

Université de Montréal

***Le remodelage cardiaque lors de la gestation chez la rate :
implication du récepteur aux minéralocorticoïdes et
altérations par un supplément sodique***

par

Valérie Bassien-Capsa

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor
en Physiologie

Janvier, 2010

© Valérie Bassien-Capsa, 2010

Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures et Post-doctorales

Cette thèse intitulée :

***Le remodelage cardiaque lors de la gestation chez la rate :
implication du récepteur aux minéralocorticoïdes et
altérations par un supplément sodique***

présentée par :

Valérie Bassien-Capsa

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Lucie Parent
Président-rapporteur

Dre Alzbeta Chorvatova
Directrice de recherche

Dre Michèle Brochu
Membre du jury

Dr Robert Dumaine
Examineur externe

Dr Réjean Couture
Représentant du doyen de la FESP

Résumé

La grossesse induit de profonds changements hémodynamiques et métaboliques de l'organisme maternel qui ont des conséquences sur le cœur. L'adaptation du cœur à cette condition physiologique nécessite un remodelage de sa structure et par conséquent des ajustements de sa fonction. Les mécanismes responsables de ces adaptations sont en grande partie inconnus. Cependant, ces connaissances sont essentielles pour la compréhension des complications cardiovasculaires, telle que l'hypertension gestationnelle (HG), qui constituent un risque pour la santé de la mère et du fœtus. Afin de caractériser les adaptations du cœur lors de la grossesse, l'originalité de notre approche expérimentale consistait à étudier le remodelage à l'échelle des cardiomyocytes du ventricule gauche.

Ainsi, notre premier objectif était de déterminer les modifications structurales et fonctionnelles des cardiomyocytes chez la rate en vue d'identifier les altérations lors de l'HG. Chez les rates gestantes, le remodelage structural des cardiomyocytes se caractérise par une hypertrophie cellulaire avec une augmentation proportionnelle des dimensions. L'HG a été induite par un supplément sodique (0.9% NaCl) dans la diète. L'inadaptation structurale lors de l'HG se traduit par une diminution du volume cellulaire.

L'étude des modifications fonctionnelles a révélé que lors de la gestation le fonctionnement contractile des cellules est dépendant de l'adaptation du métabolisme maternel. En effet, les substrats énergétiques, lactate et pyruvate, induisent une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes. Cet effet est plus faible dans les cellules des rates hypertendues, ce qui suggère des anomalies du couplage excitation-contraction, dans lequel les courants calciques de type L (I_{Ca-L}) jouent un rôle important. Paradoxalement, le lactate et le pyruvate ont induit une augmentation de la densité des courants I_{Ca-L} seulement chez les rates hypertendues.

Le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM) est connu pour son implication dans le remodelage structuro-fonctionnel du cœur dans les conditions pathologiques mais pas dans celui induit par la grossesse. Notre deuxième objectif était donc de déterminer le rôle du

RM dans l'adaptation de la morphologie et de la contractilité des cardiomyocytes. Des rates gestantes ont été traitées avec le canrénoate de potassium (20 mg/kg/jr), un antagoniste des RM. L'inhibition des RM pendant la gestation empêche l'hypertrophie cellulaire. De plus, l'inhibition des RM bloque l'effet du lactate et du pyruvate sur la contractilité.

Chez la femme, la grossesse est associée à des changements des propriétés électriques du cœur. Sur l'électrocardiogramme, l'intervalle QTc est plus long, témoignant de la prolongation de la repolarisation. Les mécanismes régulant cette adaptation restent encore inconnus. Ainsi, notre troisième objectif était de déterminer le rôle du RM dans l'adaptation de la repolarisation. Chez la rate gestante, l'intervalle QTc est prolongé ce qui est corroboré par la diminution des courants potassiques I_{to} et I_{K1} . L'inhibition des RM pendant la gestation empêche la prolongation de l'intervalle QTc et la diminution des courants I_{to} .

Les travaux exposés dans cette thèse apportent une vision plus précise du remodelage cardiaque induit par la grossesse, qui est permise par l'étude à l'échelle cellulaire. Nos résultats montrent que lors de la gestation et de l'HG les cardiomyocytes subissent des remodelages morphologiques contrastés. Notre étude a aussi révélé que lors de la gestation, la fonction contractile est tributaire des adaptations métaboliques et que cette relation est altérée lors de l'HG. Nos travaux montrent que la régulation de ces adaptations gestationnelles fait intervenir le RM au niveau de la morphologie, de la relation métabolisme/fonctionnement contractile et de la repolarisation. En faisant avancer les connaissances sur l'hypertrophie de la grossesse, ces travaux vont permettre d'améliorer la compréhension des complications cardiovasculaires gestationnelles.

Mots-clés : grossesse, cœur, remodelage hypertrophique, récepteurs aux minéralocorticoïdes, métabolisme du glucose, courants ioniques.

Abstract

Pregnancy is characterized by marked hemodynamic and metabolic changes, which have consequences on the heart. The adaptation of the heart to this physiological situation requires a remodeling of its structure, and consequently functioning adjustments. Mechanisms responsible for these adaptations are largely unknown. However, this knowledge is essential for the understanding of cardiovascular complications, such as gestational hypertension (GH), which represents a risk for the mother and the foetus. To characterize cardiac adaptations to pregnancy, our experimental approach consisted in studying this remodelling at the level of left ventricle cardiomyocytes.

Therefore, our first objective was to determine structural and functional modifications of cardiomyocytes in pregnant rats to be able to identify their variations in GH. In pregnant rats, structural remodelling of cardiomyocytes was characterized by a proportional volume expansion. GH was induced by a high sodium supplement (0.9% NaCl). In hypertensive rats, we observe significant cell volume shrinkage. The study of functional modifications elicited a strong relationship between metabolic adaptations and cell contractility. According to our results, in pregnant rats cardiomyocyte contractility was increased in presence of energy substrates lactate and pyruvate. This effect was weaker in the cells from hypertensive rats. This suggested modifications of the excitation-contraction coupling, in which L-type calcium currents (I_{Ca-L}) play an important role. Unexpectedly, lactate and pyruvate induced a significant increase in I_{Ca-L} only in hypertensive rats.

In pathological conditions, mineralocorticoid receptors (MR) have been shown to mediate structural as well as functional remodelling of the heart. Our study is the first to investigate MR involvement in cardiac remodelling during pregnancy. Thus, our second objective was to determine MR involvement in cardiomyocyte remodelling. For this study, pregnant rats were treated with potassium canrenoate of (20 mg / kg / day), a MR antagonist. Our results revealed that MR inhibition during the pregnancy elicited a significant decrease of cell volume. MR inhibition has also affected metabolism and

cellular functioning relationship. Indeed, plasma concentration of lactate was lower, which was in correlation with its blunted effect on cell contractility.

In women, pregnancy-induced hypertrophy is associated with changes in electrical properties of the heart. Indeed, repolarisation is prolonged, which is characterised by a longer duration of QTc interval on the electrocardiogram. Regulation mechanisms involved in this adaptation are still largely unknown. Our third objective was therefore to determine the role of MR in the adaptation of repolarisation to pregnancy. Pregnancy induced a prolongation in QTc interval, which correlates with a decrease in potassium currents I_{to} and I_{K1} . MR inhibition prevented QTc interval prolongation and the lowering of I_{to} .

Our study gives a new insight of pregnancy-induced cardiac hypertrophy, which is provided by investigations at the cellular level. Our results demonstrate that pregnancy and GH are characterised by opposite remodellings. Moreover, in pregnancy the contractile function is dependent on metabolic adaptations. This is all the more glaring in GH as metabolic alterations induced modifications of electric properties to maintain contractile functioning. Furthermore, our work reveals MR involvement in the regulation of morphology, metabolism/contractility relationship, and repolarisation. By improving the knowledge of hypertrophy during pregnancy, this work contributes to improve the understanding of pregnancy-induced cardiac complications.

Keywords: pregnancy, cardiomyocytes, hypertrophic remodelling, mineralocorticoid receptors, glucose metabolism, ionic currents.

Table des matières

Introduction.....	20
1 Structure du cœur	20
2 Les adaptations hémodynamiques lors de la grossesse.....	23
2.1 Le volume sanguin	23
2.2 La résistance vasculaire et la pression artérielle	24
3 Remodelage de la structure du cœur lors de la grossesse.....	25
3.1 Hypertrophie cardiaque.....	26
3.2 Structure des cardiomyocytes	27
3.3 Hypertrophie des cardiomyocytes.....	29
4 Remodelage du fonctionnement du cœur lors de la grossesse	29
4.1 Le débit cardiaque.....	29
4.2 Activité électrique du cœur	30
4.3 Le potentiel d'action des cardiomyocytes.....	32
5 Métabolisme énergétique des cardiomyocytes.....	38
5.1 Métabolisme du glucose.....	39
5.2 Métabolisme du pyruvate.....	39
5.3 Métabolisme des lipides.....	45
6 Changements métaboliques lors de la grossesse.....	49
6.1 Métabolisme du glucose pendant la gestation.....	49
6.2 Transport du glucose vers le placenta	49
6.3 Utilisation du glucose maternel.....	50
7 Métabolisme et hypertrophie cardiaque	50
7.1 Hypertrophie pathologique	51
7.2 Hypertrophie physiologique.....	51
7.3 Métabolisme cardiaque lors de l'hypertrophie induite par la grossesse	51
8 Régulation hormonale : récepteur aux minéralocorticoïdes.....	52
8.1 Rôle physiologique du récepteur aux minéralocorticoïdes	53

8.2	Rôle des RM dans la grossesse	53
8.3	Rôle des RM dans le cœur	54
9	Hypertension gestationnelle	56
9.1	Définition	56
9.2	Altérations hémodynamiques et changements fonctionnels du cœur	58
9.3	Modifications de la structure cardiaque	58
10	Approche expérimentale.....	60
10.1	Modèle animal.....	60
10.2	Modèle cellulaire.....	62
10.3	Etude morphologique des cellules	62
10.4	Etude morphologique du cœur	63
10.5	Mesure des contractions.....	64
10.6	Etude des courants ioniques.....	65
11	Hypothèses et objectifs de l'étude.....	67
	Article 1 Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy.....	69
	Article 2 Cardiac remodelling during pregnancy -the role of mineralocorticoids...	94
	Article 3 The role of mineralocorticoid receptors in the regulation of cardiac repolarization in late pregnancy.....	128
	Discussion générale	158

Liste des tableaux

Tableau I. Bilan de la glycolyse.....	44
Tableau II. Bilan de la β -oxydation du palmitate.	47
Tableau III. Complications fœto-maternelles	57

Liste des figures

Figure 1	Vue antérieure de la coupe transversale de la cavité thoracique montrant le cœur dans le médiastin.....	21
Figure 2.	Structure du cœur.....	22
Figure 3.	Modifications de la position du cœur pendant la grossesse.....	25
Figure 4.	Structure d'un sarcomère	28
Figure 5.	Activité électrique du myocarde.....	31
Figure 6.	Potentiel d'action dans les cardiomyocytes.....	33
Figure 7.	Couplage excitation-contraction.....	35
Figure 8.	Réactions chimiques de la glycolyse	41
Figure 9.	Métabolisme des acides gras	48
Figure 10.	Effet du supplément sodique pression artérielle et l'effet vasoconstricteur de la phényléphrine chez la rate gestante.....	61

Liste des abréviations

A

AcétyCoA	Acétyl Coenzyme A
ACT	Aire de la coupe transversale
AGCL	Acide gras à chaîne longue
ANEPPS	Aminonaphthylethylenylpyridinium- potential sensitive
4-AP	4-Aminopyridine
ATP	Adénosine triphosphate

B

Ba ²⁺	ion barium
BaCl ₂	chlorure de barium
BAPTA-AM	acide 1,2-bi-(2-aminophénoxy)-éthane-N,N,N',N'-tétraacétique acétoxyméthylester
BSA	Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)

C

Ca ²⁺	Ion calcium
[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _e	Concentration extracellulaire de Ca ²⁺
CdCl ₂	Chlorure de cadmium
Cl ⁻	Ion chlore
CICR	Calcium induced calcium release (libération du calcium induite par le calcium)
CPT	Carnitine-palmitoyl-transferase
CT-1	Cardiotrophine 1

E

ECG	électrocardiogramme
-----	---------------------

EGTA Acide éthylèneglycol-bis (-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'- tétra-acétique
 E_K potentiel d'équilibre du K^+

F

FABP Fatty acid binding protein (protéine de liaison des acides gras)
 FADH₂ Flavine adénine dinucléotide forme réduite

H

HEPES acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane sulfonique
 HG hypertension gestationnelle

I

I courant
 I_{Ca-L} courant calcique de type L
 I_{Ca-T} courant calcique de type T
 I_{K1} courant potassique entrant
 $I_{K(ATP)}$ courant potassique inhibé par l'ATP
 I_{Kur} courant potassique très rapide à rectification retardée
 I_{Na} courant sodique
 I_{sus} courant potassique soutenu à rectification retardée
 I_{to} courant potassique transitoire sortant
 IMVG Index de masse du ventricule gauche

K

$[K^+]_i$ Concentration intracellulaire de K^+
 $[K^+]_e$ Concentration extracellulaire de K^+
 K^+ Ion potassium
 KCl Chlorure de potassium
 KOH Hydroxyde de potassium

L

LDH Lactate déshydrogénase

M

MCT Monocarboxylate transporters (transporteur de monocarboxylate)

MgCl₂.6H₂O Hexahydrate de chlorure de magnésium

MR Mineralocorticoid receptor

MVG Masse du ventricule gauche

N

Na⁺ Ion sodium

NaCl Chlorure de sodium

NaH₂PO₄ Phosphate de sodium monobasique

NaOH Hydroxyde de sodium

NAV Nœud auriculo-ventriculaire

NCX Echangeur Na⁺/Ca²⁺

P

PA Potential d'action

PAI Plaminogen activator inhibitor (inhibiteur de l'activateur du plasminogène)

Pcr Phosphocréatine

Q

QTc Intervalle QT corrigé par rapport à la fréquence cardiaque

R

RM Récepteur aux minéralocorticoïdes

RS Réticulum sarcoplasmique

S

SERCA	Sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone

T

TAG	Triacylglycérol
TEA	Tétraéthylammonium
TG	Triglycérides

U

UPA	Urokinase-type plasminogen activator (activateur du plasminogène de type urokinase)
UPAR	UPA receptor (récepteur de l'UPA)

V

VLDL	Very low density lipoproteins (lipoprotéines de très faible densité)
vs	versus

Unités

A	ampère
batt/min	battements par minute
°C	degré Celsius
d	day
g	gramme
Hz	hertz
h	heure
j	jour
L	litre
m	mètre

min	minute
mmHg	millimètre de mercure
mol	mole
M	molaire
s	seconde
V	volt

*A ma famille,
pour votre soutien, vos encouragements
et votre patience*

Remerciements

Je remercie ma directrice de recherche Dre Alzbeta Chorvatova pour la transmission de ses connaissances et de sa passion pour la recherche. Je la remercie aussi pour m'avoir permis d'évoluer sur le plan professionnel et personnel.

Pour leur contribution dans nos travaux, je remercie le Dr Jean-Claude Fouron, le Dr Blandine Comte et Mme Fathia Elzwiei.

Je remercie tous les membres du jury pour le temps qu'ils accorderont à l'évaluation de ma thèse.

Pour leur soutien financier, je remercie le Département de Physiologie de l'Université de Montréal et la Fondation de CHU Sainte-Justine.

