+ ATPase est diminuée au niveau du réticulum sarcoplasmique et au niveau du sarcomère cardiaque lors de l'hypertrophie expérimentale induite par l'isoprotérénol (Moisin *et al.*, 1998). L'isoforme α_3 de la Na^+/K^+ ATPase est normalement faiblement exprimée dans le cœur des adultes. Lors de

l'hypertrophie induite par surcharge de pression, l'expression de l'isoforme $\alpha 2$ diminue alors que celle de $\alpha 3$ augmente (Charlemagne *et al.*, 1994). Le patron d'expression de ces isoformes dans le coeur adulte hypertrophié devient similaire à celui du coeur des néonataux (Charlemagne *et al.*, 1986).

5. Mécanisme d'action des œstrogènes sur la Na⁺/K⁺ ATPase dans le myocarde.

Les œstrogènes stimulent l'activité et améliorent la cinétique de l'interaction de la Na⁺/K⁺ATPase cardiaque aussi bien avec l'adénosine triphosphate qu'avec les ions sodium et potassium (Dzurba *et al.*, 1997). Il a été démontré que l'estradiol stimule l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase dans le sarcomère d'une façon allostérique, en particulier en augmentant la coopération positive entre le K⁺ et son site de liaison sur l'enzyme. Cet effet se traduit par une augmentation dans la capacité fonctionnelle de la Na⁺/K⁺ATPase dans le sarcomère (Ziegelhoffer *et al.*, 1990). Les oestrogènes contrôlent aussi l'activité de la pompe de façon indirecte en stimulant la production d'oxyde nitrique (Weiner *et al.*, 1994). L'oxyde nitrique est impliqué dans la régulation de la fonction de la Na⁺/K⁺ATPase dans le cœur en stimulant son activation (Zhou *et al.*, 2002).

E. Le modèle animal de restriction de croissance intra-utérine

Dans le laboratoire d'accueil, un modèle animal de restriction de croissance intra utérin (RCIU) a été créé en donnant une diète faible en sodium à des rates pendant leur troisième semaine de gestation. La croissance fœtale se produit durant cette semaine chez le rat (Baker *et al.*, 1979). Les bébés nés de ce modèle sont de petits poids par rapport aux rats témoins.

À l'âge adulte (12 semaines), ces animaux développent une pression artérielle supérieure et leur fonction rénale est altérée (Battista *et al.*, 2002). De plus, les femelles, et non les mâles, ont un ratio ventricule cardiaque gauche sur poids total plus élevé, et l'expression de l'ANP est augmentée. On retrouve aussi une augmentation des gènes fœtaux tel que la chaîne légère de la myosine de l'oreillette (α MLC-1) par rapport aux témoins. L'expression de la protéine de la sous-unité β 1 de la Na^+/K^+ ATPase est diminuée. L'analyse des cardiomyocytes a démontré que ces derniers ont une augmentation du volume suite à une augmentation de l'épaisseur et que les sarcomères étaient plus longs. La contractilité des cardiomyocytes est diminuée et l'activité de l'aconitase est plus faible. Ces résultats suggèrent un remodelage du cœur des femelles adultes nées d'un environnement fœtal défavorable (Battista *et al.*, 2005).

F. Hypothèse du projet de recherche

Dans notre modèle animal où une restriction de croissance intra utérine a été induite par une diète faible en sodium donnée aux rates durant leur dernière semaine de gestation, un remodelage cardiaque a été observé, chez les femelles adultes seulement, accompagné d'une réduction de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$.

Tel que décrit dans la revue de littérature précédente, on sait que le cœur est un organe cible pour les œstrogènes (Grohe *et al.*, 1997) et que ces stéroïdes ont des effets inhibiteurs sur le développement de l'hypertrophie (Pedram *et al.*, 2005). De plus, la suppression des oestrogènes augmente le remodelage cardiaque. Il a été démontré aussi que l'activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ pouvait être diminuée lors de l'hypertrophie cardiaque (Moisin *et al.*, 1998) et que les œstrogènes avaient une action stimulatrice sur cette pompe (Ziegelhoffer *et al.*, 1990).

Tout cela nous conduit à émettre l'hypothèse qu'une altération des récepteurs aux estrogènes au niveau du cœur des femelles issus d'un environnement foetal défavorable induit une altération du transport ionique, en particulier celui du sodium, ce qui contribue à l'apparition d'un remodelage cardiaque.

Nos objectifs spécifiques sont :

- i. De quantifier les ER α et ER β dans le ventricule gauche des rats femelles et ceci à l'âge foetal et à 5 et 12 semaines de vie post-natale
- ii. De mesurer l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ATPase cardiaque chez ces animaux à 5 et 12 semaines

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. Animaux

Des rats Sprague-Dawley femelles (Charles River Canada, St Constant, Québec, Canada) pesant entre 225 et 250g ont été accouplées avec des rats mâles de la même espèce. Le premier jour de gestation a été déterminé par la présence de spermatozoïdes dans les frottis vaginaux. Tous les animaux étaient sous un cycle de lumière contrôlé (12h de lumière / 12h de noirceur) et à une température contrôlée ($21^{\circ}\text{C} \pm 3$). Le groupe expérimental (EFD) est issu de mères ayant reçu une diète faible en sodium : $< 1 \text{ mEq Na}^+/100\text{g}$ (diète 5881; PMI feed, Inc, Ren's Feed and Supplies, Oakville, On, Ca) et de l'eau déminéralisée du jour 15 à la fin de gestation. Les rats témoins sont nés de mères ayant reçu une diète normale : $19 \text{ mEq Na}^+/100\text{g}$ et $21 \text{ mEq K}^+/100\text{g}$ (diète basale 5755; PMI feed) et de l'eau du robinet. Quelques rates gestantes ont été sacrifiées au jour 22 de gestation par décapitation afin d'obtenir les fœtus. Le reste des gestantes ont accouchées normalement et ont reçu une diète normale ainsi que leur progéniture une fois sevrée à 4 semaines.

L'étude est faite sur des rats femelles : fœtus de 22 jours, ratons de 5 semaines et adultes de 12 semaines. Les rates de 5 et 12 semaines sont sacrifiées par décapitation. Les cœurs sont prélevés et les ventricules gauches (VG) isolés. Pour la mesure de l'activité de la pompe sodium, les VG sont utilisés immédiatement. Pour les autres mesures, les VG sont

immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C pour utilisation ultérieure. Cette étude est approuvée par le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine qui est accrédité par le Conseil Canadien de protection des animaux.

B. Western blot de ER α et β

Les analyses westerns sont effectuées sur les ventricules gauches des femelles de 5 et 12 semaines. Chaque groupe comportait six animaux (un animal par portée).

Les VG congelés sont mis en poudre avec un potter. Deux cents mg de poudre sont homogénéisés dans un tampon de lyse à pH 7.4 (10mM tris-HCL, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 2mM sodium vanadate, 1mM PMSF, 5 μ g / ml aprotinine et 5% NP40) et centrifugées 10 minutes à 4°C à 850g. Le surnageant est recueilli et dosé par Bio-RAD. Cent μ g de protéines sont séparés sur gel SDS-polyacrylamide de 10% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (NitroPure, Osmonics Inc., Gloucester, MA, USA) à 4°C, 75V pendant 2 heures. Par la suite, la membrane est bloquée dans une solution de TBS-lait 5% (TBS; 150mM NaCl, 50mM Tris-base et 0.1% Tween 20, pH 7.5). L'immuno-marquage est fait avec les anticorps primaires (anti-ER α et anti-ER β faits chez le lapin provenant de Santa Cruz) dilués chacun à 1/1000 dans du TBS-lait 5% et incubés avec la membrane sous agitation toute la nuit à 4°C. Après le lavage, la membrane est incubée avec un anticorps

secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase et dilué 1/4000 dans du TBS-lait 5%, pendant 30 minutes à la température de la pièce (22°C) et sous agitation. Les bandes immunoréactives sont révélées avec le kit ECL™ (Enhanced Chemiluminescence - Chimiluminescence amplifiée).