INTRODUCTION

La grossesse est un état physiologique particulier au cours duquel l'organisme maternel subit des modifications directement liées aux besoins métaboliques du fœtus. Ces adaptations physiologiques résultent d'interactions biochimiques entre l'organisme maternel, le placenta et le fœtus. On observe notamment des changements significatifs de la fonction cardiovasculaire ayant pour but d'améliorer la nutrition et l'oxygénation fœtales. L'incapacité de produire ou encore de maintenir ces adaptations lors de la grossesse résulte en des complications, telles que l'hypertension gestationnelle ou les cardiomyopathies, mettant en péril la santé de la mère et du fœtus. Les mécanismes impliqués dans ces adaptations et leurs voies de régulation sont peu connus voire inconnus. Il apparaît donc que les lacunes dans la connaissance des adaptations cardiovasculaires de la grossesse sont au détriment de la compréhension de leurs altérations et par conséquent de leurs traitements. Ainsi, l'objectif de nos travaux est de caractériser les adaptations cardiaques et leur régulation lors de la grossesse afin d'identifier les altérations de ces processus menant à des inadaptations lors de l'hypertension gestationnelle.

Dans un premier temps, nous aborderons les adaptations cardiaques aux changements hémodynamiques et métaboliques au cours de la grossesse. Ensuite, nous verrons le rôle que peut avoir le récepteur aux minéralocorticoïdes dans la régulation hormonale du remodelage cardiaque gestationnel. Enfin, nous évoquerons les complications associées à l'hypertension gestationnelle.

1 STRUCTURE DU CŒUR

Le cœur est un organe musculéux d'environ 250 g chez la femme, possédant la forme d'une pyramide triangulaire. Il est situé sur le diaphragme, près du centre de la cavité thoracique dans une masse tissulaire appelé le médiastin, allant du sternum à la colonne vertébrale et s'infiltré entre les poumons (Figure 1). L'extrémité du cœur ou apex pointe

vers le bas, vers la gauche et vers l'avant. A l'opposé de l'apex, la base du cœur est orientée vers l'arrière, le haut et la droite [1].

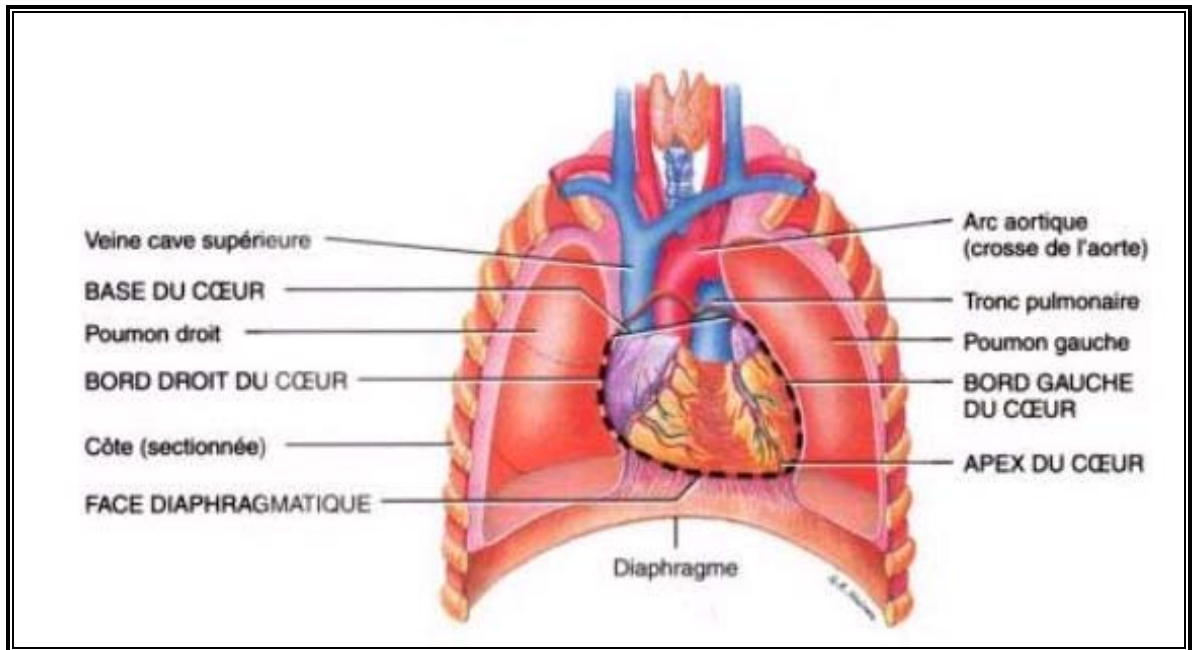


Figure 1. Vue antérieure de la coupe transversale de la cavité thoracique montrant le cœur dans le médiastin.

Tiré de Tortora [1].

Le cœur est un organe creux composé de deux entités distinctes séparées: le cœur droit et le cœur gauche. Chaque cœur est composé d'un ventricule et d'une oreillette séparés par la valve tricuspide pour le cœur droit et la valve mitrale pour le cœur gauche (Figure 2). Le septum interauriculaire est la cloison séparant les oreillettes, le septum ventriculaire celle qui sépare les ventricules. Il n'y a pas de connexion du tissu myocardique entre oreillettes et ventricules [2].

Le cœur est formé de trois parois qui sont de l'intérieur vers l'extérieur:

- l'endocarde, couche cellulaire constituée d'endothélium et de tissu conjonctif, qui tapisse l'intérieur des cavités et des valves

- le myocarde, la partie la plus volumineuse, est constitué majoritairement de cellules musculaires

L'épaisseur du myocarde varie selon les parties du cœur. Il est plus épais au niveau des ventricules car ceux-ci développent une pression plus élevée que les oreillettes. C'est au niveau du ventricule gauche que le myocarde est le plus épais : il a environ deux fois l'épaisseur du ventricule droit.

- le péricarde, un tissu fibreux, qui forme un sac autour du cœur. Il est composé lui-même de deux feuillets, le péricarde viscéral et le péricarde pariétal entre lesquels se trouve une faible quantité de liquide péricardique [1].

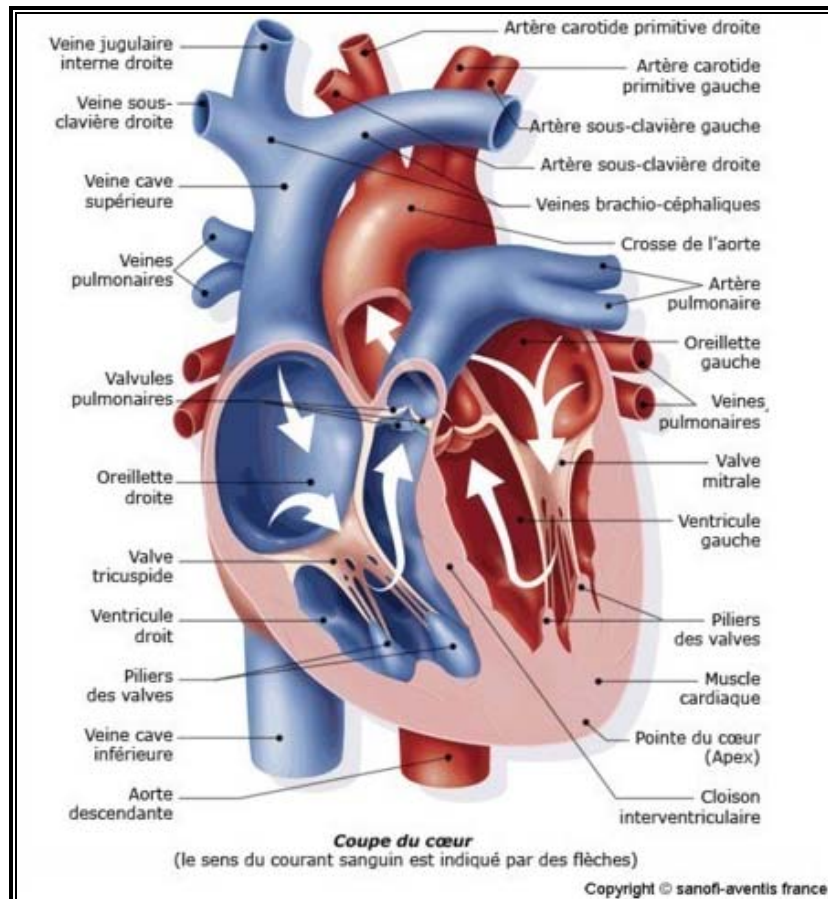


Figure 2. Structure du cœur

Les flèches indiquent le sens de la circulation du sang dans les cavités cardiaques. Le sang rouge est le sang oxygéné recueilli par les veines pulmonaires et le sang bleu est le sang provenant des tissus.

Le cœur fonctionne comme une pompe. Lorsque le cœur est en phase de relaxation ou en diastole, les oreillettes aspirent le sang venant des veines : les veines pulmonaires pour l'oreillette gauche, les veines caves supérieures et inférieures pour l'oreillette droite (Figure 2). Elles se remplissent de sang, oxygéné pour la gauche, périphérique pour la droite. La contraction du cœur ou systole commence par celles des oreillettes, le sang est propulsé dans les ventricules respectifs avec ouverture des valves mitrale (à gauche) et tricuspide (à droite). La contraction atteint les ventricules qui éjectent alors le sang dans l'aorte (à gauche) et le tronc pulmonaire (à droite) avec ouverture des valves correspondantes et fermeture des valves mitrale et tricuspide. Bien que les deux ventricules éjectent le sang simultanément, le ventricule droit fournit moins d'effort car il expulse le sang vers les poumons situés à proximité et qui n'opposent qu'une faible résistance. Le ventricule gauche approvisionne toutes les parties du corps, qui opposent une résistance élevée au flux sanguin. De ce fait, il fournit un travail plus important pour maintenir le débit sanguin [1].

2 LES ADAPTATIONS HÉMODYNAMIQUES LORS DE LA GROSSESSE

D'importantes modifications hémodynamiques de la circulation maternelle sont constatées tout au long de la grossesse. Ces adaptations ont pour objectif d'optimiser la perfusion placentaire afin de permettre au fœtus de se développer dans des conditions favorables. Elles conduisent à une surcharge volumique pour le cœur et de ce fait, elles vont avoir des répercussions sur sa morphologie et son fonctionnement.

2.1 Le volume sanguin

L'expansion progressive du volume plasmatique, qui se produit chez les femmes enceintes et les rates gestantes [3, 4] est nécessaire pour le cours normal de la grossesse. Chez la femme enceinte, le volume sanguin augmente à partir de la 6^e semaine de grossesse et atteint un plateau à environ 50% de volume excédentaire au début du troisième trimestre. Le volume plasmatique ne revient à sa valeur de base qu'entre la 6^e et la 8^e semaine post-

partum [5]. Chez la rate, l'augmentation du volume sanguin est plus importante que chez la femme, puisqu'elle se situe entre 50 et 70%. L'expansion volumique commence à partir du 11^e ou 12^e jour de gestation mais l'essentiel du gain volumique se produit au cours de la dernière semaine de gestation [6, 7].

L'origine de ce changement hémodynamique est encore incertaine. Une des possibilités est que la diminution de la résistance vasculaire totale génère un signal de «sous-remplissage» qui stimule la rétention du sodium et l'expansion du plasma. Cette théorie concorde avec l'augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) [8-10]. Le SRAA, en particulier l'aldostérone, est impliqué dans la régulation de l'équilibre entre l'eau et le Na⁺ au niveau rénal. Les composants du SRAA sont exprimés au niveau du placenta, de telle sorte que du côté maternel, il y a deux SRAA actifs l'un au niveau rénal et l'autre au niveau l'utéro-placentaire [11]. Une autre possibilité implique des changements de l'osmorégulation. Ainsi, il y a un abaissement du seuil d'osmolarité pour la sensation de soif et la libération de vasopressine afin de maintenir l'osmolarité du plasma pendant la grossesse [12, 13]. Il en résulte une rétention plus importante d'eau et de Na⁺ qui est aussi due à l'activation du SRAA

2.2 La résistance vasculaire et la pression artérielle

En dépit de l'augmentation du volume sanguin et de l'activation du SRAA, la grossesse est caractérisée par une baisse de la pression artérielle. Chez la femme, la pression artérielle baisse dès le premier trimestre. Elle atteint son plus bas niveau à la 16^e semaine pour ensuite revenir au niveau initial à terme [14]. Chez la rate, la pression ne change pas avant le 14^e jour et diminue graduellement jusqu'à terme c'est-à-dire le 22^e jour de gestation [15].

Chez la femme et la rate, une diminution de la résistance vasculaire est observée et elle est accompagnée d'une diminution de la réponse aux agents vasoconstricteurs [16, 17] et une augmentation de la réponse aux agents vasodilatateurs [18]. Chez la femme, la résistance vasculaire périphérique diminue à partir de la 5^e semaine [19] et atteint son plus bas niveau à la 16^e semaine [14]. Chez la rate, la résistance vasculaire périphérique diminue d'environ 23% au 13^e jour puis continue de descendre progressivement jusqu'en fin de gestation [20].

Les adaptations hémodynamiques induites par la grossesse aboutissent à une surcharge volumique, qui est un stimulus reconnu pour générer un remodelage hypertrophique du cœur.

3 REMODELAGE DE LA STRUCTURE DU CŒUR LORS DE LA GROSSESSE

Pendant la grossesse, le cœur est déplacé vers le haut et vers la gauche. Son apex est déplacé latéralement si bien que sa position est plus horizontale (Figure 3).

Chez les humains et les rongeurs la grossesse est associée à des changements structuraux et fonctionnels du cœur [21, 22]. Les adaptations hémodynamiques présentées précédemment vont entraîner une augmentation significative de la charge de travail du cœur, qui va être prise en charge principalement par le ventricule gauche du cœur, d'où notre intérêt pour l'étude des cardiomyocytes du ventricule gauche.

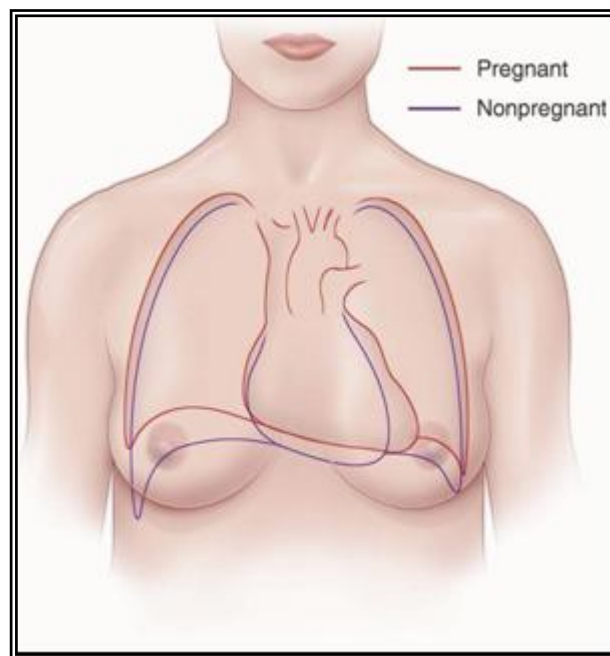


Figure 3. Modifications de la position du cœur pendant la grossesse

Le tracé rouge représente la position du cœur lors de la grossesse et le tracé bleu en-dehors de la grossesse. Image adaptée de Bonica & McDonald [23]. Permission de l'éditeur Wolters Kluwer (#B59348256).

3.1 Hypertrophie cardiaque

Selon Mone et al. [24], le remodelage hypertrophique du cœur observé chez les femmes enceintes serait similaire à celui observé chez les athlètes féminines, en particulier les athlètes soumis à un exercice d'endurance tels que les coureurs de marathon. Le remodelage hypertrophique du cœur suite à l'entraînement est connu sous le nom de «cœur d'athlète» [25]. Chez les athlètes soumis à un exercice d'endurance, l'hypertrophie est développée suite à une surcharge volumique et est dite de type excentrique [26]. La surcharge de volume due à un retour veineux accru augmente la pression ventriculaire gauche au cours du remplissage et étire ainsi la paroi ventriculaire. Ce type d'hypertrophie est caractérisé par une augmentation de l'épaisseur ventriculaire proportionnelle à l'élargissement de la cavité ventriculaire [27, 28]. Ainsi la surcharge de volume peut conduire à un remodelage ventriculaire caractérisé par une paroi plus épaisse et une cavité plus large, tout en ayant un rapport normal, épaisseur de la paroi/diamètre interne, ce qui permet de normaliser le stress imposé à la paroi.

Chez la femme enceinte, la surcharge volumique entraîne des changements de la structure du myocarde qui sont pour la majorité observables au cours du dernier trimestre. Ainsi, l'augmentation de la masse du ventricule gauche est de 23% au 3^e trimestre par rapport aux valeurs prégestationnelles. De plus, au 3^e trimestre, l'élargissement de la cavité ventriculaire pendant la diastole et l'épaississement de paroi sont aussi plus importants [29]. L'hypertrophie du ventricule gauche développée lors de la grossesse étant en corrélation avec les changements hémodynamiques, le myocarde peut inverser le remodelage en période post-partum. En effet, la masse du ventricule gauche retourne à sa valeur prégestationnelle vers 8 à 10 semaines en post-partum [29].

Afin de comprendre les changements sous-jacents à ce remodelage morphologique du ventricule, il est nécessaire de connaître la structure des cardiomyocytes. C'est ce que nous verrons dans la section suivante.

3.2 Structure des cardiomyocytes

Près de la moitié du volume des cardiomyocytes est occupé par les protéines contractiles. Le reste du volume est majoritairement occupé par les mitochondries, générant la majorité de l'énergie nécessaire à la contraction (*voir section 5. Métabolisme des cardiomyocytes*). L'organisation des protéines contractiles est basée sur la répétition d'une unité structurale, appelée sarcomère, composé de deux sortes de filaments : les filaments fins et les filaments épais. En microscopie électronique, on distingue les filaments fins qui sont séparés en deux par une ligne appelée ligne Z. Le sarcomère est défini par la région entre deux bandes Z. Il est donc constitué des extrémités vers l'intérieur de deux bandes Z, des filaments fins et des filaments épais [2].

Les filaments fins sont constitués de polymères d'actine, de la tropomyosine et du complexe de la troponine. La troponine comprend trois protéines la dénommées troponine-T, troponine-I et troponine-C. Chacune possède une fonction différente : la troponine-T est responsable de la liaison troponine-tropomyosine; la troponine-I possède une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de la myosine; la troponine-C possède des sites de fixation pour le calcium qui, lorsqu'ils sont occupés, lèvent l'action inhibitrice de la troponine I. Les filaments épais sont constitués de polymères de myosine [30].

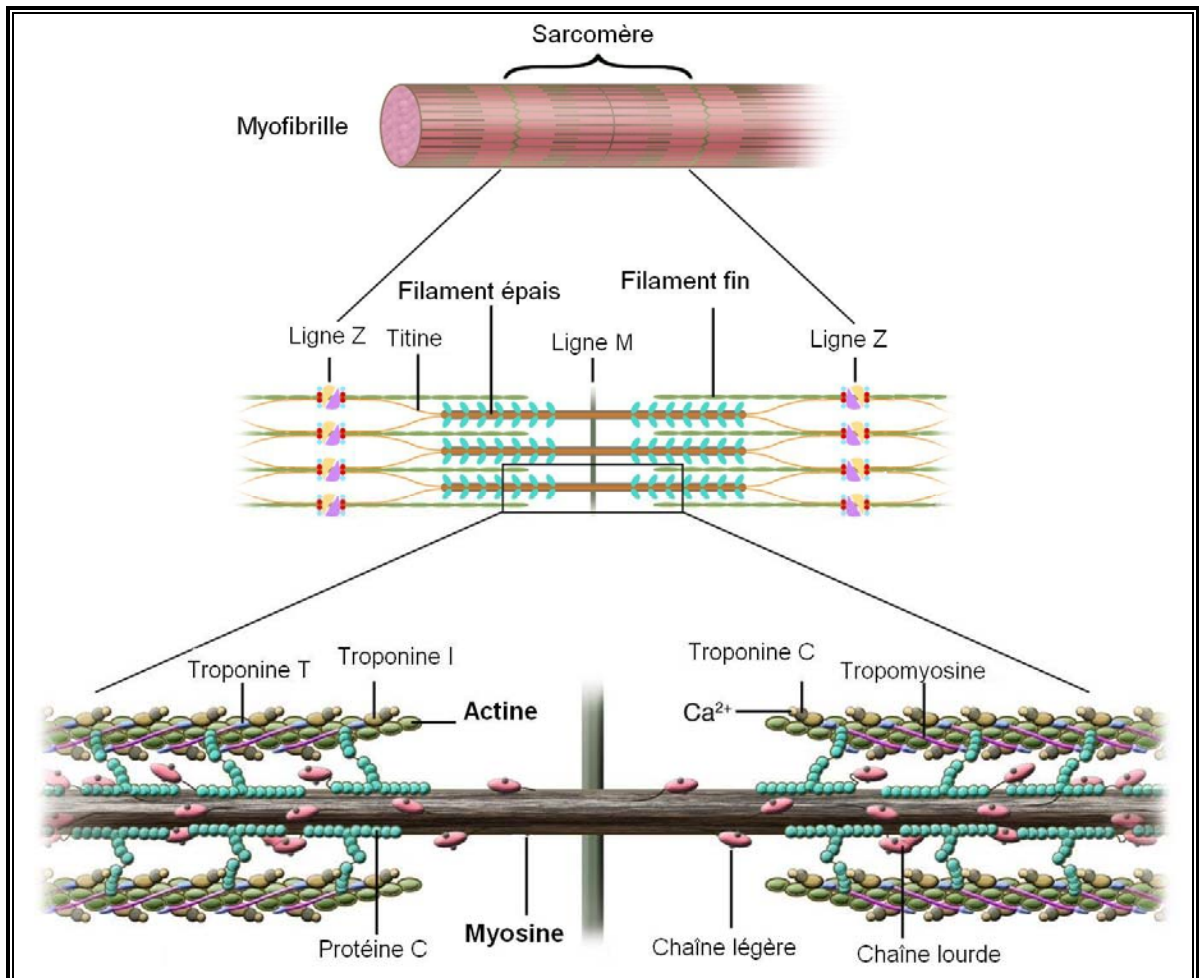


Figure 4. Structure d'un sarcomère

Le sarcomère, unité contractile du cardiomyocyte, est délimité par les lignes Z et contient les deux types de filaments. Les protéines contractiles sont disposées en rangées régulières de filaments fins et épais. Les filaments fins sont composés de polymères d'actine, de la tropomyosine et des troponines C, I et T. Les filaments épais sont formés de myosine incluant la chaîne lourde et la chaîne légère et la protéine C permettant la liaison entre les deux types de filaments. Adapté de Morita et al. [31].

3.3 Hypertrophie des cardiomyocytes

Les modifications structurales visibles au niveau du ventricule impliquent des modifications de ses composantes structurales, qui sont majoritairement les cardiomyocytes. Ainsi, la surcharge volumique continue induit un remodelage des cardiomyocytes. Il y a une trentaine d'années, Grossman [32] a proposé que l'hypertrophie ventriculaire était un processus biologique initié par un événement mécanique. Selon l'équation de La Place, le stress de la paroi est égal au produit de la pression et du rayon de la cavité ventriculaire divisé par le double de l'épaisseur de la paroi. En se basant sur ce paradigme, Grossman a établi la théorie selon laquelle la surcharge de volume induirait la réplication en série des sarcomères dans les cardiomyocytes et par conséquent l'allongement de ces derniers. Nombreuses sont les études qui ont depuis confirmé cette hypothèse tant en conditions pathologiques que physiologiques. Cependant, peu d'études ont caractérisé le remodelage cellulaire lors de la gestation. Seule, une étude réalisée chez la souris gestante a démontré un remodelage hypertrophique des cardiomyocytes de type excentrique [21].

Lors de l'hypertrophie pathologique, les altérations de la structure du myocarde sont associées à des altérations fonctionnelles des cellules. Qu'en-est-il lors de la grossesse? Avant de répondre à cette question, nous verrons comment les cardiomyocytes fonctionnent.

4 REMODELAGE DU FONCTIONNEMENT DU CŒUR LORS DE LA GROSSESSE

4.1 Le débit cardiaque

Le débit cardiaque est le volume sanguin que le cœur éjecte chaque minute dans l'aorte. C'est également le volume de sang passant dans la circulation pour alimenter les tissus et leur permettre d'éliminer leurs déchets [33]. Le débit cardiaque est le produit de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection, par conséquent l'augmentation de ces deux

paramètres au cours de la grossesse contribue à son augmentation. L'accroissement du débit cardiaque s'explique par l'augmentation du volume d'éjection systolique qui est liée à l'augmentation de la volémie, donc de la précharge et à la baisse de la postcharge par diminution de la résistance artérielle. Le volume d'éjection augmente graduellement chez la femme de la 8^e à la 24^e semaine puis atteint un plateau.

4.2 Activité électrique du cœur

La fréquence cardiaque correspond à l'intervalle de temps qui s'écoule entre deux battements cardiaques [33]. Un des changements les plus précoces est l'augmentation de la fréquence cardiaque qui se produit dès la 4^e semaine de grossesse chez la femme et se poursuit jusqu'en fin de grossesse où elle atteint son pic. A terme, elle est environ 20% supérieure aux valeurs pré-gestationnelles ce qui correspond à une augmentation de 15 batt/min [14]. Chez la rate, lors de la gestation, la fréquence cardiaque augmente de 360 à 420 batt/min [34].

A l'état normal, ce sont les cellules pacemaker du nœud sinusal qui imposent la fréquence cardiaque (Figure 5.A). Ces cellules ont la propriété de générer des dépolarisations spontanées. Elles sont situées dans l'oreillette droite près de la jonction avec la veine cave supérieure. La vague de dépolarisation qui est initiée par ces cellules se propage d'abord au niveau de l'oreillette droite puis à la gauche. Le stimulus électrique est ensuite transmis par les oreillettes au nœud auriculo-ventriculaire (NAV), qui génère des dépolarisations plus lentes. Cela entraîne un délai dans la transmission vers le ventricule. Ce ralentissement permet aux oreillettes de se contracter avant les ventricules et à ces derniers de se remplir complètement avant leur contraction. Le NAV se divise en deux branches au niveau du septum interventriculaire: la droite et la gauche qui vont traverser les ventricules droit et gauche. Le signal transmis par des branches entre ensuite dans le réseau de fibres de His-Purkinje, qui sont dotées d'une conductance rapide et synchronisent l'activation des ventricules [2]. Cet ensemble d'évènements électriques et mécaniques qui permet au sang de circuler dans les ventricules est nommé cycle cardiaque. Il est constitué d'une diastole suivie d'une systole [35].

L'activité électrique du myocarde peut être évaluée en clinique par l'électrocardiogramme (ECG). Le signal enregistré correspond à des différences de potentiels dans le cœur, mesurées à l'aide d'électrodes placées à la surface du corps. L'ECG se décompose en différentes ondes nommées P, Q, R, S et T (Figure 5.B). L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes. Le complexe QRS est produit par la dépolarisation du ventricule et correspond à la phase ascendante du potentiel d'action. L'intervalle QT correspond au potentiel d'action ventriculaire et l'onde T à la repolarisation ventriculaire [36].

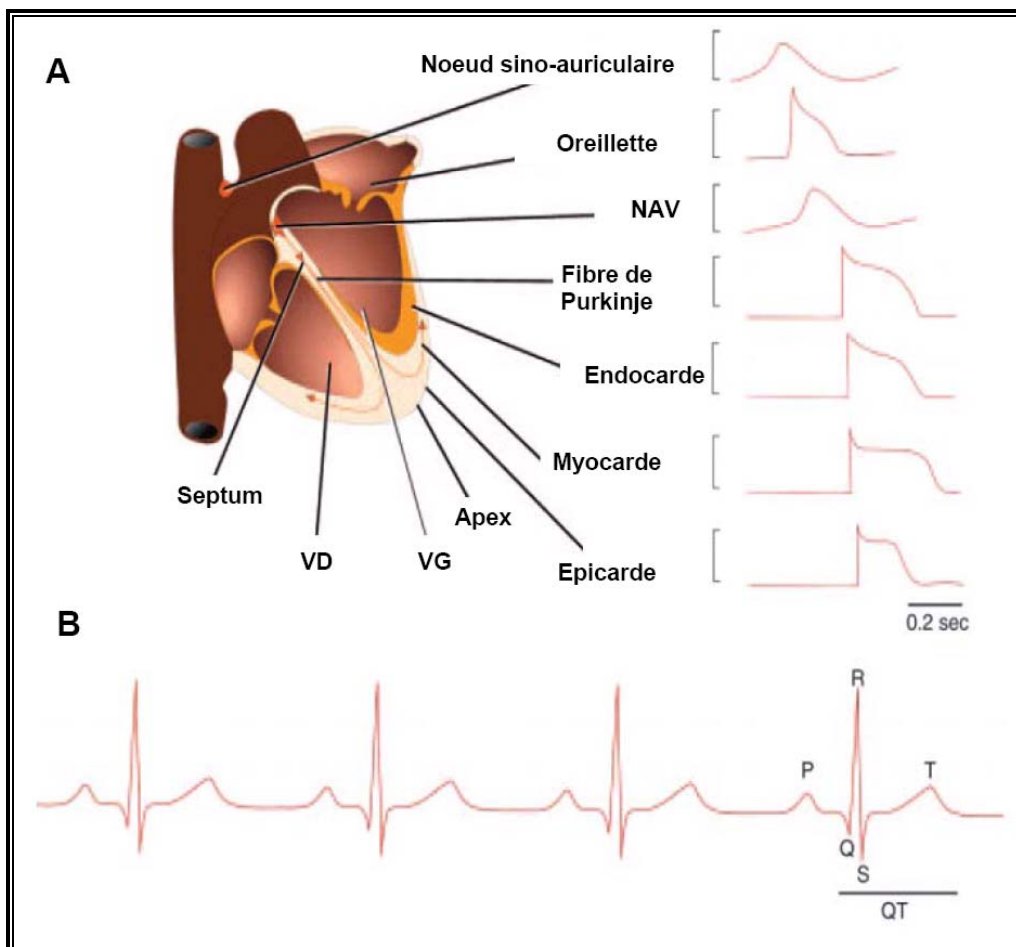


Figure 5. Activité électrique du myocarde.

A. Schéma des potentiels d'action enregistré dans les différentes parties du cœur humain. Les flèches indiquent le sens de la conduction du signal électrique. B. Schéma d'un électrocardiogramme de surface. Figure adaptée de [37].