C. Extraction de l'ARN total

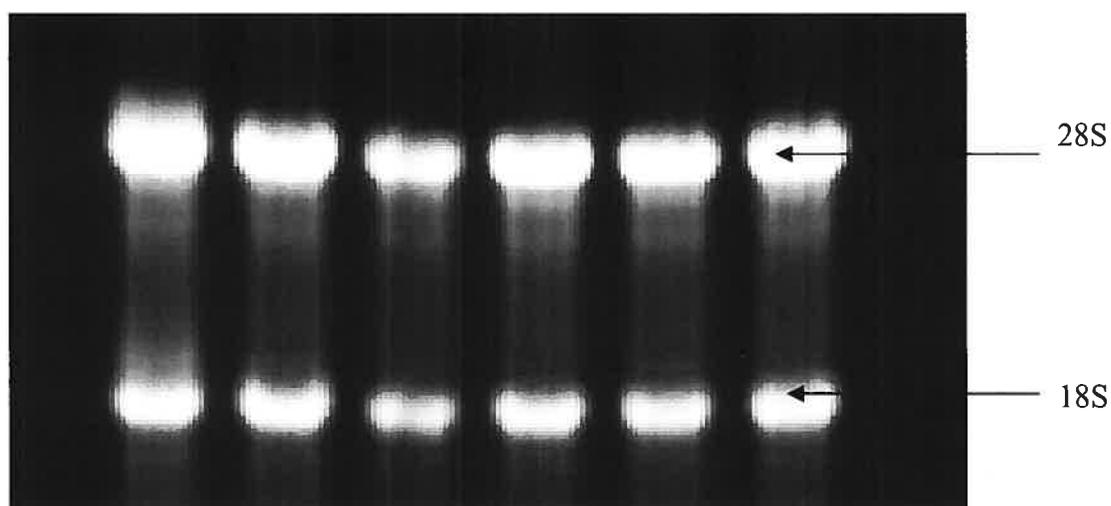
Les groupes témoin et EFD comportent 6 animaux chacun, de portées différentes. Les VG des fœtus sont groupés deux par deux. L'ovaire est utilisé comme contrôle positif.

L'extraction de l'ARN est faite avec du TRIZOL (Invitrogen Canada Inc, Burlington, Ontario, Canada). Les ventricules congelés des animaux de 5 et 12 semaines sont mis en poudre. Cent mg de poudre ou 2 VG fœtaux sont homogénéisés dans 1ml de TRIZOL. L'homogénat est centrifugé à 13600g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et incubé à la température de la pièce (21 ± 3°C) pendant 5 minutes. Par la suite 200µl de chloroforme sont ajoutés, mélangés pendant 15 secondes et incubés à la température de la pièce pour 5 minutes, puis centrifugés à 13600g pendant 15 minutes. La phase aqueuse est prélevée et mélangée à 500µl d'isopropanol. Le mélange est vortexé et incubé 5 minutes à la température de la pièce. Après 10 minutes de centrifugation à 13600g à 4 °C, le culot d'ARN est lavé avec 1ml d'éthanol 75% froid et centrifugé à 5300g à 4 °C

pendant 5 minutes. Le culot ainsi obtenu est séché 10 minutes sur glace puis re-suspendu dans 15 μ l d'eau DEPC.

L'intégrité de l'ARN est vérifiée par la migration de 0.5 μ l d'ARN sur un gel d'agarose de 1% contenant du bromure d'éthidium (EtBr). Une belle extraction est présentée comme deux bandes claires : le 28S et le 18S de l'ARN ribosomal, le 28S étant deux fois plus important (Figure 8).

Figure 8 : Gel représentant la migration de l'ARN extrait de six ventricules gauches de fœtus témoins.



La concentration de l'ARN est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm. Les lectures à 230 et 280nm ont permis d'analyser la pureté de l'échantillon. L'ARN est utilisé lorsque les ratios

260/280 et 260/230 étaient au alentour de 2. L'échantillon est dilué à une concentration de 0.5µg/µl dans de l'eau DEPC.

D. Transcription inverse-PCR de ER α et β

La transcription inverse est effectuée avec 0.5µg d'ARN total par échantillon en utilisant la Superscript TM II d'Invitrogen (1µl/réaction) et des oligot dt comme amorces. La réaction est faite dans un milieu sans RNase.

Le PCR est fait dans un volume total de 45 µl constitué de 10µl de RT (ADNc), 5µl de 10x tampon PCR, 1.5µl de MgCl₂, 1µl de 10mM dNTP, 10pmol de chaque amorce spécifique et 0.5µl de la Taq polymérase (Biometra[®], T Gradient). Le tout complété avec de l'eau DEPC.

Comme le PCR est une méthode semi-quantitative, il a été fait en triplicata pour chaque échantillon plus un contrôle positif (l'ovaire) et deux contrôles négatifs (un tube sans RT et un tube sans enzyme). La température d'hybridation et le nombre de cycles pour chaque gène utilisé avaient été préalablement déterminés (Tableau 2). Le PCR est fait pour ER α et ER β . Le GAPDH est utilisé comme contrôle interne. La séquence des amorces utilisées dans le PCR (Jankowski *et al.*, 2001) est illustrée dans le tableau 3. Les produits du PCR sont séparés sur un gel d'agarose de 1% coloré au bromure d'éthidium à la fin de la migration. L'intensité des bandes est mesurée par un logiciel « Alpha Imager » (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Ca).

Tableau II : Condition du PCR des différents gènes.

Rats	Gènes	Température	Nombre de cycle
		d'hybridation	
	ER α	Non mesurable	Non mesurable
Foetus	ER β	67	38
	ER α	65	38
5 semaines	ER β	67	42
12 semaines	ER α	65	38
	ER β	Non mesurable	Non mesurable
Tous	GAPDH	55	20

Tableau III : Séquence des différentes amorces

Gènes	Amorces	Taille (pb)
	Sens : AATTCTGACAATCGACGCCAG	
ER α	Anti sens : GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	262
	Sens : TTCCCGGCAGCACCAGTAACC	
ER β	Anti sens : TCCCTCTTTGCGTTTGGACTA	344
	Sens : GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	
GAPDH	Anti sens : GGATGCAGGGATGATGTTCT	369

E. Mesure de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase

L'activité de la pompe est mesurée dans le ventricule gauche des femelles de 5 et 12 semaines. Les groupes témoins et EFD comportaient chacun 12 animaux de portées différentes. La mesure de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase est basée sur la conversion de l'ATP en ADP et la libération d'une molécule de phosphate. La quantité de phosphate est détectée par colorimétrie et mesurée comme marqueur de l'activité de la pompe (Else *et al.*, 1996). La ouabaïne est utilisée comme inhibiteur sélectif de la Na⁺/K⁺ ATPase. Elle permet d'identifier la quantité de phosphate non spécifique à la Na⁺/K⁺ ATPase. L'activité de la pompe est calculée en soustrayant le phosphate produit en présence de ouabaïne du phosphate total produit.

Toutes les solutions sont préparées à l'avance excepté la ouabaïne, l'ATP et la solution de coloration qui sont préparés le jour de l'expérience.

Le tissu frais (150 mg) est découpé en petits morceaux et ajouté à 3.6 ml de tampon d'homogénéisation (250mM sucrose, 5mM EDTA et 20mM d'imidazole; PH7.4). Après homogénéisation de 10 secondes et incubation sur glace de 15 minutes, 200µl de l'homogénat est mélangé à 200µl de SDS (0.75mg/ml). Le tout est incubé 15 minutes à la température de la pièce et agité fréquemment. Un échantillon de 12.5µl est prélevé et ajouté (en triplicata) à 212.5µl de solution d'incubation (83.3mM Tris, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, 15mM KCl et 5mM NaN₃; PH 7.5) contenant ou non 1mM de ouabaïne. Après incubation de 10 minutes dans un bain d'eau à 37°C, 25µl

d'ATP de 30mM sont ajoutés dans chaque tube. Après incubation à 37°C pendant 5 minutes, la réaction est arrêtée par l'addition de 25µl d'acide perchlorique froid (dans le même ordre d'addition de l'ATP). Par la suite, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 4000rpm à 2°C. Deux cents µl du surnageant est mélangé à 200µl d'eau Nano et 400µl de solution de coloration. La solution de coloration est préparée en dissolvant 1g de molybdate d'ammonium et 3.3ml d'acide sulfurique dans 90ml d'eau Nano. Cette préparation est bien mélangée pendant environ 15 minutes avant d'ajouter 4g de sulfate de fer. Le tout est complété à 100ml avec de l'eau Nano et bien mélangé. La solution est utilisée dans les 2 heures suivant sa préparation. Du mélange (échantillon et solution de coloration), 250µl est transféré dans une cuvette et l'absorbance est lue à 750nm par un spectrophotomètre. Les valeurs sont rapportées sur une courbe standard (10-250nM KH_2PO_4). L'activité de la Na^+/K^+ ATPase est déterminée comme étant la différence de libération du phosphate inorganique en présence et en absence de ouabaïne. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mole PO}_4 / \text{mg protéine} / \text{heure}$.