4.3 Le potentiel d'action des cardiomyocytes

Les évènements mécaniques qui permettent au cœur d'assurer sa fonction de pompe sont initiés par des changements des propriétés électriques des cellules cardiaques.

Les cellules sont activées par un signal appelé le potentiel d'action (PA). Il s'agit d'une variation rapide du potentiel membranaire de la cellule due à l'ouverture et la fermeture séquentielles de canaux ioniques. Pour qu'un PA se produise le stimulus électrique doit être assez grand pour que le potentiel membranaire de repos s'élève au-dessus de la valeur seuil. De plus, une fois que la stimulation a dépassé la valeur seuil, la réponse des cellules sera toujours la même quelle que soit l'intensité de la stimulation, on parle de phénomène de tout ou rien [38]. Le potentiel membranaire devient positif (dépolariation) mais ce changement n'est que transitoire car il est suivi d'un retour rapide vers le potentiel membranaire de repos (repolarisation). La propagation du PA dépend d'une part du flux de courant entre l'espace extracellulaire et le milieu intracellulaire et d'autre part du flux de courant entre les milieux intracellulaires de cellules adjacentes. Dans le muscle cardiaque, les cellules sont séparées à leurs extrémités par les disques intercalaires qui sont des membranes cellulaires. Au niveau de ces disques intercalaires, les cellules musculaires forment entre elles des jonctions communicantes connues sous le nom «gap junctions». Ces jonctions sont des canaux permettant la diffusion des ions entre les cellules. De ce fait, la résistance électrique des disques intercalaires est faible par rapport à celle du reste de la membrane plasmique. Ainsi, lors du PA, tandis qu'une cellule est dépolariée, la diffusion du flux de courant vers les cellules voisines s'effectuera dans le sens longitudinal [39].

Les PA présentent différentes étapes. La phase de repos qui correspond au potentiel de repos membranaire. La dépolariation, une diminution de degré d'électronégativité de la cellule au repos, se produit quand les ions Na^+ entrent dans le cytosol et génèrent des courants entrants. La repolarisation se produit quand les courants sortants restaurent le potentiel de repos. Dans les cardiomyocytes, les courants repolarisants sont dus à l'efflux d'ions K^+ majoritairement et l'influx d'ions Cl^- [40]. Le PA des cellules myocardiques est plus long chez l'homme que chez le rat, avec une durée de 200 à 300 ms chez l'homme

[41] et de 80 à 90 ms chez le rat [42]. Cependant, chez les deux espèces le PA est composé de cinq phases (Figure 6) : la phase 0 est la phase ascendante ou phase de dépolarisation rapide, la phase 1 est la phase de repolarisation précoce, la phase 2 est la phase de plateau, la phase 3 est la phase de repolarisation finale et la phase 4 le potentiel de repos. Ces phases font intervenir différents systèmes de transport ioniques dont les courants calciques et potassiques que nous avons étudiés.

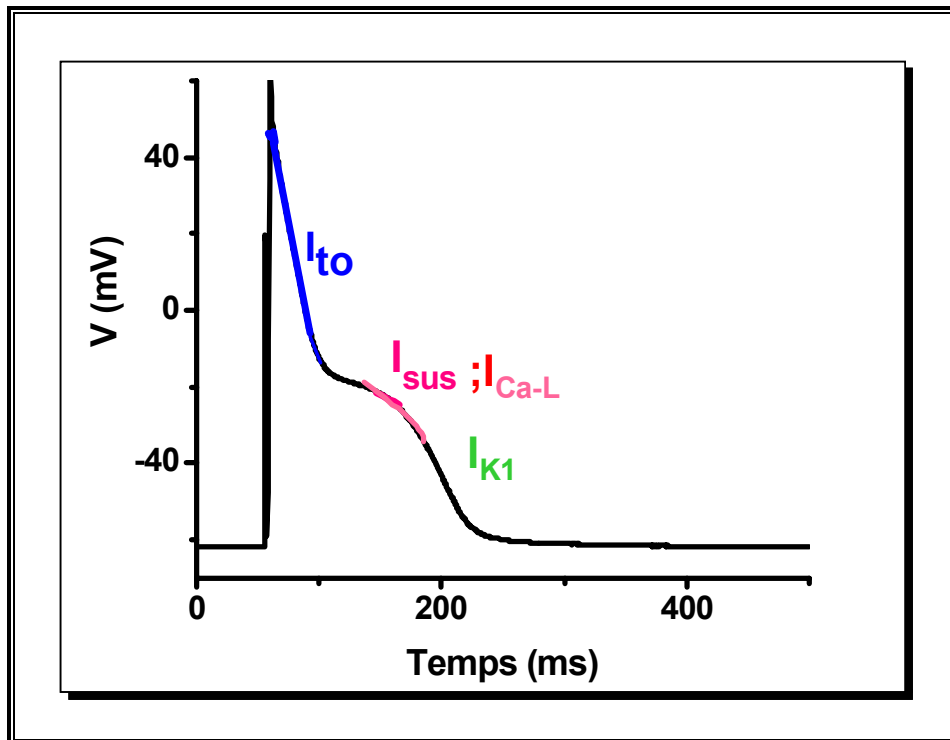


Figure 6. Potentiel d'action dans les cardiomyocytes

Représentation d'un potentiel d'action d'un cardiomyocyte de rate nullipare à partir nos enregistrements. Les courants étudiés sont en couleur : les courants calciques de type L, $I_{Ca,L}$; les courants potassiques sortants I_{to} et I_{sus} ainsi que le courant entrant I_{K1} .

4.3.1 Le couplage excitation-contraction : rôle des courants calciques de type L

La contraction musculaire correspond à un raccourcissement des sarcomères dû au glissement relatif des filaments d'actine et de myosine : les deux disques Z délimitant un sarcomère se rapprochent l'un de l'autre [2]. Ce phénomène se produisant simultanément pour tous les sarcomères de la cellule, il en résulte un raccourcissement global de la cellule musculaire selon l'axe longitudinal.

La contraction cardiaque est initiée par une élévation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire libre déclenchée par le PA. L'ensemble des événements qui couple la dépolarisation du sarcolemme à l'élévation de Ca^{2+} et au déclenchement de la contraction cardiaque est désigné comme le couplage excitation-contraction [43]. Pendant le PA cardiaque, les ions Ca^{2+} entrent principalement dans la cellule par les canaux calciques activés par la dépolarisation, les canaux calciques de type L ($I_{\text{Ca-L}}$) (Figure 7.A). Les ions Ca^{2+} entrants induisent la libération du Ca^{2+} emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique (RS) par sa liaison aux récepteurs à la ryanodines présents sur la membrane du RS [43]. Ce phénomène est connu sous l'acronyme de «CICR» qui signifie «Calcium Induced Calcium Release» ou libération du calcium induite par le calcium. La combinaison de l'influx d'ions Ca^{2+} et de leur libération augmente la concentration du Ca^{2+} libre intracellulaire, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ce qui permet au Ca^{2+} de se lier à la troponine C. Le changement de conformation de la troponine C lève l'inhibition de la troponine I et déplace la tropomyosine, cela favorise les interactions entre l'actine et la myosine. Le raccourcissement des sarcomères est dû à un cycle de liaison-dissociation entre l'actine et la myosine, associé à des changements de conformation de la myosine et nécessitant de l'ATP (Figure 7.B). Pour que la relaxation se produise la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ doit diminuer afin de permettre au Ca^{2+} de se dissocier de la troponine C. Cela requiert le transport des ions Ca^{2+} hors du cytosol par quatre voies : la Ca^{2+} -ATPase du RS, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme ainsi que l'uniporteur mitochondrial [36].

Ainsi, le couplage excitation-contraction et la force contractile du myocarde dépendent de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, initiée par les canaux calciques de type L présents dans le sarcolemme [44]. Cet influx de Ca^{2+} constitue un courant entrant qui tend à rendre le potentiel membranaire plus positif, mais surtout sert de second messenger dans le couplage excitation-contraction [44]. Ces canaux s'ouvrent suite à la dépolarisation membranaire lors du PA et contribuent à la phase 2, soit le plateau du PA. De par leur rôle dans l'homéostasie du calcium et le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes, il nous semblait important d'étudier ces courants lors de la gestation.

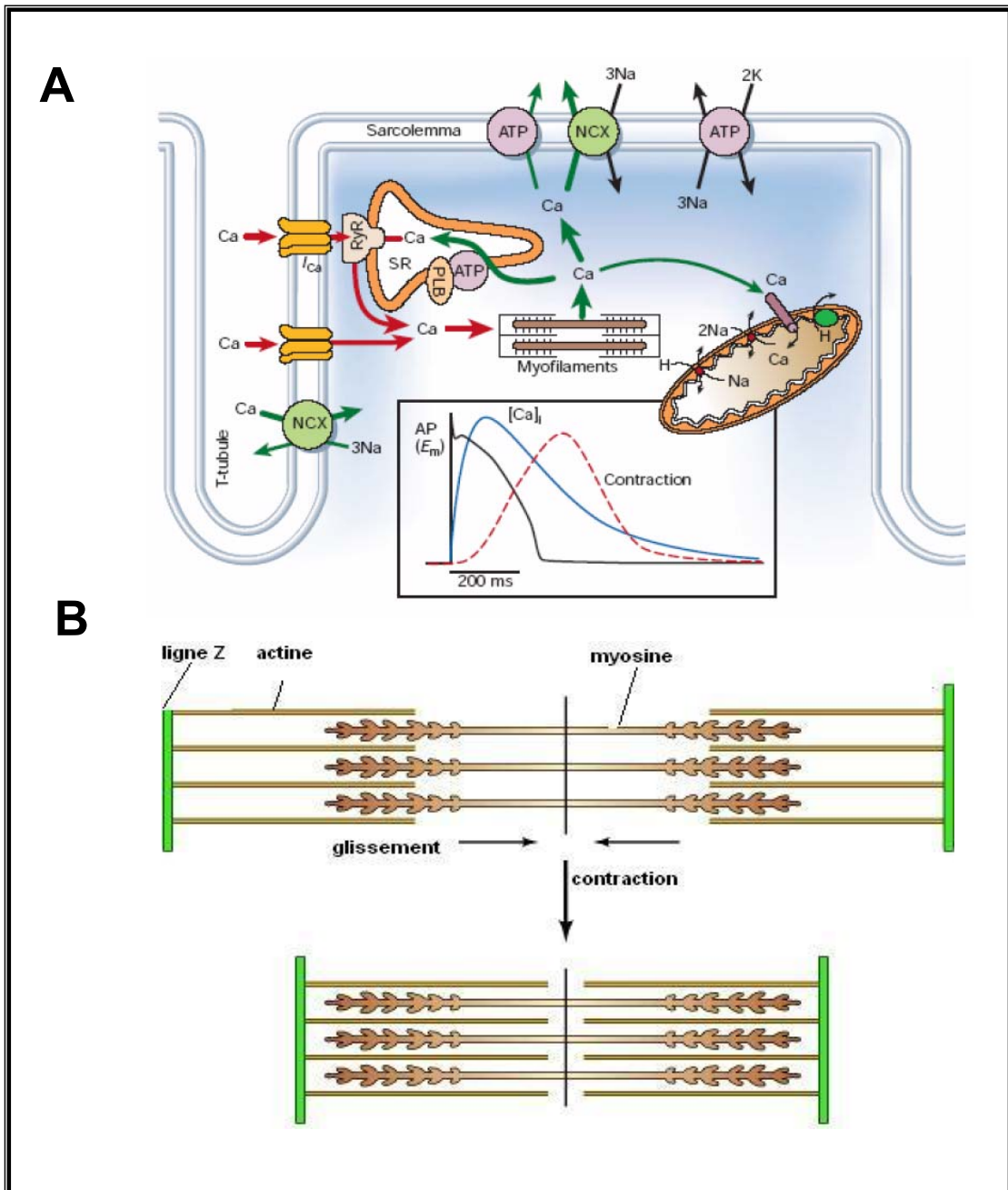


Figure 7. Couplage excitation-contraction

A. Le couplage excitation-contraction est déclenché par les courants calciques I_{Ca} . Les ions Ca^{2+} servent alors de second message pour induire la libération du calcium contenu dans les réserves et générer l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Dans l'encadré, représentation d'un potentiel d'action (noir) et de l'évolution de la $[Ca^{2+}]_i$ (bleu) lors de la contraction (pointillés rouges) mesurés dans un cardiomyocyte ventriculaire. NCX, échangeur Na^+/Ca^{2+} ; ATP, ATPase; PLB, phospholamban; RyR, récepteur à la ryanodine; SR, sarcoplasmic reticulum. Extrait de Bers [43], avec l'accord de Nature Publishing Group. Licence 2345540435175. B. Le raccourcissement des sarcomères est induit par le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine en direction du milieu du sarcomère. Adapté de Cooper [45].

4.3.2 La repolarisation : rôle des courants potassiques

Lors de la grossesse des modifications de la repolarisation cardiaque ont été observées. En effet, l'intervalle QT de l'ECG, qui correspond au PA ventriculaire, est prolongé [46]. Dans les cardiomyocytes, chez la femme et la rate, la repolarisation est majoritairement contrôlée par les courants potassiques, d'où notre intérêt pour les courants I_{to} , I_{sus} et I_{K1} . Nous verrons dans les sections suivantes les caractéristiques de ces systèmes de transport.

4.3.3.1 Courant potassique transitoire sortant

Les courants potassiques I_{to} (to signifiant «transient outward», transitoire sortant) jouent un rôle important dans la repolarisation des myocytes ventriculaires de plusieurs espèces dont l'humain et le rat [47-50]. En effet, I_{to} est responsable de la repolarisation rapide (phase 1 du PA) entre la phase ascendante et le plateau du PA [37, 47, 48]. I_{to} est constitué de deux courants I_{to1} et I_{to2} . Le premier est un courant potassique inhibé par la 4-aminopyridine. Le second n'est pas sensible à la 4-aminopyridine et dans plusieurs espèces [51-54] sauf l'humain [55] il a été identifié comme un courant chlore dépendant du calcium. Nos travaux portent sur I_{to1} qui est aussi communément appelé I_{to} . I_{to} est exprimé chez le rat et chez l'humain [56, 57]. I_{to} s'active rapidement par la dépolarisation mais s'inactive aussi rapidement [37]. Etant donné sa contribution à la phase de repolarisation précoce, I_{to} affecte la densité du courant I_{Ca-L} via son effet sur le potentiel membranaire; par conséquent I_{to} peut influencer les processus du couplage excitation-contraction, la contractilité du myocarde ainsi que la repolarisation. Ainsi, les changements de densité des courants I_{to} peuvent modifier la durée du potentiel d'action. En effet, lors de la gestation chez la souris, Eghbali et al. [21] ont démontré une diminution des courants I_{to} ventriculaires, qui était aussi associée à une prolongation du PA et de l'intervalle QT de l'ECG. Chez l'homme et le rat dans les conditions d'hypertrophie pathologique, il a été démontré que son inhibition mène à une prolongation significative du PA [56, 58]. L'hypertrophie induite par la grossesse partage ces caractéristiques avec l'hypertrophie pathologique.

Il existe deux types de courant potassique I_{to} nommés $I_{to,f}$ (f signifiant « fast » ou rapide) et $I_{to,s}$ (s signifiant « slow » ou lent). Ils se distinguent par les gènes Kv4.2/4.3 ou Kv1.4 codant pour la sous-unité principale des canaux de $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$ respectivement, ainsi que par la constante de décroissance du courant qui est d'environ 20 ms pour Kv4.2/4.3 et de 100-200 ms pour Kv1.4 [59]. Le courant $I_{to,f}$ a été caractérisé dans les cardiomyocytes ventriculaires de nombreuses espèces dont l'humain [49, 60], la souris [61, 62] et le rat [57, 63]. Chez la souris, Eghbali et al. [21] ont aussi démontré que la diminution de I_{to} caractérisant la gestation passe par une régulation de l'expression des canaux puisque l'expression de l'ARNm et de la protéine Kv4.3 sont significativement réduites.

4.3.3.2 Courant potassique soutenu

Après l'inactivation rapide du courant I_{to} , un autre courant sortant est toujours présent, le courant I_{sus} , (sus signifiant «sustained», soutenu). I_{sus} permet de diminuer la composante initiale du plateau et l'amplitude de sa composante tardive [57, 64]. I_{sus} s'active rapidement à des potentiels similaires à ceux d' I_{to} , mais ne s'inactive pas pendant le potentiel d'action [37]. De ce fait, il constitue un courant de maintien [64]. La sous-unité principale du canal de I_{sus} est Kv1.5 dans le cœur de rat [37, 65]. Chez l'humain, dans le cœur non hypertrophié, Kv1.5 est la sous-unité principale du canal de I_{Kur} (ur signifiant «ultra-rapide», très rapide). L'ARNm de Kv1.5 est présent dans les oreillettes et les ventricules [65]. Cependant, l'expression de la protéine Kv1.5 est plus abondante dans les oreillettes et le courant I_{Kur} a été mesuré uniquement dans les oreillettes [65-67].

Peu d'études se sont intéressées aux altérations du courant I_{sus} lors de l'hypertrophie pathologique. Celles qui l'ont fait n'ont pas démontré de changements significatifs de ce courant [68, 69]. Notre intérêt pour le courant I_{sus} vient du fait que l'isoforme humaine de Kv1.5 peut être diminuée par des inhibiteurs du récepteur aux minéralocorticoïdes [70]. Or, cette voie de régulation hormonale est celle que nous avons privilégiée pour l'étude du remodelage cardiaque lors de la gestation (cf. section 8 Régulation hormonale). Ainsi, il nous paraissait intéressant de voir si une telle régulation se produisait lors de la gestation chez la rate. A l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré de changements du courant I_{sus} dans le cœur lors de la gestation.

4.3.3.3 Courant potassique à rectification entrante

Le courant entrant I_{K1} joue un rôle important dans la stabilité du potentiel de repos des cellules excitables. Ces canaux médient un flux réduit de courant sortant à des potentiels plus positifs que son potentiel d'inversion, ce qui permet le développement de la phase de plateau du PA [71] et établit le seuil d'excitabilité des courants dépolarisants [72]. La conductance du courant sortant diminue progressivement quand le potentiel membranaire devient plus positif que E_K [73]. De plus, les courants entrants I_{K1} contribuent aussi à la phase finale de repolarisation du potentiel d'action à cause de la conductance positive, entre -70 et -40 mV [74]. Cependant, quand la cellule devient dépolarisée, les canaux qui génèrent I_{K1} ont une conductance sortante plus faible que la conductance entrante, le potentiel de membrane peut alors changer.

Le courant I_{K1} peut être inhibé par l'ion Ba^{2+} [75]. Les situations cardiaques pathologiques sont associées à la diminution de I_{K1} [76-79]. De même que pour I_{sus} , il n'y a pas de données sur les modifications du courant I_{K1} dans le cœur lors de la grossesse.

5 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES CARDIOMYOCYTES

Afin de répondre aux besoins de l'organisme, la majorité des réactions chimiques se produisant dans les cellules ont pour objectif de libérer de l'énergie à partir des aliments. Les aliments sont en effet composés de sucres, graisses et protéines qui peuvent être oxydés pour produire l'énergie. Le couplage entre les réactions chimiques productrices d'énergie et les fonctions physiologiques de l'organisme est assuré grâce à des enzymes et des systèmes de transfert d'énergie [80].

Les acides gras à longue chaîne (AGCL) circulants et le glucose sont les principales sources de production d'énergie dans le cœur. Dans les conditions physiologiques, environ 60-70% de l'ATP nécessaire pour une activité contractile adéquate du cœur est produit par l'oxydation des AGCL dans la mitochondrie [81]. Le reste de l'ATP est généré par l'oxydation des carbohydrates, essentiellement le glucose. Selon la disponibilité du substrat, le cœur adapte son taux d'oxydation du glucose et celui des AGCL, un effet connu

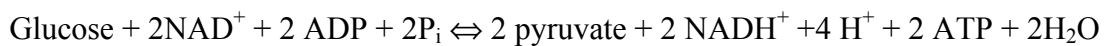
sous le nom cycle glucose/acides gras ou encore cycle de Randle [82]. Ainsi, lorsque les AGCL sont plus abondants dans la circulation, leur taux d'oxydation augmente, tandis que celui du glucose est diminué [83]. A l'opposé, la réduction du métabolisme des AGCL induite soit par une diminution de leur niveau plasmatique soit par une diminution de leur oxydation dans la mitochondrie conduit à une augmentation de l'oxydation du pyruvate, substrat issu de la glycolyse [84]. De ce fait, la disponibilité du substrat est un facteur déterminant de l'utilisation préférentielle du substrat : glucose vs AGCL.

5.1 Métabolisme du glucose

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof est la principale voie métabolique d'utilisation du glucose. Cette transformation a lieu dans le cytosol de la cellule [85]. La glycolyse correspond à une série de dix réactions catalysées par des enzymes qui dégradent une molécule de glucose (comprenant six carbones) en deux molécules de pyruvate (comprenant trois carbones) (Figure 8).

Bien que l'objectif de la glycolyse soit la formation d'ATP, il faut noter que deux molécules d'ATP sont utilisées au début de la glycolyse. On parle de phase de préparation, qui correspond aux réactions 1 à 5 (Figure 8). Dans la deuxième phase, (réactions 6 à 10), quatre molécules d'ATP sont produites, remboursant l'énergie utilisée lors de la première phase. On parle de phase productrice d'énergie [85].

La réaction globale de la glycolyse est la suivante :



5.2 Métabolisme du pyruvate

5.2.1 En condition aérobie

5.2.1.1 Carboxylation du pyruvate

Dans les conditions physiologiques, la majorité du pyruvate est généré à l'intérieur des cellules par la glycolyse ou par l'oxydation du lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) catalysant une réaction réversible. Le pyruvate intracellulaire peut aussi provenir de la circulation [86] (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Il sera alors transporté dans

la cellule par des symporteurs qui assurent leur co-transport avec les ions H^+ et qui sont nommés transporteurs de monocarboxylates (MCT «monocarboxylate transporters»). Les isoformes MCT1, 2 et 4 sont exprimées dans les cardiomyocytes chez le rat [87]. Ainsi, en condition aérobie, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie. Dans la matrice de la mitochondrie, il se lie à la coenzyme A et est transformé par la pyruvate déshydrogénase en acétyl coenzyme A (acétyl-CoA). L'oxydation complète de l'acétyl-CoA est réalisée dans le cycle de Krebs.

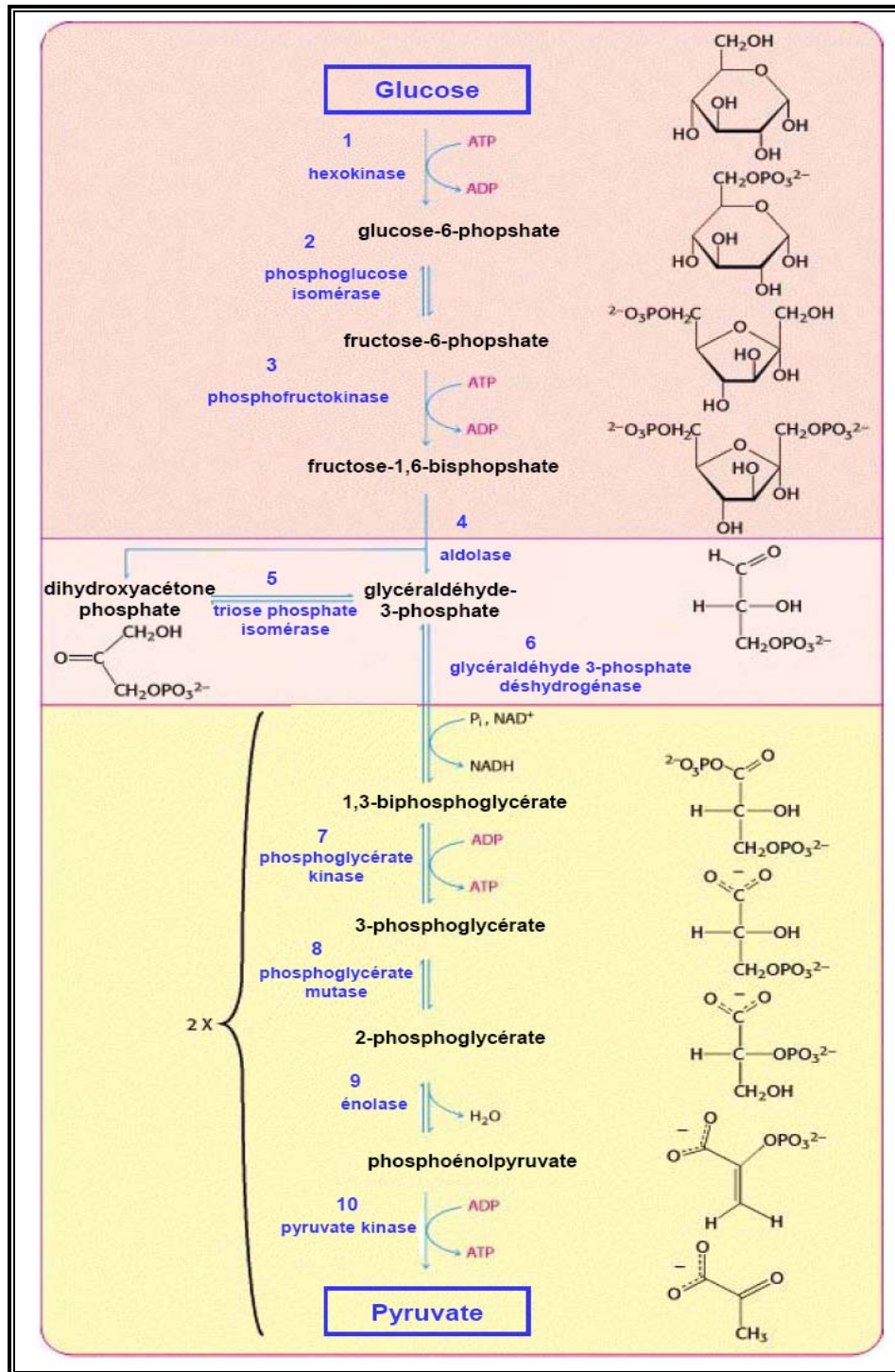


Figure 8. Réactions chimiques de la glycolyse

La voie de la glycolyse peut être divisée en trois parties représentées par les trois couleurs du fond: (1) le glucose est capturé par l'ajout du groupement phosphate puis déstabilisé (2) deux composées à trois atomes de carbones sont formés à partir du clivage du fructose et (3) les molécules d'ATP sont produites. L'étape finale de la glycolyse est la formation de pyruvate, intermédiaire métabolique important. Adapté de Berg et al.[88].

5.2.1.2 *Cycle de Krebs*

La dégradation de l'acétyl-CoA se poursuit dans le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique dans la matrice mitochondriale. Cette séquence de réactions va transformer l'acétyl-CoA en CO_2 et ions H^+ . Les ions H^+ libérés sont ensuite oxydés et par conséquent des molécules d'ATP sont formées. Ce cycle permet la formation de coenzymes réduits, NADH et FADH_2 , qui seront réoxydés dans la chaîne respiratoire.

5.2.1.3 *Phosphorylation oxydative*

La phosphorylation oxydative est une séquence de réactions ayant lieu dans la mitochondrie et aboutissant à l'oxydation de l'hydrogène. Les composés réduits, NADH et FADH_2 , formés au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs sont «riches en énergie». Ils vont être réoxydés par perte d'ions H^+ , ce dernier se dissociant en proton et électron. Ces électrons à haut potentiel d'énergie seront ensuite transférés à la chaîne respiratoire.

5.2.1.4 *Chaîne respiratoire*

La chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble de cinq complexes enzymatiques situés dans la membrane interne mitochondriale. Chacun de ces complexes est formé de plusieurs sous-unités protéiques :

- complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase,
- complexe II : succinate-ubiquinone oxydoréductase,
- complexe III : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase
- complexe IV : cytochrome c oxydase. Il contient le site de liaison de l'oxygène

Cet ensemble de complexes est aussi nommé chaîne de transfert d'électrons. Les électrons sont transférés séquentiellement à chacun des complexes qui passent par un état réduit lorsqu'ils acceptent un électron puis un état oxydé lorsque les électrons sont transférés au complexe suivant.

Cette chaîne de transport contient également:

- le coenzyme Q qui diffuse dans la membrane interne et établit une navette des électrons du complexe I au III.

- le cytochrome c, situé dans l'espace intermembranaire et établit une navette des électrons entre les complexes III et IV.

La réoxydation des composés réduits a lieu au niveau du complexe I, pour le NADH et du complexe II pour le FADH₂. Le flux d'électrons est initié au niveau de ces complexes. La direction du flux le long de la chaîne respiratoire est déterminée par la capacité des composants des complexes à «perdre» ou à «gagner» des électrons. Cette faculté s'exprime par un paramètre nommé potentiel d'oxydoréduction. Les électrons vont à partir des molécules possédant un faible potentiel d'oxydoréduction se déplacer vers celles ayant un potentiel plus élevé. Ainsi à partir du complexe I et II, les électrons sont transférés au coenzyme Q qui sera réduit. En s'oxydant, il les transmet au complexe III. Enfin, le complexe III transfère ses électrons au complexe IV par l'intermédiaire du cytochrome c et l'accepteur final est l'oxygène qui sera réduit en eau. Au cours de la capture des électrons par les complexes I, III et IV, il y a simultanément translocation des protons vers l'espace intermembranaire.

5.2.1.5 *Transfert d'électrons et production d'ATP*

En conditions anaérobiques, l'énergie perdue par les électrons à chaque transfert sur un autre transporteur permet l'éjection de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La membrane étant imperméable aux protons, ils seront dirigés vers une protéine, l'ATP synthase qui forme un canal dans la membrane interne. Elle utilise l'énergie du gradient en catalysant la rentrée des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice et c'est au cours de ce retour de protons que l'ATP synthétase transforme l'ADP en ATP.

5.2.1.6 *La navette créatine-phosphate*

Le muscle cardiaque utilise environ 1mM d'ATP par seconde, par conséquent il a besoin d'un système efficace de transfert d'énergie: il utilise la navette créatine-phosphate (Pcr). La Pcr est formée par la phosphocréatine kinase. Cette enzyme est localisée dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Elle a la particularité d'utiliser l'ATP produit par la respiration pour former, en présence de créatine, de la Pcr qui est ensuite transportée dans le cytosol. Dans ce compartiment, la PCr et l'ADP seront convertis en ATP et créatine

grâce à la phosphocréatine kinase cytosolique. Cet ATP sera de nouveau utilisé par la créatine kinase pour reformer de la PCr. Cette succession de couplage va permettre un transfert rapide d'ATP vers l'appareil contractile de la cellule [89].