F. Analyse statistique

Le groupe EFD est comparé au groupe témoin par le test-t de student. Les résultats sont présentés avec la moyenne \pm S.E.M. La différence est considérée significative lorsque p est inférieur ou égal à 0.05

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

A. Expression protéique des récepteurs aux estrogènes.

La bande obtenue pour ER α était très mince et non quantifiable. Il y avait aussi d'autres bandes qui ne correspondaient pas au poids moléculaire attendu. De plus, il y avait beaucoup de liaison non spécifique (bruit de fond). Pour ER β , aucune bande n'était à la même hauteur que celle du contrôle positif.

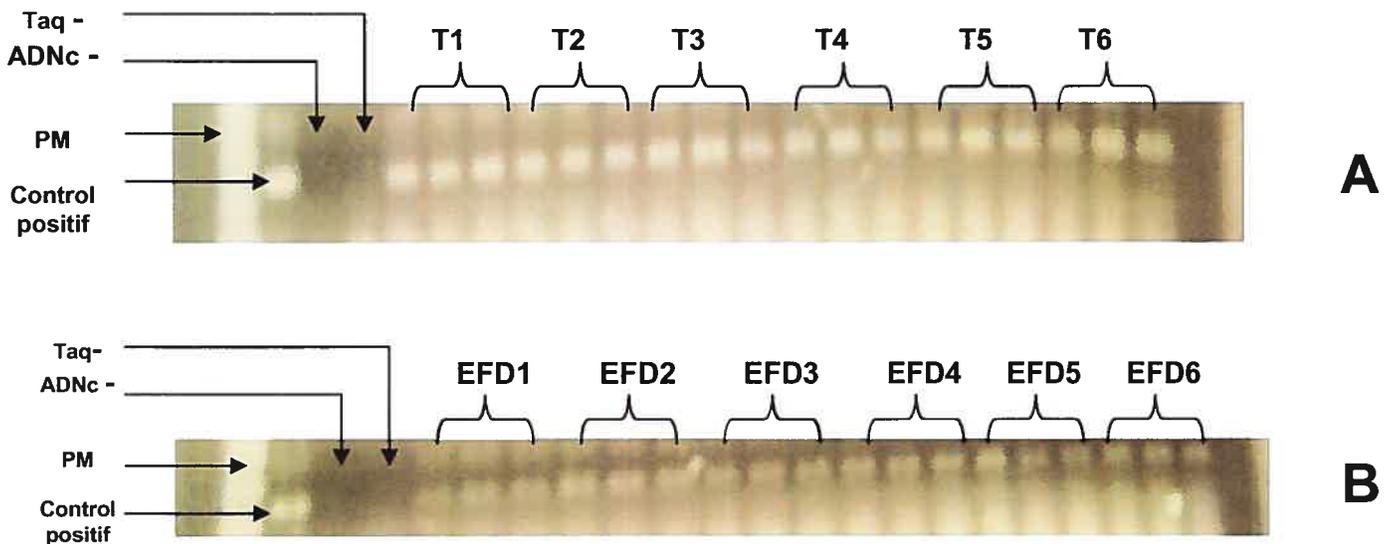
La méthode d'extraction des protéines a été changée plusieurs fois. Les protéines ont été extraites soit de la cellule entière (homogénat tissulaire) ou de noyaux seulement. Plusieurs tampons ont été utilisés. La dilution et le temps d'incubation des anticorps, le nombre de lavage et le temps d'exposition ont été changés à plusieurs reprises. Aucune amélioration n'a pu être apportée aux résultats obtenus.

B. Expression génique des récepteurs aux estrogènes

Avec l'utilisation de la RT-PCR, on a pu détecter et quantifier les ARNm des récepteurs aux oestrogènes. Les mesures ont été faites lors de différents stades vie des rates, soit à l'âge foetal, à 5 semaines de vie et à 12 semaines. Les résultats du produit de PCR, soit les 344pb et les 262pb de ER α et ER β respectivement ont été amplifiées à partir du ADNc du ventricule gauche. La possibilité que des produits artificiels ont été amplifiés était contrôlée par des

RT-PCR incomplètes qui ne contenaient pas la Taq polymérase ou le produit de la transcription inverse; ADNc (Figure 9).

Figure 9: Gel représentant la migration de l'ARNm de ER α extrait du VG des femelles de 5 semaines témoins (A) et EFD (B).



L'ARNm de chaque gène est migré en triplicata.

T : témoin

EFD : environnement foetal défavorable.

Taq - : PCR sans Taq polymérase

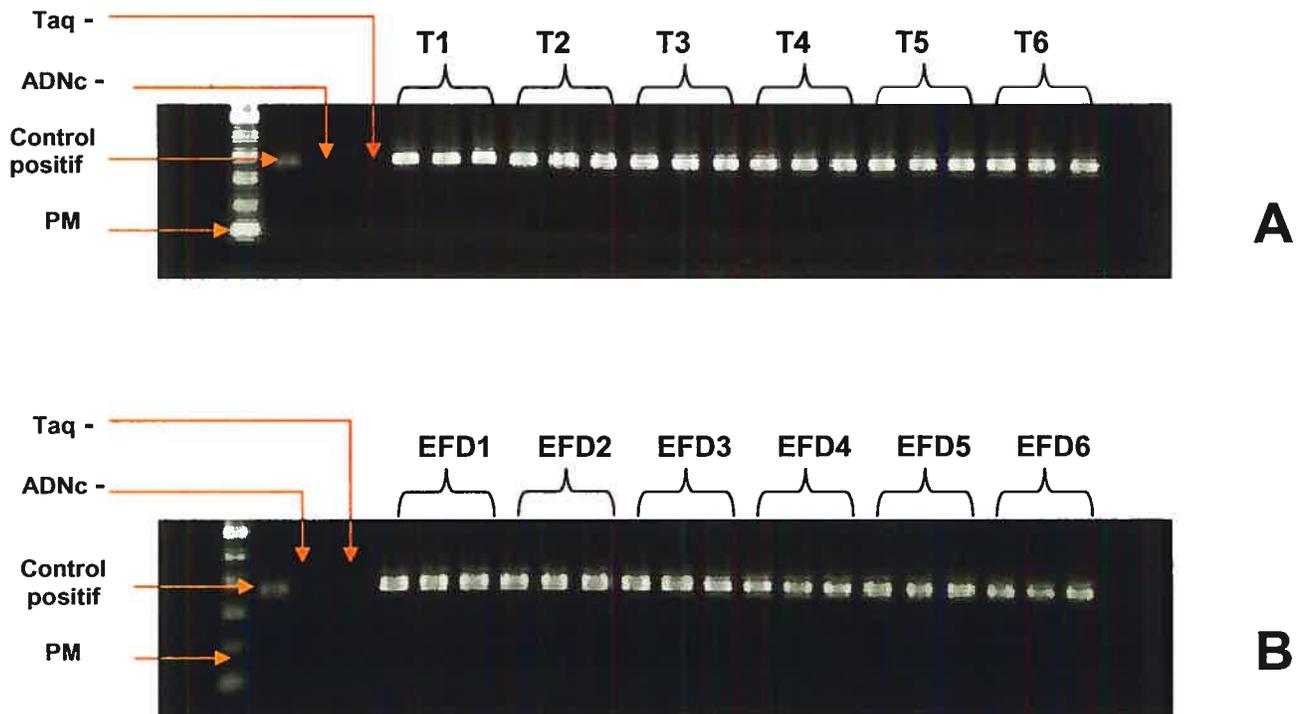
ADNc - : PCR sans ADNc

PM : poids moléculaire

L'ovaire est utilisé comme control positif

Pour chaque groupe d'âge et chaque gène, les produits du PCR des témoins et des EFD ont été migrés sur un même gel. Les résultats du PCR de ER ont été rapportés sur le GAPDH correspondant (Figure 10)

Figure 10: Gel représentant la migration de l'ARNm du GAPDH extrait du VG des femelles de 5 semaines témoins (A) et EFD (B).



L'ARNm de chaque gène est migré en triplicata.
 T : témoin
 EFD : environnement foetal défavorable.
 Taq - : PCR sans Taq polymérase
 ADNc - : PCR sans ADNc
 PM : poids moléculaire
 L'ovaire est utilisé comme control positif

L'expression de l'ARNm des ER α est différente selon l'âge. En effet on a mesuré une diminution de l'expression des ER α dans les VG des EFD de 5 semaines comparativement à ceux des témoins ($p = 0.0017$) (Figure 11A). Chez les femelles de 12 semaines, aucune différence n'est observée dans

l'expression de l'ARNm des ER α entre VG provenant des témoins et celui des EFD ($p = 0.2025$) (Figure 11B). Pour les fœtus, les ER α n'ont pas pu être quantifiés en raison de leur faible taux d'expression dans le cœur des fœtus.

L'expression de l'ARNm des ER β chez les fœtus est similaire dans les deux groupes ($p = 0.4258$) (Figure 11C). Aucune différence dans l'expression des ER β n'est rapportée chez les 5 semaines ($p = 0.9179$) (Figure 11D). à 12 semaines, les ER β n'ont pas pu être quantifiés à cet âge en raison de leur faible taux d'expression dans le cœur des adultes.

C. L'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase

L'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase est similaire dans les deux groupes et ceci à 5 semaines ($p = 0.1279$) (Figure 12A) et à 12 semaines ($p = 0.2215$) (Figure 12B).

Figure 11: Expression génique (ARNm) des ER α dans les ventricules gauches des femelles de 5 semaines (A) et de 12 semaines (B) et des ER β dans les ventricules gauches des femelles fœtus (C) et de 5 semaines (D). Chaque groupe comporte 6 animaux. Les résultats du PCR de ER ont été rapportés sur le GAPDH correspondant

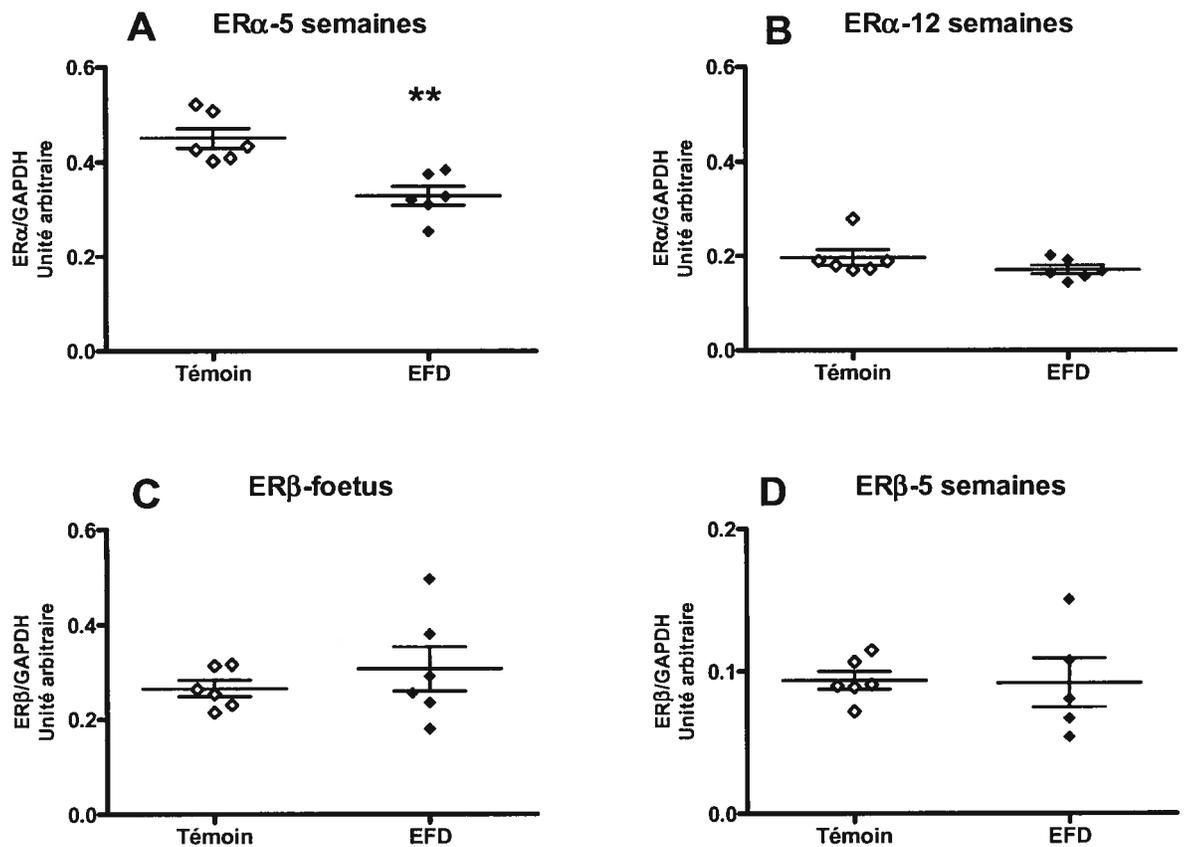
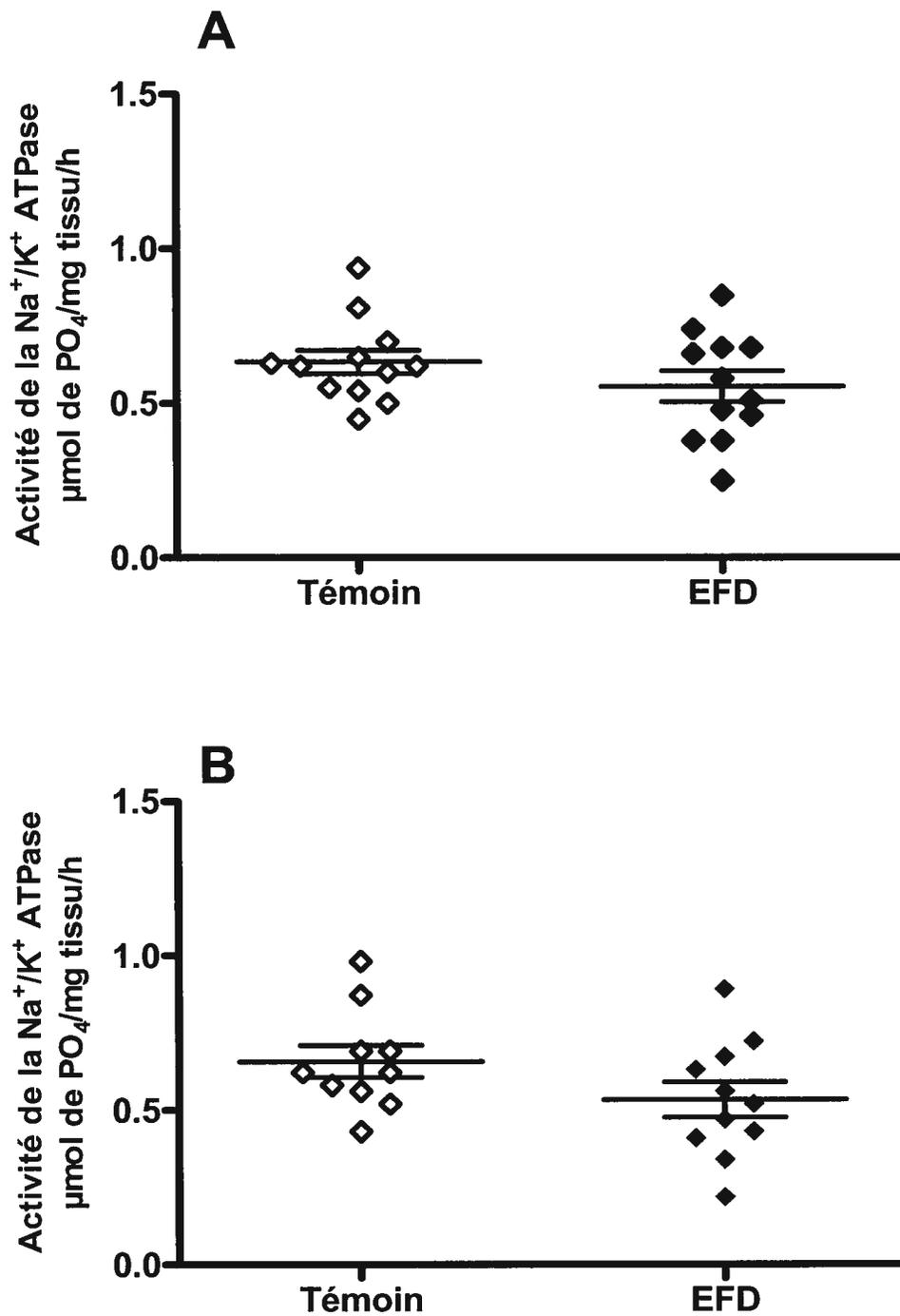


Figure 12: Activité de la Na^+/K^+ ATPase dans le ventricule gauche des femelles de 5 semaines (A) et de 12 semaines (B)



CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les récepteurs aux oestrogènes

Dans notre modèle animal de restriction de croissance intra-utérine, un remodelage cardiaque est observé chez les femelles adultes seulement. En effet, le ratio poids du ventricule gauche sur poids total ainsi que de l'ARNm de l'ANP et de la α MLC cardiaques sont augmentés chez les rates de 12 semaines nées d'un environnement fœtal défavorable (Battista *et al.*, 2005). Aucun de ces changements n'a été observé chez les femelles EFD pré-pubères de 5 semaines (résultats non publiés). Cela suggère sans doute que le remodelage cardiaque apparaît après la puberté et que peut-être les hormones stéroïdiennes sexuelles (les oestrogènes) peuvent avoir un rôle. Par ailleurs, il a été démontré que les oestrogènes étaient capables d'inhiber l'hypertrophie *in vitro* (Pedram *et al.*, 2005) et *in vivo* (Ahn *et al.*, 2003). On a donc voulu savoir s'il y avait une altération dans l'expression des récepteurs aux oestrogènes cardiaques chez les rats femelles issus d'un environnement fœtal défavorable. Pour ce faire, l'expression protéique des récepteurs aux oestrogènes a été mesurée dans le cœur. Nous avons fait des mises au point de l'immunobuvardage de type western. Nous avons extrait les protéines d'homogénat tissulaire ou de préparation nucléaire. Nous avons aussi utilisé différentes dilutions des anticorps dirigés contre les récepteurs aux oestrogènes. Bien évidemment, le nombre de lavage et le temps d'exposition ont été évalués. Avec l'ovaire qui servait de contrôle positif, nous avons obtenu une seule bande qui correspondait à la bonne hauteur pour chaque

récepteur dans cet organe, soit 68kDa pour le ER α et 53kDa pour le ER β . Bien que des laboratoires ont obtenu des bandes claires dans le cœur pour les deux récepteurs (Grohe *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2003), nous n'y sommes pas arrivés. Malgré tous les changements apportés à notre protocole, nous avons toujours plusieurs bandes à différentes hauteurs, des bandes non spécifiques, lorsque nous utilisons des protéines extraites du ventricule gauche de rates. L'utilisation de protéines extraites à partir de préparation nucléaire donnait lieu à une bande à la bonne hauteur pour ER α , mais celle-ci était non quantifiable. Nous croyons que la faible expression des ERs dans le cœur peut expliquer ces résultats. En effet, la concentration cellulaire de ces récepteurs est de l'ordre du fmol/mg de protéines. De plus la mise en évidence des ERs par le laboratoire de Grohe a été faite dans des cardiomyocytes en culture en présence de 17 β -oestradiol (Grohe *et al.*, 1997). Les ERs n'étaient pas détectés en absence d'oestrogène. Xu avait réussi à mesurer les ERs dans le cœur de Sprague-Dawley de 12 mois ovariectomisée, mais seulement après traitement aux oestrogènes (Xu *et al.*, 2003). En utilisant des homogénats tissulaires de coeur, Jankowski avait démontré que les ER β diminuaient avec l'âge et qu'à 8 semaines, ils ne sont pas mesurables par immunobuvardage de type western dans le ventricule gauche des Sprague-Dawley. ER α avaient être quantifiés par Jankowski, mais leur expression était faible dans le ventricule gauche à 8 semaines. Ils étaient plus marqués au niveau des oreillettes (Jankowski *et al.*, 2001). Par

contre, le groupe de Forster n'a pas réussi à démontrer la présence des ERs dans le cœur de souris à partir de préparations tissulaires et en utilisant un anticorps de Santa Cruz. À la lumière de ces informations, on en conclut que la quantification des récepteurs aux estrogènes dans le cœur n'est pas une mesure facile. Il a fallu caractériser d'une autre façon. On a donc procédé à des mesures semi-quantitatives de l'ARN par RT-PCR. Les résultats obtenus démontrent qu'il y a une diminution des niveaux de l'ARNm du ER α dans le ventricule gauche des EFD de 5 semaines par rapport aux témoins. Ces données peuvent suggérer une diminution des niveaux d'oestrogènes circulants ou cardiaques chez les EFD. En effet, l'expression des ER α dans les cardiomyocytes est stimulée par l'exposition aux oestrogènes (Nuedling *et al.*, 1999). De plus, ces hormones sont synthétisées localement dans le cœur par les cardiomyocytes et les fibroblastes (Grohe *et al.*, 1998). Par ailleurs, à 5 semaines les rates sont pré-pubères et le cycle oestrale n'est pas complètement mis en place. De ce fait, la mesure des taux circulants d'oestrogène n'a pas pu être effectuée chez les témoins et les EFD. Il faudra évidemment quantifier la production d'oestradiol cardiaque pour pouvoir confirmer que les oestrogènes sont à l'origine de la diminution des ER α .

Les rats EFD de notre modèle ont une pression artérielle plus élevée que les témoins (Battista *et al.*, 2002). L'hypertension est connue pour induire l'hypertrophie cardiaque chez les femelles, en particulier après la ménopause lorsque les concentrations d'oestrogènes plasmatiques sont diminuées (Shub

et al., 1994). L'induction de ER α par l'oestradiol (Pedram *et al.*, 2005) ainsi que le 16alpha-LE2 (Pelzer *et al.*, 2005), un ligand sélectif à ER α , réduisent significativement l'hypertrophie cardiaque. Ces données nous laissent suggérer que la réduction des ER α dans le ventricule gauche des rates de 5 semaines peut prédisposer les femelles aux stimuli hypertrophiques. Probablement qu'à 5 semaines, le processus hypertrophique est déjà mis en place, mais les signes de remodelage cardiaque ne sont pas encore détectables. Les femelles adultes de 12 semaines avaient démontré un remodelage cardiaque, par contre la présente étude a révélé que les niveaux d'ARNm des ER α cardiaques chez ces rates n'étaient pas altérés. L'apparition du cycle oestrale augmente les niveaux circulants des oestrogènes ce qui pourrait influencer le taux d'expression des ER α . Chez les foetus de 22 jours, ER α n'est pas mesurable dans le cœur à cause de son très faible niveau d'expression à ce stade du développement (Jankowski *et al.*, 2001).

Les récepteurs aux oestrogènes β ont été découverts il y a une dizaine d'années (Kuiper *et al.*, 1996). Aucune fonction spécifique ne leur a été attribuée dans le cœur, cependant, les souris femelles déficientes en ER β ont un cœur plus large que le type sauvage (Forster *et al.*, 2004) et elles développent une hypertrophie similaire à celle des mâles suite à une surcharge de pression (Skavdahl *et al.*, 2005). La transcription du gène de ER β ne semble pas être affectée dans le cœur des femelles suite à une

restriction de croissance intra-utérine induite par une diète faible en sodium. La RT-PCR des ER β cardiaques chez les fœtus de 22 jours et les rats de 5 semaines est similaire entre les groupes témoins et EFD. Cependant, on ne peut pas confirmer que la protéine est correctement traduite car des disparités peuvent exister entre le niveau d'ARNm et la protéine, comme ce fut le cas pour la sous-unité β_1 de la Na $^+$ /K $^+$ ATPase dans notre modèle animal (Battista *et al.*, 2005). En effet, la quantité d'ARNm était similaire entre les témoins et EFD de 12 semaines alors que l'expression protéique de cette sous-unité était diminuée.

La faible expression de l'ARNm des ER β dans le cœur des adultes n'a pas permis sa mesure. Nous croyons donc que c'est plutôt les ER α et non ER β qui sont impliqués dans le remodelage cardiaque dans notre modèle animal.

La Na $^+$ /K $^+$ ATPase

À cause de son importance dans plusieurs fonctions cellulaires basales et spécialisées, la Na $^+$ /K $^+$ ATPase doit être capable de s'adapter à divers stimuli. La régulation de cette enzyme est en particulier très critique dans le myocarde. La Na $^+$ /K $^+$ ATPase est impliquée de façon indirecte dans la contraction cardiaque (Blaustein, 1977). La pompe contrôle la concentration cytoplasmique du sodium ce qui détermine la concentration du calcium via l'échangeur Na $^+$ /Ca $^+$. Dans certains modèles d'hypertrophie cardiaque chez l'animal, il a été rapporté que l'activité de la Na $^+$ /K $^+$ ATPase était diminuée. Pour la majeure partie, cette diminution est attribuée à la réduction de

l'expression de la sous-unité catalytique α et de la sous-unité régulatrice β (Muller-Ehmsen *et al.*, 2001; Paganelli *et al.*, 2001).