Tableau I. Bilan de la glycolyse

Réactions	Molécules d'ATP formées
Glycolyse aérobie : 1 glucose \rightarrow 2 acides pyruviques	6
Décarboxylation oxydative : 2 acides pyruviques \rightarrow 2 acétyl-CoA + 2CO ₂	8
2 tours de cycle de Krebs : 2 acétyl-CoA \rightarrow 4 CO ₂	24
Bilan total pour 1 molécule de glucose	38

5.2.2 En condition anaérobie

La majorité de la quantité d'ATP consommée par le myocarde provient du métabolisme oxydatif des AGCL et du pyruvate issu de la glycolyse qui a lieu dans la mitochondrie comme cela est décrit dans les sections suivantes. La glycolyse anaérobie produit 10% de cette énergie [90]. Pendant une activité physique intense, lorsque la demande en ATP est plus importante et que l'oxygène est en quantité insuffisante, la LDH catalyse la transformation du pyruvate en lactate. Cela permettra la production de deux molécules d'ATP [85]. Lorsque l'oxygène est à nouveau disponible, le lactate pourra aussi être réoxydé en pyruvate. Le lactate peut aussi être transporté en-dehors de la cellule par les MCT. Il est ensuite transféré au foie par la circulation sanguine, où il sera réoxydé en pyruvate par la LDH. Ainsi, il contribuera à la synthèse du glucose par la gluconéogenèse. Cette voie métabolique est nommée le cycle de Cori [91].

5.3 Métabolisme des lipides

Les acides gras circulants proviennent de l'hydrolyse des triglycérides contenus essentiellement dans le tissu adipeux, les VLDL (Very Low Density Lipoproteins) circulants (d'origine hépatique) et les chylomicrons.

5.3.1 Transport transmembranaire des AGCL dans les cardiomyocytes

De par leur nature hydrophobe, on pourrait penser que les AGCL diffusent facilement à travers la membrane des cardiomyocytes. Cependant, la diffusion passive ne contribue qu'à une petite partie de l'entrée des AGCL dans les cellules cardiaques [92]. Ainsi, différentes études ont apporté la preuve d'une diffusion facilitée des AGCL dans le cœur [93, 94]. Les protéines proposées comme transporteurs des AGCL sont la CD36, la protéine de liaison aux acides gras située dans la membrane plasmique (PM-FABP : «plasma membrane-associated fatty acid binding») et les protéines de transport des acides gras (FATP : «fatty acid transport protein»). Dans le cœur, CD36 semble être responsable de l'entrée principale des AGCL, cependant son mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé. Des études permettent de penser que PM-FABP et CD36 agissent ensemble pour former un système de concentration des AGCL au niveau de la membrane [95]. De plus, la proximité de CD36 [96] avec les FATP permet de suggérer le rôle de ces dernières dans l'accélération du transport transmembranaire des AGCL.

Dans le cytoplasme, les AGCL sont liés par l'isoforme cardiaque de la FABP (H-FABP : *heart FABP*) pour être transportés à la membrane externe mitochondriale [92]. Là, ils seront convertis en acyl-CoA (c'est-à-dire un acide gras sur lequel est attaché un groupe CoA) par l'acyl-CoA synthétase. Cette étape consomme deux molécules d'ATP.

L'acyl-CoA sera transporté vers la matrice pour être dégradé par la β -oxydation. Dans le cœur, la majorité des AGCL est destinée à la β -oxydation et une petite quantité est emmagasinée sous forme de gouttelettes lipidiques.

5.3.2 Transport de l'acyl-CoA dans la mitochondrie

Il s'effectue en plusieurs étapes :

- 1) l'acyl-CoA traverse la membrane externe en empruntant le pore VDAC «voltage-dependant anion channel».
- 2) dans l'espace intermembranaire, la carnitine-palmitoyltransférase I (CPT-I), liée à la membrane externe, permet le remplacement du groupe CoA par un groupe carnitine ce qui aboutit à la formation d'acylcarnitine.
- 3) l'acylcarnitine est transportée dans la matrice grâce à la carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) et qui l'échange avec la carnitine libre de la matrice.
- 4) dans la matrice, la carnitine-palmitoyltransférase II (CPT-II), liée à la membrane interne, permet de remplacer la carnitine par un groupe CoA de l'acylcarnitine ce qui forme à nouveau l'acyl-CoA initialement présent dans le cytosol.

5.3.3 Dégradation de l'acyl-CoA dans la matrice : la β -oxydation

La β -oxydation ou hélice de Lynen est l'ensemble des réactions qui permettent d'oxyder partiellement les acides gras en unités acétyl-CoA dans le but de libérer des coenzymes réduits afin de synthétiser de l'ATP [97].

Dans la matrice, cet acyl-CoA sera dégradé par les enzymes de la β -oxydation. Cette dégradation débute par la coupure du segment terminal $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ de l'acyl-CoA. Ce fragment est rapidement converti en acétyl-CoA. Le reste de l'acyl-CoA subit alors la même réaction. Cette succession de dégradation permet la formation d'acétyl-CoA mais aussi celle des donneurs d'électrons, NADH-H^+ et un FADH_2 et des molécules d'ATP. Ainsi, à chaque cycle il y a formation de :

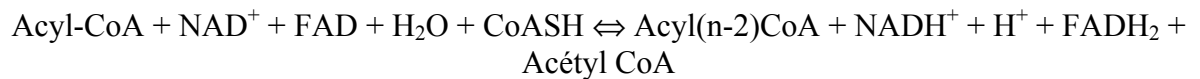
- 1 acyl CoA raccourci de 2 carbones
- 1 acétyl CoA qui génère 12 ATP
- 1 FADH_2 qui génère 2 ATP
- 1 NADH qui génère 3 ATP

Le dernier cycle fait néanmoins exception avec la formation de deux acétyl-CoA [97].

Les acétylCoA produits par la β -oxydation entrent dans le cycle de Krebs tandis que les FADH₂ et les NADH sont réoxydés dans la chaîne respiratoire comme cela a été décrit dans la section Métabolisme du glucose.

Le bilan de la β -oxydation

L'équation d'un tour d'hélice :



Ainsi, l'ensemble des réactions de la β -oxydation à partir du palmitate (16 carbones) donne après 7 tours [(16/2)-1=7]

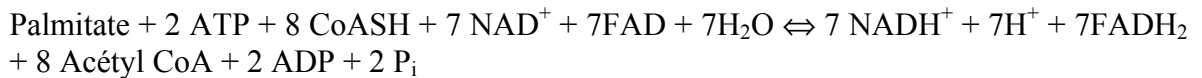


Tableau II. Bilan de la β -oxydation du palmitate.

Réactions	Molécules d'ATP formées
Palmitate \rightarrow palmitoyl-CoA	-2
Tours réguliers d'hélice	102 (17x6)
Dernier tour	29
Bilan total pour 1 molécule de palmitate	129

En considérant le nombre de molécules d'ATP formées et celles qui ont été consommées, il est évident que les acides gras représentent une meilleure source d'énergie pour le cœur que le glucose. Cependant, les changements hémodynamiques physiologiques ou pathologiques induisant une hypertrophie du cœur vont modifier son métabolisme. Pour comprendre la particularité du contexte métabolique dans lequel se trouve le cœur lors de la grossesse, il est nécessaire connaître les changements métaboliques se produisant lors de la grossesse.

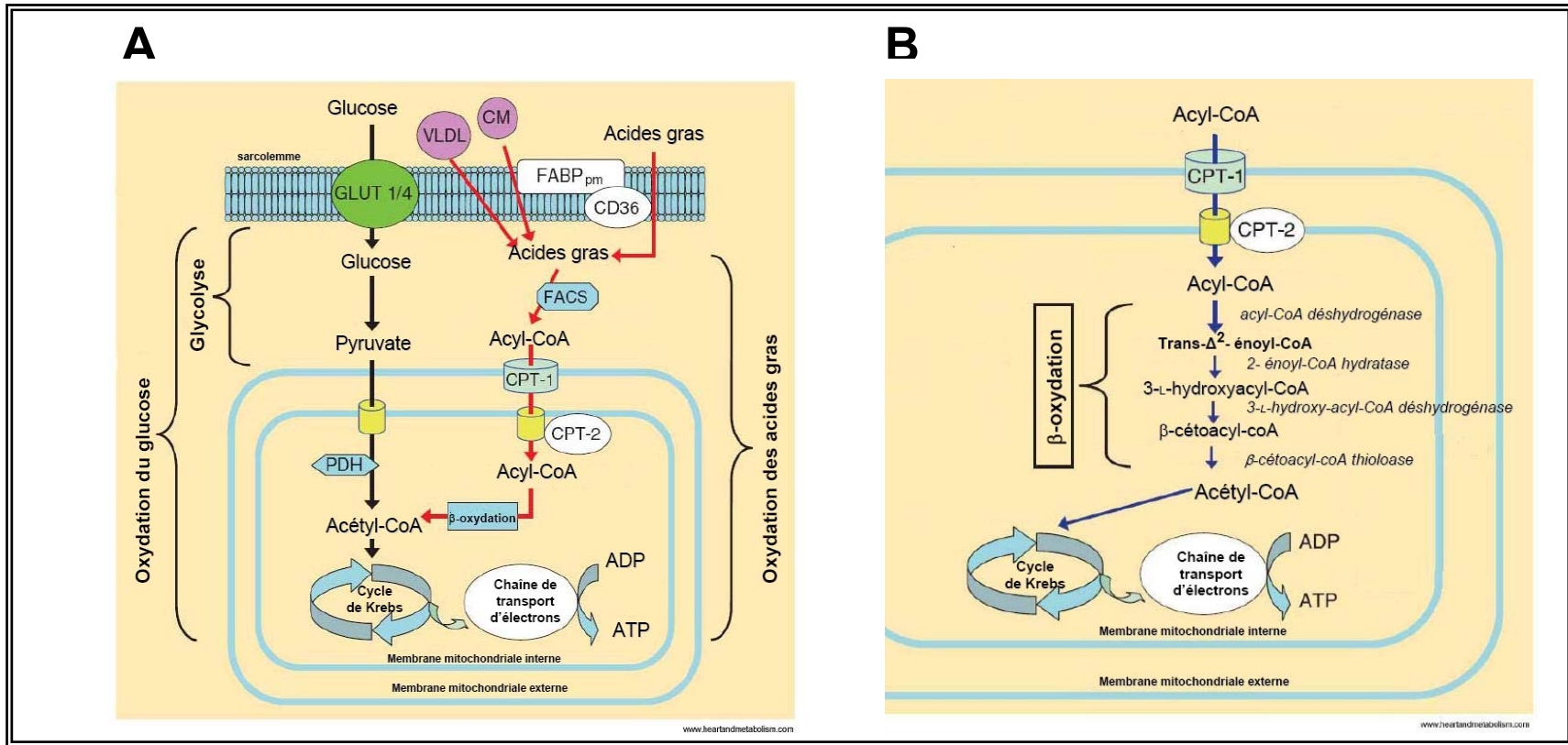


Figure 9. Métabolisme des acides gras

A. Le catabolisme des acides gras est représenté à droite. La voie de la glycolyse (détaillée dans la section précédente) est représentée dans la partie gauche de la figure. Les parties communes aux deux voies métaboliques, sont le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons. Les acides entrent dans la cellule par diffusion passive ou par l'intermédiaire de FABP_{pm} et CD36. Les acides gras sont ensuite estérifiés par la FACS et acheminés dans la mitochondrie par les CPT 1 et 2, où ils seront oxydés en acétyl-CoA. B. Etapes de la β -oxydation dans la mitochondrie. CD36 : translocase des acides gras; CM : chylomicrons ; FABP_{pm} «fatty acid binding protein» protéines de liaison des acides gras; FACS «fatty acyl CoA synthase» : acyl CoA synthétase; GLUT1/4, «glucose transporters» : transporteurs de glucose 1 et 4; PDH : pyruvate déshydrogénase. CPT-1/CPT-2 : carnitine-palmitoyl-transférase 1 et 2 ; VLDL «Very Low Density Lipoproteins»: lipoprotéines de faible densité. fatty acid binding protein (FABP_{pm}) or CD36/fatty acid translocase. Figures adaptées de [98]. Permission du journal Heart and Metabolism (cf. heartandmetabolism.com).

6 CHANGEMENTS MÉTABOLIQUES LORS DE LA GROSSESSE

La croissance du fœtus nécessite un apport continu en nutriments. Du point de vue métabolique, il existe deux phases pendant la gestation. Lors de la première phase, tandis que la croissance fœtale est limitée, l'organisme maternel emmagasine une grande partie des nutriments ingérés. Ceci, en étant accompagné d'hyperphagie, entraîne une accumulation de réserves de gras. Il s'agit de la phase anabolique, qui est observée chez la femme [99] et la rate [100]. Lors du dernier trimestre de la gestation, la croissance fœtale est rapide, ce qui accroît le transfert de nutriments à travers le placenta. La mère passe alors dans une phase catabolique.

6.1 Métabolisme du glucose pendant la gestation

Le glucose est une source d'énergie essentielle pour le fœtus. En effet, l'absence de gluconéogénèse (synthèse du glucose à partir de précurseurs non-glucidiques) chez le fœtus implique qu'il doit obtenir ce nutriment du plasma maternel [101]. De ce fait, le taux de transfert de glucose vers le fœtus ainsi que la captation du glucose par le fœtus sont directement dépendants de la concentration de glucose sanguin maternel. Le glucose est acheminé de la circulation maternelle vers le fœtus via le placenta.

6.2 Transport du glucose vers le placenta

Durant la grossesse, le fœtus lui-même n'est pas en contact direct avec les tissus maternels. La fonction fondamentale du placenta est de permettre les échanges. Dans l'espèce humaine, ces échanges impliquent divers mécanismes, et sont favorisés par la présence de nombreuses microvillosités à la surface d'une couche cellulaire du placenta nommée syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste forme avec l'espace intervilloux sanguin maternel un des sites d'interaction fœto-maternels. Il présente notamment de nombreux transporteurs de glucose. GLUT-1 est l'isoforme principale impliquée dans le transport transplacentaire du glucose. Il est présent au niveau des microvillosités et de la membrane basale du syncytiotrophoblaste. GLUT-1 est fortement exprimé tout au long de la grossesse [102] contrairement à GLUT-3, GLUT-4 et GLUT-12 qui sont exprimés seulement au début de la grossesse dans le syncytiotrophoblaste [103, 104]. En fin de

grossesse, ces trois isoformes sont exprimées dans les cellules endothéliales et stromales [103, 105, 106].

6.3 Utilisation du glucose maternel

Quantitativement le glucose est le substrat le plus important traversant le placenta [107]. Dans les conditions normales, 60-70% du glucose maternel est transféré vers le placenta. En raison du drainage constant du glucose vers le placenta, les mères ont tendance à développer une hypoglycémie en phase postprandiale [108]. Cette hypoglycémie est évidemment plus manifeste à jeun, comme cela a été observé chez la femme et la rate [109, 110]. Afin que le fœtus ne soit pas dépourvu de glucose, le taux de gluconéogenèse est augmenté chez la femme [111] ainsi que chez la rate [109, 112] à jeun. Parallèlement à cette baisse dans la glycémie, la grossesse est caractérisée par une résistance à l'insuline. En effet, les études de tolérance au glucose démontrent une progression de la résistance à l'insuline au cours de la grossesse [113]. En comparaison avec des femmes qui ne sont pas gravides, la sensibilité à l'insuline est réduite 50-70% lors de la grossesse [114]. Ce mécanisme permettrait d'augmenter la disponibilité du glucose pour le fœtus.

Par ailleurs, le fœtus produit du lactate à partir du glucose maternel [115]. Contrairement à la période post-natale, le lactate peut être métabolisé par le fœtus en conditions aérobiques, ce qui constitue une autre source d'énergie. Le lactate est transféré vers la circulation maternelle ($\approx 1/3$) et vers le placenta ($\approx 2/3$) qui le métabolise en partie. De ce fait, le niveau de glucose maternel dépend aussi de métabolisme fœtal. Plusieurs isoformes des MCT assurant le transport du lactate ont été identifiées dans le placenta humain mais aussi celui de la rate [116, 117]. Cependant, la densité de l'isoforme MCT4 est plus importante du côté maternel de la membrane placentaire [117].

7 MÉTABOLISME ET HYPERTROPHIE CARDIAQUE

Le profil d'utilisation des substrats ou phénotype métabolique est affecté par l'hypertrophie cardiaque qu'elle soit pathologique ou physiologique.

7.1 Hypertrophie pathologique

Lors de l'hypertrophie pathologique, on observe une modification du phénotype métabolique en faveur de l'utilisation du glucose. En effet, les études réalisées chez le rat démontrent une diminution de la consommation des AGCL [118] accompagnée d'une diminution de leur transport [119] et des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique [120-122]. Les altérations du métabolisme lipidique sont également observées chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque [123, 124]

7.2 Hypertrophie physiologique

L'hypertrophie induite par l'exercice notamment l'exercice d'endurance est une réponse adaptative à la surcharge volumique. L'exercice mène aussi à des modifications significatives du métabolisme du glucose et des AGCL. Cependant, le phénotype métabolique de l'hypertrophie physiologique se distingue de celui observé lors de l'hypertrophie pathologique. En effet, chez la rate soumise à un exercice d'endurance, l'oxydation des AGCL est augmentée. L'oxydation du glucose est aussi augmentée, tandis que le taux de glycolyse diminue, par conséquent la quantité de glucose oxydé dans le cœur est plus importante dans un cœur hypertrophié [125]. En revanche, l'expression d'enzymes contribuant au catabolisme que ce soit au niveau du transport ou de l'utilisation de ces substrats n'était pas affectée par l'exercice [125].

7.3 Métabolisme cardiaque lors de l'hypertrophie induite par la grossesse

Comme cela a été mentionné auparavant la disponibilité du substrat joue un rôle important dans le choix du substrat. Ainsi, les modifications métaboliques qui se produisent lors de la grossesse influencent le fonctionnement du cœur.

Le métabolisme maternel est modifié de sorte que la captation du glucose par les tissus maternels soit réduite pour favoriser la nutrition du fœtus. En effet, Holness et al. ont démontré chez la rate gestante en conditions postprandiales que la consommation du glucose par le cœur et les muscles squelettiques est significativement réduite [108]. Par ailleurs, l'augmentation de la résistance à l'insuline pourrait contribuer à cette adaptation

via son rôle dans la translocation membranaire du transporteur de glucose GLUT-4 dans les cardiomyocytes.

Dans l'étude de Holness et al. [108], une augmentation de la concentration plasmatique des substrats lipidiques a aussi été mesurée ainsi qu'une diminution de celle du glucose. De ce fait, les auteurs supposent que le cœur utilise les substrats lipidiques comme source d'énergie en raison de leur abondance. Cependant, l'étude de Rimbaud et al [126] ébranle cette hypothèse. En effet, dans cette étude réalisée chez la rate gestante, l'oxydation des AGCL n'est pas augmentée et aurait tendance à diminuer. De plus, l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des AGCL dans les cardiomyocytes est diminuée. Plus précisément, la diminution a été mesurée au niveau de l'ARNm de la CPT-I, impliquée dans le transport des AGCL dans la mitochondrie et celui de l'acyl-CoA déshydrogénase d'acides gras à chaîne moyenne, catalysant une étape importante de la β -oxydation [126]. Il semblerait que le fonctionnement du cœur maternel ne puisse pas reposer uniquement sur l'utilisation des lipides lors de la gestation.

Il apparaît ainsi que le phénotype métabolique de la gestation ne correspond pas à celui de l'hypertrophie pathologique ou physiologique induite par l'exercice, ce qui atteste de la particularité de cette situation physiologique. Le choix des substrats du cœur pendant la gestation fait partie des problématiques traitées dans nos travaux.

8 RÉGULATION HORMONALE : RÉCEPTEUR AUX MINÉRALOCORTICOÏDES

Différents systèmes hormonaux sont influencés par la grossesse. Bien que le rôle de ces modifications hormonales ne soit pas entièrement compris, il est reconnu qu'elles sont impliquées dans différents aspects de la grossesse : le maintien de la grossesse, la croissance et le développement du fœtus, le déclenchement de l'accouchement et la lactation. Le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM) est connu pour son implication dans le remodelage cardiaque lors de situations pathologiques. Cependant, son rôle dans le remodelage physiologique de la grossesse n'est pas connu. Ainsi, il nous paraissait

intéressant d'évaluer cette voie de régulation lors de remodelage cardiaque induit par la grossesse.

8.1 Rôle physiologique du récepteur aux minéralocorticoïdes

Le récepteur aux minéralocorticoïdes appartient à la famille des récepteurs d'hormones stéroïdes/thyroïdes/acide rétinoïque [127]. Le rôle physiologique du RM est de médier les effets du minéralocorticoïde, aldostérone. Cette hormone est l'effecteur endocrinien final du SRAA et est produite dans la zone glomérulée du cortex des surrénales. L'aldostérone agit au niveau des reins pour induire la réabsorption du Na^+ et de l'eau et l'excrétion du K^+ [128]. Suite à la liaison de son ligand dans le cytoplasme, il y a translation du complexe RM-ligand vers le noyau. Le complexe va se lier à des sites de liaison de l'ADN appelés éléments de réponse aux stéroïdes, il agira alors comme un facteur de transcription et pourra activer ou réprimer des gènes-cibles [129] afin de réguler l'homéostasie du Na^+ .

Cependant, l'expression du RM a aussi été détectée dans différents tissus non épithéliaux dont le cœur [130, 131]. Le RM a été localisé à l'échelle cellulaire, dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les vaisseaux, chez le lapin [132]. Il a aussi été localisé dans le cœur de l'humain et de rat [130, 133]. C'est cette expression des RM dans les différents tissus qui a suggéré d'autres rôles pour ce récepteur.

8.2 Rôle des RM dans la grossesse

La grossesse est caractérisée par une augmentation du volume plasmatique et extracellulaire qui est accompagnée d'une augmentation de la concentration plasmatique d'aldostérone [19, 134-136]. A l'opposé, dans le cas de l'hypertension gestationnelle et en particulier la prééclampsie, la concentration plasmatique d'aldostérone est diminuée [134, 136-138]. Ainsi, par comparaison entre la gestation normale et et les conditions d'hypertension, Escher et al. ont établi une corrélation entre l'aldostérone et la taille des nouveaux-nés chez la femme. L'hypothèse serait que l'aldostérone permettrait d'assurer l'expansion volumique qui favoriserait le développement du fœtus. Dans cette étude, l'hypothèse d'une contribution génétique au développement de la prééclampsie est aussi avancée [139]. En effet, les polymorphismes du gène de l'aldostérone synthétase

conduisant à un gain de la fonction de cette dernière sont présents chez les femmes normotendues tandis que des mutations sont présentes chez les femmes prééclamptiques [139, 140]. Cela aurait pour conséquence de diminuer la production d'aldostérone. Néanmoins, le rôle de l'aldostérone comme la cause ou la conséquence de l'expansion plasmatique lors de la grossesse est encore un sujet de débat dans la communauté scientifique.

8.3 Rôle des RM dans le cœur

Deux études cliniques importantes ont apporté la preuve du rôle du RM dans le remodelage du cœur dans les conditions pathologiques «Randomized Aldactone Evaluation Study» (RALES) [134] et «Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study» (EPHESUS) [135]. Ces deux études ont démontré que l'ajout des inhibiteurs du RM spironolactone et éplérénone, au traitement de patient atteints d'insuffisance cardiaque permettait de réduire la morbidité et la mortalité. Cependant, il est important de noter que le taux d'aldostérone de ces patients n'était pas élevé, ce qui vient remettre en question l'activation du RM par l'aldostérone dans le cœur.

En effet, le RM a la particularité de posséder aussi une affinité importante pour les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'humain et la corticostérone chez le rat) qui sont environ 1000 fois plus abondants que l'aldostérone dans la circulation chez ces deux espèces [136, 137]. D'ailleurs cette différence est accentuée par la grossesse. En fin de grossesse, les taux circulants des glucocorticoïdes sont d'environ 1146 nM pour la femme et 1.3 nM pour la rate *vs* ceux de l'aldostérone qui sont d'environ 1.44 nM pour la femme et 0.002 nM pour la rate [136, 137].

La liaison sélective de l'aldostérone au RM est assurée par l'expression de l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2), qui convertit les glucocorticoïdes en produits cétoniques qui ne peuvent se lier aux RM [138, 139]. Cependant, l'expression de la 11 β -HSD2 est faible dans le cœur [140]. Par ailleurs, les glucocorticoïdes agissent plutôt en tant qu'inhibiteurs du RM. Ainsi, les RM dans le cœur sont censés être occupés et inhibés par les glucocorticoïdes [141]. Un nouveau mécanisme d'activation a été proposé par Funder : le complexe glucocorticoïdes-RM serait activé par

l'état oxydé de la cellule caractérisé par des niveaux faibles de NADH ou la présence d'espèces réactives de l'oxygène [142].

Le rôle du RM dans le remodelage physiologique de la grossesse n'a pas été évalué. Cependant, comme cela est démontré dans le premier article de cette thèse, chez les rates gestantes le rapport lactate/pyruvate dans le plasma est augmenté [143], ce qui indique un état oxydé. Cela nous a amenés à la possibilité que le RM pourrait être activé par cet état oxydé et jouer un rôle dans le remodelage induit par la grossesse. L'implication du RM dans le remodelage morphologique et dans l'adaptation métabolique a été étudiée dans le deuxième article de cette thèse.

L'hypertrophie du ventricule est aussi associée à des changements progressifs de ses propriétés électriques [144] que l'on désigne par le remodelage électrique. Celui-ci se manifeste chez les femmes enceintes, par une prolongation de l'intervalle QTc sur l'ECG [46]. Chez la souris gestante, la prolongation de l'intervalle QTc a été associée à la diminution des courants potassiques I_{to} [21], cette dernière étant attribuée à l'augmentation des œstrogènes lors de la gestation. L'implication du RM dans le remodelage électrique a aussi été démontrée chez le rat mais uniquement dans les conditions d'hypertrophie pathologique : l'inhibition du RM empêche la diminution de la densité des courants I_{to} induite par l'hypertrophie [145]. Ainsi, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait avoir le RM dans le remodelage de la repolarisation lors de la gestation, ce qui est l'objet de l'étude présentée dans le troisième article de cette thèse.

9 HYPERTENSION GESTATIONNELLE

9.1 Définition

L'hypertension gestationnelle (HG) est l'affection la plus fréquente de la grossesse. L'étiologie de l'HG reste en grande partie à découvrir. La définition de l'hypertension au cours de la grossesse n'est pas aussi évidente qu'en d'autres circonstances puisque la pression artérielle baisse au cours de la grossesse. Il existe différents types d'hypertension gestationnelle et leur classification est basée sur deux symptômes principaux, hypertension et protéinurie. Selon les normes du National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP), la valeur seuil de l'hypertension est une pression artérielle supérieure ou égale à 140 mmHg (systole)/90 mmHg (diastole). La protéinurie est considérée comme significative si elle excède 0.3 g dans les urines de 24 h. De plus, l'hypertension est qualifiée de modérée si la pression artérielle supérieure ou égale à 140-180 mmHg en systole et 90-100 mmHg en diastole. L'hypertension est dite sévère si la pression artérielle supérieure à 180 mmHg en systole et à 100 mmHg en diastole [146].

- **Pré-éclampsie / éclampsie**

La prééclampsie-éclampsie apparaît le plus souvent après la 20^e semaine et associe une pression artérielle et protéinurie. Sa forme sévère est caractérisée par une valeur de pression artérielle de 160 mmHg / 110 mmHg ou plus et une protéinurie de 5 g/24 h ou plus. L'éclampsie consiste en la survenue, chez une femme prééclamptique ou non, de convulsions. Elle se produit chez 0.5-4% des patientes pré-éclamptiques [147].

- **Pré-éclampsie surajoutée**

La pré-éclampsie surajoutée correspond à l'apparition d'une protéinurie significative chez une femme porteuse d'une hypertension gestationnelle ou chronique [147].

- **Hypertension chronique**

L'hypertension est dite chronique quand elle est présente avant la grossesse, ou encore constatée avant la 20^e semaine de grossesse. Si une hypertension est constatée durant la

grossesse et ne disparaît pas en post-partum, elle fait aussi partie de cette catégorie. Un des risques majeurs de l'hypertension chronique est la pré-éclampsie

- **Hypertension gestationnelle ou gravidique**

Il s'agit d'une hypertension constatée pour la première fois après la 20^e semaine, sans protéinurie et qui retourne à sa valeur normale en post-partum. Puisque la protéinurie peut toujours apparaître secondairement, ce diagnostic ne peut être définitivement établi qu'en post-partum. L'hypertension gestationnelle survient dans 10-15% des grossesses. La morbidité maternelle est liée à la durée et la sévérité de l'hypertension. Dans environ 25% des cas, les femmes atteintes d'hypertension gestationnelle vont développer la prééclampsie surimposée [147].

- **Prééclampsie surajoutée**

La prééclampsie surajoutée correspond à l'apparition d'une protéinurie significative chez une femme porteuse d'une hypertension chronique [147].

Tableau III. Complications foeto-maternelles

Mère	Fœtus
Protéinurie : > 5 g/24 h	Retard voire arrêt de croissance intra-utérin
Oligurie : < 50 mL/24 h	
Céphalées ou troubles visuels	
Œdème pulmonaire	
Dysfonctionnement hépatique (syndrome HELLP «Hemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelet count»)	
Eclampsie	

La sévérité des complications nécessite très souvent de déclencher l'accouchement quelle que soit la période gestationnelle. Le fœtus se retrouve alors confronté aux complications liées à la prématurité [146].

9.2 Altérations hémodynamiques et changements fonctionnels du cœur

L'HG est associée à une adaptation hémodynamique inadéquate. Chez la femme, il a été démontré que lors de grossesses compliquées par l'HG la résistance vasculaire augmente [148]. De plus, l'HG est caractérisée par une expansion réduite du volume plasmatique [149], qui est en corrélation avec les altérations du SRAA qui sont aussi observées, notamment le niveau d'aldostérone est plus faible [150].

9.3 Modifications de la structure cardiaque

L'HG est une affection multi-systémique qui est aussi associée à des altérations d'organes-cibles tels que le cœur. Sur le plan fonctionnel, chez les femmes enceintes hypertendues, la fréquence cardiaque est diminuée. De plus, la fonction diastolique du cœur est modifiée. En effet, l'augmentation de la post-charge (en raison de la résistance vasculaire élevée) et l'altération du processus de relaxation semblent avoir un rôle dans la prolongation du temps de relaxation ventriculaire [151].