Dans notre modèle de restriction de croissance intra-utérine où un remodelage cardiaque est observé, il a été démontré que l'expression de l'isoforme $\beta 1$ de la Na^+/K^+ ATPase était diminuée (Battista *et al.*, 2005). Pour évaluer les propriétés fonctionnelles de la pompe, nous avons mesuré son activité. Nous n'avons démontré aucune diminution. L'activité mesurée dans le ventricule gauche des témoins et des EFD femelles est la même et ceci à 5 et 12 semaines. Ces résultats suggèrent que la baisse de l'expression de la sous unité régulatrice $\beta 1$ n'a pas affecté l'activité catalytique de la pompe qui est effectuée par la sous unité α .

La concentration extra-cellulaire de l'ion sodique ne devrait pas être changée chez les femelles EFD de 5 et de 12 semaines car des petits changements de la concentration de Na^+ cytoplasmique peuvent avoir des effets dramatiques sur l'activité de la Na^+/K^+ ATPase (Soltoff and Mandel, 1984). Cependant, pour déterminer s'il y a des changements dans le transport ionique, des études électrophysiologiques devraient être faites.

Conclusion

La restriction de croissance intra-utérine n'est pas une maladie mais une situation qui prédispose l'individu à un plus gros risque aux maladies à l'âge

adulte. La compréhension des mécanismes qui se mettent en place lors de la vie fœtale est très importante pour la prévention et l'intervention précoce.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ciblent les récepteurs aux estrogènes dans le cœur des femelles de 5 semaines de vie. En effet, la diminution de l'effet anti-hypertrophique attribué aux oestrogènes durant la croissance cardiaque peut rendre le cœur plus à risque aux stimuli hypertrophiques tel que l'hypertension observée dans notre modèle. Cependant, il faudra mesurer la production d'oestrogène dans le cœur pour pouvoir confirmer que c'est leur diminution qui est à l'origine de la diminution des ER α chez les 5 semaines. Cela pourrait se faire par la quantification du cyp450 aromatase par immunobuvardage de type western (Grohe *et al.*, 1998). Rappelons que cette enzyme catalyse la transformation des stéroïdes C19 en oestrogène. Par ailleurs, la diminution des ER α peut être attribuée à des modifications épigénétiques. Il s'agit de méthylation de l'ADN, d'acétylation des histones ou des répressions post-transcriptionnelles qui assurent la modulation de l'expression des gènes. Ces modifications sous-tendent la programmation fœtale. Les processus épigénétiques sont sensibles aux agents environnementaux et certains d'entre eux sont heureusement réversibles (Junien *et al.*, 2005). On peut donc penser que le gène de ER α pourrait avoir subi des changements épigénétiques. Comme ces modifications ne sont pas permanentes, elles se seraient rétablies à 12 semaines. Par conséquent, une étude de la méthylation de l'ADN et de

l'acétylation des histones du ER α sera à envisager à l'avenir par des études de southern blot (Post *et al.*, 1999). La question qu'on se pose aussi est par quel mécanisme la diminution des ER α cardiaque peut être impliquée dans le remodelage dans notre modèle animal? Est-ce via les MCIP1 (Pedram *et al.*, 2005) ou via la phosphorylation des p38 MAPK (van *et al.*, 2001a). Tout ceci reste à être déterminé. Cependant, la diminution des ER α ne signifie pas une diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur, même que dans plusieurs cas, elle est inverse. Ceci est associé au processus de dégradation du récepteur (Smith and O'Malley, 2004). De ce fait, il serait intéressant de vérifier l'expression de certains gènes cibles de ER α , par exemple ERK1/2. Il a été rapporté que les oestrogènes induisent l'activation de ERK1/2 de façon dépendante des ERs au niveau des cardiomyocytes (de *et al.*, 2001). La voie de signalisation de ERK est impliquée dans l'hypertrophie (Bueno *et al.*, 2000). Il faudrait donc examiner la signalisation de ERK1/2 dans notre modèle animal en mesurant la phosphorylation de ERK1 et ERK2.

Finalement, je termine mon mémoire avec la citation d'un vieux biologiste qui dit :

*Même quand on ne trouve rien,
on renifle l'odeur de la vérité qui se cache.
Jean Rostand, 1894-1977, biologiste et écrivain français.*

Liste de référence

1. Adabag,A.S. (2001). Birthweight and the future risk of cardiovascular disease: does intrauterine malnutrition have a role in fetal programming?
8. *J. Lab Clin. Med.* 138, 378-386.
2. Ahn,B.H., Park,H.K., Cho,H.G., Lee,H.A., Lee,Y.M., Yang,E.K., and Lee,W.J. (2003). Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats
2. *J. Korean Med. Sci.* 18, 641-648.
3. Aurigemma,G.P. and Gaasch,W.H. (1995). Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle
8. *Cardiology* 86, 310-317.
4. Babiker,F.A., De Windt,L.J., van,E.M., Thijssen,V., Bronsaer,R.J., Grohe,C., van,B.M., and Doevendans,P.A. (2004). 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.
5. Bae,S., Gilbert,R.D., Ducsay,C.A., and Zhang,L. (2005). Prenatal cocaine exposure increases heart susceptibility to ischaemia-reperfusion injury in adult male but not female rats
2. *J. Physiol* 565, 149-158.
6. Baker, Lindsay, and Weisbroth (1979). The laboratory rat.
7. Baker,K.M., Booz,G.W., and Dostal,D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system
10. *Annu. Rev. Physiol* 54, 227-241.
8. Barker,D.J. (1992). The fetal origins of diseases of old age
3. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46 *Suppl* 3, S3-S9.
9. Barker,D.J. and Osmond,C. (1986). Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war
6. *J. Epidemiol. Community Health* 40, 37-44.
10. Battista,M.C., Calvo,E., Chorvatova,A., Comte,B., Corbeil,J., and Brochu,M. (2005). Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats
1. *J. Physiol* 565, 197-205.
11. Battista,M.C., Oligny,L.L., St-Louis,J., and Brochu,M. (2002). Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood
1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E124-E131.
12. Behrendt,H. (1977). Effect of anabolic steroids on rat heart muscle cells. I. Intermediate filaments. *Cell Tissue Res.* 180, 303-315.

13. BEZNAK,M. (1963). Cardiovascular effects of thyroxine treatment in hypophysectomized rats
2. *Circ. Res.* 12, 333-340.
14. Bhambi,B. and Eghbali,M. (1991b). Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment.
Am. J. Pathol. 139, 1131-1142.
15. Bhambi,B. and Eghbali,M. (1991a). Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment.
Am. J. Pathol. 139, 1131-1142.
16. Blanco,G. and Mercer,R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function
1. *Am. J. Physiol* 275, F633-F650.
17. Blaustein,M.P. (1977). Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis
2. *Am. J. Physiol* 232, C165-C173.
18. Brandenberger,A.W., Tee,M.K., Lee,J.Y., Chao,V., and Jaffe,R.B. (1997). Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus
1. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82, 3509-3512.
19. Bruckert,E. and Turpin,G. (1995). Estrogens and progestins in postmenopausal women: influence on lipid parameters and cardiovascular risk
3. *Horm. Res.* 43, 100-103.
20. Bueno,O.F. *et al.* (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice
1. *EMBO J.* 19, 6341-6350.
21. Bugaisky,L.B., Siegel,E., and Whalen,R.G. (1983). Myosin isozyme changes in the heart following constriction of the ascending aorta of a 25-day old rat. *FEBS Lett.* 161, 230-234.
22. Calderone,A., Takahashi,N., Izzo,N.J., Jr., Thaik,C.M., and Colucci,W.S. (1995). Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs
1. *Circulation* 92, 2385-2390.
23. Chapman,D., Weber,K.T., and Eghbali,M. (1990). Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium
3. *Circ. Res.* 67, 787-794.
24. Charlemagne,D., Maixent,J.M., Preteseille,M., and Lelievre,L.G. (1986). Ouabain binding sites and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in rat cardiac hypertrophy. Expression of the neonatal forms
3. *J. Biol. Chem.* 261, 185-189.

25. Charlemagne,D., Orlowski,J., Oliviero,P., Rannou,F., Sainte,B.C., Swynghedauw,B., and Lane,L.K. (1994). Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart
1. *J. Biol. Chem.* 269, 1541-1547.
26. Cleland,J.G., Swedberg,K., and Poole-Wilson,P.A. (1998). Successes and failures of current treatment of heart failure. *Lancet* 352 *Suppl* 1, S119-S128.
27. Clerk,A., Michael,A., and Sugden,P.H. (1998). 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?
3. *J. Cell Biol.* 142, 523-535.
28. Clerk,A. and Sugden,P.H. (1997). Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes
19. *Biochem. J.* 325 (Pt 3), 801-810.
29. Cohn,J.N. (1995). Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation* 91, 2504-2507.
30. Couse,J.F., Lindzey,J., Grandien,K., Gustafsson,J.A., and Korach,K.S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse
1. *Endocrinology* 138, 4613-4621.
31. Cowley,S.M., Hoare,S., Mosselman,S., and Parker,M.G. (1997). Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA
1. *J. Biol. Chem.* 272, 19858-19862.
32. Crozatier,B. (1996). Stretch-induced modifications of myocardial performance: from ventricular function to cellular and molecular mechanisms
3. *Cardiovasc. Res.* 32, 25-37.
33. de,J.T., Pelzer,T., Muller-Botz,S., Imam,A., Muck,J., and Neyses,L. (2001). Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J. Biol. Chem.* 276, 27873-27880.
34. de,S.G., Devereux,R.B., Daniels,S.R., and Meyer,R.A. (1995). Gender differences in left ventricular growth
8. *Hypertension* 26, 979-983.
35. Devereux,R.B., de,S.G., Ganau,A., Koren,M.J., Mensah,G.A., and Roman,M.J. (1993). Left ventricular hypertrophy and hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 15, 1025-1032.
36. Devereux,R.B., Pickering,T.G., Alderman,M.H., Chien,S., Borer,J.S., and Laragh,J.H. (1987). Left ventricular hypertrophy in hypertension. Prevalence and relationship to pathophysiological variables. *Hypertension* 9, 1153-1160.

37. Doevendans, P.A. and van, B.M. (1996). Transcription factors and the cardiac gene programme
5. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 387-403.
38. Dubey, R.K. and Jackson, E.K. (2001). Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms
1. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 280, F365-F388.
39. Dubey, R.K., Tofovic, S.P., and Jackson, E.K. (2004). Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites
3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 403-409.
40. Dzurba, A., Ziegelhoffer, A., Vrbjar, N., Styk, J., and Slezak, J. (1997). Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma
2. *Mol. Cell Biochem.* 176, 113-118.
41. Else, P.L., Windmill, D.J., and Markus, V. (1996). Molecular activity of sodium pumps in endotherms and ectotherms
1. *Am. J. Physiol* 271, R1287-R1294.
42. Fareh, J., Touyz, R.M., Thibault, G., and Schiffrin, E.L. (1995). Basal and angiotensin II-induced cytosolic free calcium in adult rat cardiomyocytes and fibroblasts after volume overload
1. *Hypertension* 26, 1149-1153.
43. Foley, R.N., Parfrey, P.S., and Sarnak, M.J. (1998). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 32, S112-S119.
44. Forster, C., Kietz, S., Hultenby, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2004). Characterization of the ERbeta-/- mouse heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 14234-14239.
45. Frohlich, E.D. *et al.* (1992). The heart in hypertension
21. *N. Engl. J. Med.* 327, 998-1008.
46. Ghali, J.K., Kadakia, S., Cooper, R.S., and Liao, Y.L. (1991). Impact of left ventricular hypertrophy on ventricular arrhythmias in the absence of coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17, 1277-1282.
47. Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1997). Nuclear receptor coactivators
6. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 222-232.
48. Goodwin, J.F. and Oakley, C.M. (1972). The cardiomyopathies. *Br. Heart J.* 34, 545-552.
49. Gorza, L., Pauletto, P., Pessina, A.C., Sartore, S., and Schiaffino, S. (1981). Isomyosin distribution in normal and pressure-overloaded rat ventricular myocardium. An immunohistochemical study. *Circ. Res.* 49, 1003-1009.
50. Gray, G.A., Sharif, I., Webb, D.J., and Seckl, J.R. (2001). Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling
1. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 152-156.

51. Gray,M.O., Long,C.S., Kalinyak,J.E., Li,H.T., and Karliner,J.S. (1998). Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts
9. *Cardiovasc. Res.* 40, 352-363.
52. Grohe,C., Kahlert,S., Lobbert,K., Stimpel,M., Karas,R.H., Vetter,H., and Neyses,L. (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors
1. *FEBS Lett.* 416, 107-112.
53. Grohe,C., Kahlert,S., Lobbert,K., and Vetter,H. (1998). Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis
1. *J. Endocrinol.* 156, R1-R7.
54. Grossman,W., Jones,D., and McLaurin,L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest* 56, 56-64.
55. Hatt,P.Y. (1977). Cellular changes in mechanically overloaded heart. *Basic Res. Cardiol.* 72, 198-202.
56. Hawkins,M.B., Thornton,J.W., Crews,D., Skipper,J.K., Dotte,A., and Thomas,P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10751-10756.
57. Izumo,S., Lompre,A.M., Matsuoka,R., Koren,G., Schwartz,K., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1987). 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.
58. Jankowski,M., Rachelska,G., Donghao,W., McCann,S.M., and Gutkowska,J. (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 11765-11770.
59. Johnson,B.D., Zheng,W., Korach,K.S., Scheuer,T., Catterall,W.A., and Rubanyi,G.M. (1997). Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice
3. *J. Gen. Physiol* 110, 135-140.
60. Junien,C., Gallou-Kabani,C., Vige,A., and Gross,M.S. (2005). [Nutritional epigenomics: consequences of unbalanced diets on epigenetics processes of programming during lifespan and between generations]
1. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 66, 2S19-2S28.
61. Kahlert,S., Nuedling,S., van,E.M., Vetter,H., Meyer,R., and Grohe,C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway
5. *J. Biol. Chem.* 275, 18447-18453.
62. Kanda,N. and Watanabe,S. (2003). 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression
2. *J. Invest Dermatol.* 121, 1500-1509.
63. Kato,S. *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

64. Katz,A.M. (1990). The heart in congestive failure. *Cardioscience* 1, 3-6.
65. Kim,C.S. *et al.* (2006). The relation between birth weight and insulin resistance in Korean adolescents
2. *Yonsei Med. J.* 47, 85-92.
66. Kim,S., Ohta,K., Hamaguchi,A., Yukimura,T., Miura,K., and Iwao,H. (1995). Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats
3. *Hypertension* 25, 1252-1259.
67. Koehler,K.F., Helguero,L.A., Haldosen,L.A., Warner,M., and Gustafsson,J.A. (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta
1. *Endocr. Rev.* 26, 465-478.
68. Kuiper,G.G., Enmark,E., Pelto-Huikko,M., Nilsson,S., and Gustafsson,J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5925-5930.
69. Lattion,A.L., Michel,J.B., Arnaud,E., Corvol,P., and Soubrier,F. (1986). Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat
1. *Am. J. Physiol* 251, H890-H896.
70. Lenfant,C. (1994). Report of the Task Force on Research in Heart Failure. *Circulation* 90, 1118-1123.
71. Levitt,D.G. (1980). The mechanism of the sodium pump
1. *Biochim. Biophys. Acta* 604, 321-345.
72. Li,G., Xiao,Y., Estrella,J.L., Ducsay,C.A., Gilbert,R.D., and Zhang,L. (2003). Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat.
J. Soc. Gynecol. Investig. 10, 265-274.
73. Linz,W., Scholkens,B.A., and Ganten,D. (1989). Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats
10. *Clin. Exp. Hypertens. A* 11, 1325-1350.
74. Lorell,B.H. and Grossman,W. (1987). Cardiac hypertrophy: the consequences for diastole
4. *J. Am. Coll. Cardiol.* 9, 1189-1193.
75. Lundgren,E., Gullberg,D., Rubin,K., Borg,T.K., Terracio,M.J., and Terracio,L. (1988). In vitro studies on adult cardiac myocytes: attachment and biosynthesis of collagen type IV and laminin. *J. Cell Physiol* 136, 43-53.
76. Maulik,D. (2006). Fetal growth restriction: the etiology. *Clin. Obstet. Gynecol.* 49, 228-235.
77. Mendelsohn,M.E. and Karas,R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system
1. *N. Engl. J. Med.* 340, 1801-1811.

78. Mercadier, J.J., Samuel, J.L., Michel, J.B., Zongazo, M.A., de la, B.D., Lompre, A.M., Wisnewsky, C., Rappaport, L., Levy, B., and Schwartz, K. (1989). Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension
3. *Am. J. Physiol* 257, H979-H987.
79. Mermelstein, P.G., Becker, J.B., and Surmeier, D.J. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor
7. *J. Neurosci.* 16, 595-604.
80. Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1995). Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells
7. *J. Biol. Chem.* 270, 9535-9542.
81. Michel, J.B., Salzmann, J.L., Ossondo, N.M., Bruneval, P., Barres, D., and Camilleri, J.P. (1986). Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy
3. *Basic Res. Cardiol.* 81, 142-154.
82. Moisin, C., Balta, N., Filcescu, V., Dumitriu, I.F., Stoian, G., and Petec, G. (1998). Activity of Na⁺/K⁺-ATPase and of Ca⁺⁺-ATPase under the action of adenosine triphosphate in experimental myocardial hypertrophy
1. *Rom. J. Physiol* 35, 303-311.
83. Moro, L. *et al.* (2005). Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase
1. *Blood* 105, 115-121.
84. Muller-Ehmsen, J., Juvvadi, P., Thompson, C.B., Tumyan, L., Croyle, M., Lingrel, J.B., Schwinger, R.H., McDonough, A.A., and Farley, R.A. (2001). Ouabain and substrate affinities of human Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281, C1355-C1364.
85. Nuedling, S., Kahlert, S., Loebbert, K., Doevendans, P.A., Meyer, R., Vetter, H., and Grohe, C. (1999). 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo
1. *Cardiovasc. Res.* 43, 666-674.
86. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro
5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 122-126.
87. Omura, T., Kim, S., Takeuchi, K., Iwao, H., and Takeda, T. (1994). Transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix gene expression in isoprenaline induced cardiac hypertrophy: effects of inhibition of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc. Res.* 28, 1835-1842.
88. Paganelli, F., Mougnot, R., and Maixent, J.M. (2001). Defective activity and isoform of the Na,K-ATPase in the dilated cardiomyopathic hamster. *Cell Mol. Biol. (Noisy. - le-grand)* 47, 255-260.

89. Pedram,A., Razandi,M., Aitkenhead,M., and Levin,E.R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1
1. *J. Biol. Chem.* 280, 26339-26348.
90. Pelzer,T. *et al.* (2005). The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats
1. *Cardiovasc. Res.* 67, 604-612.
91. Post,W.S., Goldschmidt-Clermont,P.J., Wilhide,C.C., Heldman,A.W., Sussman,M.S., Ouyang,P., Milliken,E.E., and Issa,J.P. (1999). Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system.
Cardiovasc. Res. 43, 985-991.
92. Ren,J., Wold,L.E., Natavio,M., Ren,B.H., Hannigan,J.H., and Brown,R.A. (2002). Influence of prenatal alcohol exposure on myocardial contractile function in adult rat hearts: role of intracellular calcium and apoptosis. *Alcohol Alcohol* 37, 30-37.
93. Rials,S.J., Wu,Y., Xu,X., Filart,R.A., Marinchak,R.A., and Kowey,P.R. (1997). Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation. *Circulation* 96, 1330-1336.
94. Sabbah,M., Redeuilh,G., and Baulieu,E.E. (1989). Subunit composition of the estrogen receptor. Involvement of the hormone-binding domain in the dimeric state
1. *J. Biol. Chem.* 264, 2397-2400.
95. Sadoshima,J. and Izumo,S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress
12. *Annu. Rev. Physiol* 59, 551-571.
96. Samuel,J.L., Bertier,B., Bugaisky,L., Marotte,F., Swynghedauw,B., Schwartz,K., and Rappaport,L. (1984). Different distributions of microtubules, desmin filaments and isomyosins during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *Eur. J. Cell Biol.* 34, 300-306.
97. Sayer,A.A., Cooper,C., and Barker,D.J. (1997). Is lifespan determined in utero?
5. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed* 77, F162-F164.
98. Schunkert,H., Dzau,V.J., Tang,S.S., Hirsch,A.T., Apstein,C.S., and Lorell,B.H. (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation
4. *J. Clin. Invest* 86, 1913-1920.
99. Schwartz,A., Lindenmayer,G.E., and Allen,J.C. (1975). The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects
7. *Pharmacol. Rev.* 27, 3-134.
100. Schwartz,K., Lecarpentier,Y., Martin,J.L., Lompre,A.M., Mercadier,J.J., and Swynghedauw,B. (1981). Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 13, 1071-1075.

101. Shub,C., Klein,A.L., Zachariah,P.K., Bailey,K.R., and Tajik,A.J. (1994). Determination of left ventricular mass by echocardiography in a normal population: effect of age and sex in addition to body size
11. *Mayo Clin. Proc.* 69, 205-211.
102. Skavdahl,M., Steenbergen,C., Clark,J., Myers,P., Demianenko,T., Mao,L., Rockman,H.A., Korach,K.S., and Murphy,E. (2005). Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy
1. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288, H469-H476.
103. Smith,C.L. and O'Malley,B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* 25, 45-71.
104. Soltoff,S.P. and Mandel,L.J. (1984). Active ion transport in the renal proximal tubule. II. Ionic dependence of the Na pump
4. *J. Gen. Physiol* 84, 623-642.
105. Sugden,P.H. and Clerk,A. (1998). "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium
1. *Circ. Res.* 83, 345-352.
106. Sugden,P.H. and Clerk,A. (2005). Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance
3. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3, 343-351.
107. Sugishita,K., Li,F., Su,Z., and Barry,W.H. (2003). Anti-oxidant effects of estrogen reduce $[Ca^{2+}]_i$ during metabolic inhibition
1. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35, 331-336.
108. Suzuki,T., Hoshi,H., Sasaki,H., and Mitsui,Y. (1991). Endothelin-1 stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. II. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 *Suppl* 7, S182-S186.
109. Taylor,A.H. and Al-Azzawi,F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues
6. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 145-155.
110. Tortora and Grabowski (2003). Principles of anatomy and physiology
7. 10. *ed.*
111. Valdez,R., Athens,M.A., Thompson,G.H., Bradshaw,B.S., and Stern,M.P. (1994). Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA
7. *Diabetologia* 37, 624-631.
112. van,E.M., Grohe,C., Cleutjens,J.P., Janssen,B.J., Wellens,H.J., and Doevendans,P.A. (2001b). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy
1. *Circulation* 104, 1419-1423.
113. van,E.M., Grohe,C., Cleutjens,J.P., Janssen,B.J., Wellens,H.J., and Doevendans,P.A. (2001a). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-

overload hypertrophy

1. *Circulation* 104, 1419-1423.
114. Vriz,O., Lu,H., Visentin,P., Nicolosi,L., Mos,L., and Palatini,P. (1997). Gender differences in the relationship between left ventricular size and ambulatory blood pressure in borderline hypertension. The HARVEST Study
5. *Eur. Heart J.* 18, 664-670.
115. Weber,K.T., Jalil,J.E., Janicki,J.S., and Pick,R. (1989). Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease.
Am. J. Hypertens. 2, 931-940.
116. Weiner,C.P., Lizasoain,I., Baylis,S.A., Knowles,R.G., Charles,I.G., and Moncada,S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones
4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5212-5216.
117. White,F.C., Bloor,C.M., McKirnan,M.D., and Carroll,S.M. (1998). Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart
3. *J. Appl. Physiol* 85, 1160-1168.
118. Xu,Y., Arenas,I.A., Armstrong,S.J., and Davidge,S.T. (2003). Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart
11. *Cardiovasc. Res.* 57, 388-394.
119. Yamazaki,T., Komuro,I., Shiojima,I., and Yazaki,Y. (1996). Angiotensin II mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30 *Suppl*, 107-111.
120. Yamazaki,T., Komuro,I., and Yazaki,Y. (1995). Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress
6. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27, 133-140.
121. Yasue,H., Obata,K., Okumura,K., Kurose,M., Ogawa,H., Matsuyama,K., Jougasaki,M., Saito,Y., Nakao,K., and Imura,H. (1989). Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy
26. *J. Clin. Invest* 83, 46-51.
122. Zhang,L. (2005). Prenatal hypoxia and cardiac programming
1. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 2-13.
123. Zhou,L. *et al.* (2002). Lack of nitric oxide synthase depresses ion transporting enzyme function in cardiac muscle
1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 1030-1035.
124. Zhu,B.Q. *et al.* (1997). Effects of second-hand smoke and gender on infarct size of young rats exposed in utero and in the neonatal to adolescent period
2. *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 1878-1885.
125. Zhu,B.T. and Conney,A.H. (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19, 1-27.

126. Ziegelhoffer,A., Dzurba,A., Vrbjar,N., Styk,J., and Slezak,J. (1990). Mechanism of action of estradiol on sodium pump in sarcolemma from the myocardium
1. Bratisl. Lek. Listy 91, 902-910.