Sur le plan morphologique, trois types de remodelage ont été caractérisés lors de l'HG à partir de mesures échocardiographiques effectuées en mode M : le remodelage excentrique, similaire à celui observé lors de la grossesse normotendue et le remodelage et l'hypertrophie concentriques. Ces derniers se distinguent par l'index de masse du ventricule gauche (IMVG): $IMVG = MVG / \text{taille du patient}$ [148]. L'IMVG est inférieur à 50 dans le cas du remodelage ou supérieur à 50 dans le cas d'hypertrophie [148]. Lors de l'hypertrophie concentrique, la surcharge de pression augmente le stress sur la paroi au cours de la systole, conduisant à un ajout de sarcomères en parallèle et un épaississement de la paroi, ce qui entraîne une réduction du volume normal de la cavité. L'hypertrophie concentrique diffère donc de l'hypertrophie excentrique par le fait que l'augmentation de la masse du ventricule n'est pas associée à une dilatation proportionnelle de la cavité [28].

La mesure de la pression artérielle apparaît comme insuffisante pour établir un diagnostic précis et par conséquent un traitement adapté. En effet, parmi des patientes hypertendues ayant une pression artérielle similaire, certaines vont développer des complications et d'autres non [148]. Ainsi, l'information apportée par l'échocardiographie en mode M est un outil diagnostique intéressant. En effet, cela a permis d'établir une

corrélation entre les altérations de la géométrie du ventricule gauche et l'incidence de complications fœto-maternelles chez des patientes atteintes d'hypertension gestationnelle [148]. L'hypertrophie concentrique était associée aux complications les plus sévères: la protéinurie, l'accouchement prématuré, les complications associées à l'HG. Les études menées jusqu'à présent sur les cardiomyocytes isolés lors de l'HG portent seulement sur les cardiomyocytes fœtaux. Cependant, l'ensemble des observations cliniques mentionnées suggèrent que l'identification des altérations qui se produisent au niveau des cardiomyocytes serait un atout dans la prévention des complications propres à l'HG. Le remodelage des cardiomyocytes lors de l'HG a été étudié dans le premier article de cette thèse.

10 APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Dans cette section nous expliquons le choix des modèles et techniques utilisés lors de nos travaux.

10.1 Modèle animal

10.1.1 Gestation normale

Le modèle animal que nous avons choisi est la rate qui a été souvent utilisée pour l'étude de la grossesse car les changements hémodynamiques qui se produisent chez la rate gestante sont similaires à ceux observés chez la femme enceinte (cf. section 2. Adaptation hémodynamiques). De plus, la gestation de la rate présente l'avantage d'être relativement courte puisqu'elle ne dure que trois semaines et cette durée permet d'établir des correspondances avec les trois trimestres de la grossesse. Par ailleurs nos collègues de l'équipe du Dr Michèle Brochu [137] avaient développé un modèle d'HG chez la rate ce qui allait nous permettre de caractériser les altérations induites par cette condition pathologique.

10.1.2 Hypertension gestationnelle

Les modèles animaux de l'HG ne permettent pas de reproduire tous les signes cliniques de l'HG observée dans l'espèce humaine. Comme chez la femme, chez la rate la gestation est associée à une baisse significative de la pression artérielle qui se produit vers le 14^e jour de gestation [136, 157, 158]. A ce stade de la gestation, la valeur considérée comme normale est maintenant plus basse que la valeur avant le 14^e jour. Ainsi, une rate est dite hypertendue lorsque sa pression artérielle est égale ou supérieure à sa valeur avant cette diminution. De plus, selon les modèles, d'autres signes caractéristiques de l'HG peuvent être observés comme la sensibilité aux agents vasoconstricteurs, des dysfonctionnements placentaires [136, 157].

Le modèle d'HG que nous avons utilisé est la rate gestante traitée avec une diète riche en sel (0.9% NaCl) [136]. La diète administrée du 14^e au 21^e jour de gestation

empêche la diminution physiologique de la pression artérielle (Figure 10.A). Ainsi, la pression artérielle est significativement supérieure aux valeurs normales. De plus, cette diète abolie la résistance aux agents vasoconstricteurs, normalement induite par la grossesse (Figure 10.B). Cette sensibilité aux agents vasoconstricteurs est une caractéristique de connue de l'HG [159, 160]. Il n'y a pas de protéinurie chez cette rate ou d'autres complications de l'HG. Ce modèle d'hypertension gestationnelle peut être considéré comme un modèle de l'HG ou gravidique tel que nous l'avons défini dans la section précédente.

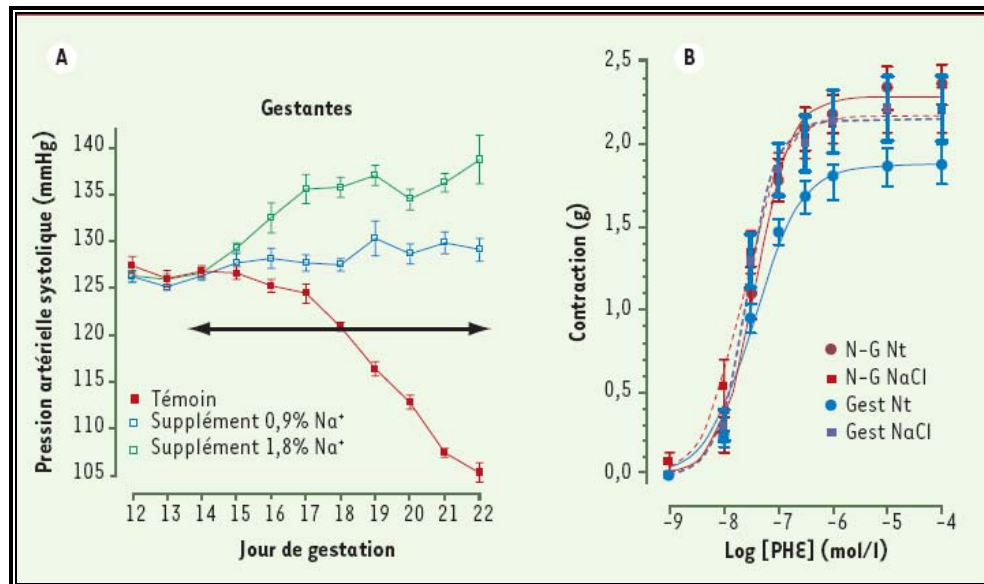


Figure 10. Effet du supplément sodique sur la pression artérielle et l'effet vasoconstricteur de la phényléphrine chez la rate gestante.

A. La flèche indique la période pendant laquelle les rates ont été soumises à une diète contenant un supplément sodique de 0,9 ou 1,8% de NaCl. La courbe rouge correspond aux témoins, la courbe bleue à l'effet de la diète 0,9% de sodium et la courbe verte à celle de 1,8% de NaCl. B. Courbes concentration-réponse à la phényléphrine sur des anneaux d'aortes isolées de rates non-gestantes (N-G, en rouge) et gestantes (Gest, en bleu). Les rates ont reçu ou non (respectivement, NaCl et Nt [non-traitées]) un supplément sodique de 0,9 % et ont été sacrifiées après 7 jours de traitement pour obtenir les aortes thoraciques. L'ordonnée décrit les réponses contractiles (en gramme-tension) obtenues après l'application, dans chaque bain contenant un anneau aortique, de concentrations croissantes de phényléphrine (PHE, abscisse). Chaque courbe représente la moyenne des réponses (\pm e.s.) obtenues pour 9 anneaux aortiques de différents animaux. Extrait de St-Louis et Brochu [154], avec la permission des éditions EDK.

10.1.3 Rôle des récepteurs aux minéralocorticoïdes

Pour déterminer l'implication des RM dans le remodelage induit par la gestation, nous avons opté pour l'inhibition des RM par le canrénoate (20mg/kg/jour) dans l'eau de boisson. Le canrénoate est un métabolite de la spironolactone, un inhibiteur des RM. Le canrénoate présente l'avantage d'être plus soluble dans l'eau que la spironolactone. De plus, sa demi-vie plus longue : $\approx 16.5h$ pour le canrénoate vs $\approx 1.5h$ pour la spironolactone [155]. Les animaux ont été traités du 14^e au 21^e jour de gestation, car les concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes et d'aldostérone augmentent chez la rate à partir du 15^e jour jusqu'à la fin de la gestation [156, 157].

10.2 Modèle cellulaire

La surcharge de volume induite par la grossesse augmente la charge de travail du cœur qui est effectué en grande partie par le ventricule gauche. Ainsi, la pression du ventricule gauche augmente au cours du remplissage, ce qui induit un agrandissement de la cavité ventriculaire et un épaississement de la paroi ventriculaire. [29]. Le ventricule gauche est donc la partie du cœur qui subit le remodelage le plus important. Parmi les types cellulaires constituant les ventricules, les cardiomyocytes, spécialisés dans la contraction sont les plus nombreux [2] Nous avons donc opté pour l'étude des cardiomyocytes du ventricule gauche.

10.3 Etude morphologique des cellules

Le volume cellulaire est considéré comme un paramètre permettant d'établir une corrélation adéquate entre le remodelage cellulaire et celui du ventricule [158]. Pour examiner un tissu avec un microscope optique, il est nécessaire d'effectuer des coupes. Les coupes sont utiles pour l'étude des populations tissulaires, l'organisation cellulaire des tissus... Plus la coupe est fine et plus l'image sera précise. Néanmoins, pour cette technique, il est nécessaire de traiter ces échantillons ce qui implique des étapes de déshydration, d'enrobage dans la paraffine...[159]. Ce qui implique de travailler avec des tissus morts.

Etant donné que nous voulions étudier la morphologie de cellules isolées vivantes, nous avons opté pour la microscopie confocale à balayage laser. Cette technique permet de sectionner l'échantillon biologique (tissu ou cellules) en coupes «optiques», c'est-à-dire des coupes effectuées selon l'épaisseur de l'échantillon en faisant varier uniquement la position du plan de mise au point. La microscopie confocale à balayage laser présente l'avantage de pouvoir enregistrer des images en trois dimensions des cellules, ce qui permet par conséquent d'estimer le volume de la cellule. Les cardiomyocytes possèdent la capacité d'adhérer librement sur la lame microscopique. Il n'était par conséquent pas nécessaire de les fixer, ce qui représente un avantage car la fixation peut entraîner une sous-estimation du volume.

10.4 Etude morphologique du cœur

Les changements morphologiques du cœur ont été caractérisés en utilisant l'échocardiographie. L'échocardiographie présente l'avantage d'effectuer l'étude morphologique du cœur *in vivo*, ce qui nous permettait notamment de prendre en compte l'effet des changements hémodynamiques induits par la grossesse sur les dimensions systoliques et diastoliques.

Le principe de l'échocardiographie repose sur une sonde qui émet des ultrasons en réponse à une excitation électrique. L'impulsion ultrasonore est transmise dans le cœur et se déplace de proche en proche. Les échos engendrés se propagent vers la sonde qui agit aussi en tant que récepteur après avoir émis l'ultrason. Lorsque le signal atteint la sonde, il émet un signal électrique dont l'amplitude est proportionnelle à celle de l'écho. L'image est obtenue par détection des signaux délivrés par le capteur ultrasonore [160]. Le signal échocardiographique peut être affiché en plusieurs modes, nous avons utilisé le mode M. L'échocardiographie en mode M (M signifiant mouvement) permet de faire l'analyse du tissu biologique en mouvement. Ce mode de représentation est obtenu en faisant défiler sur un moniteur vidéo des signaux échocardiographiques successifs émis dans une même

direction. Le mode M est utilisé pour l'analyse des structures du cœur telles que les cavités ventriculaires incluant le volume, l'épaisseur des parois, les valves [160].

10.5 Mesure des contractions

Les contractions sont mesurées par la technique du «line-scan» ou balayage laser de ligne en microscopie confocale. Les cellules sont incubées avec une sonde fluorescente, dans notre cas, di-8-ANEPPS qui marque la membrane des cellules. Cette technique consiste à choisir une ligne, dans le sens longitudinal de la cellule. Seule la ligne sélectionnée est balayée horizontalement par le laser. L'avantage de cette technique est de permettre la visualisation des changements géométriques survenant en chaque point de la ligne sélectionnée.

Les contractions sont induites par stimulation de champ. Les cellules sont placées dans un bain de 500 μ L muni d'électrodes de platine qui transmettent des impulsions émises par un générateur de voltage constant. Ce générateur d'impulsions est relié à un générateur de fréquence qui permet d'induire des contractions aux fréquences choisies. La fréquence 0.5 Hz a été utilisée car elle permet un retour à l'état de repos tandis que la fréquence de 6.0 Hz est la fréquence cardiaque chez les rates [161].

Afin de permettre aux cellules de se contracter dans des conditions optimales, nous avons utilisé un système de perfusion extracellulaire rapide à un débit de 1.0 mL/min, chauffant à une température de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. La température de la solution extracellulaire est maintenue grâce à un système de contrôle de température dont la sonde est fixée dans le bain, ce qui permet d'observer les variations éventuelles de température et par conséquent de réajuster la température. Le surplus de volume est aspiré par une pompe péristaltique dont l'extrémité de la tubulure est aussi fixée sur le bain.

La contractilité, définie comme le pourcentage de changement de la longueur cellulaire (% Δ Lcellulaire), a été déterminée par l'équation suivante:

$$\% \Delta L_{\text{cell}} = (L_{\text{cell}} - R_{\text{max}}) / (L_{\text{cell}})$$

où L_{cell} représente la longueur cellulaire, $\% \Delta L_{cell}$ le pourcentage de changement de la longueur cellulaire et R_{max} correspond au raccourcissement maximal de la longueur lors de la contraction.

Nous avons utilisé une seconde méthode pour les contractions qui diffère de la première sur certains aspects. Le principe du «line scan» est le même. Cependant, il n'est pas nécessaire d'utiliser une sonde fluorescente et la vidéo de la cellule est enregistrée directement à l'aide d'une caméra rapide. L'acquisition et l'installation de la caméra ont été plus tardives, donc nous avons utilisé le microscope confocal disponible dans notre institution.

10.6 Etude des courants ioniques

Les courants ioniques ont été mesurés par la technique du «patch-clamp». Cette technique permet d'étudier les courants qui circulent à travers les canaux individuels d'un petit morceau de membrane appelé «patch». Le terme «clamp» est utilisé pour désigner le fait que le potentiel membranaire est maintenu à une valeur déterminée pendant l'enregistrement des courants ioniques [162].

Une pipette de verre, ayant une extrémité d'environ $1 \mu m$, est placée au contact de la membrane. L'application d'une légère succion dans la pipette permet d'obtenir un scellement serré, de telle sorte que la résistance électrique de part et d'autre du morceau de membrane est l'ordre du gigaohm, ce qui permet d'isoler électriquement ce morceau de membrane du reste de la membrane cellulaire. Ainsi, seuls les courants traversant les canaux présents dans le «patch» seront mesurés à l'aide d'un amplificateur connecté à la pipette, puis étudiés. Ce mode d'enregistrement est la configuration dite cellule attachée [162].

Il existe différentes configurations du «patch-clamp». Si le morceau de membrane de la configuration dite cellule attachée est rompu alors la solution de la pipette et l'électrode seront en contact direct avec le cytoplasme, c'est ce que l'on appelle la

configuration dite cellule entière. Cette configuration permet d'enregistrer les courants de tous les canaux de la cellule. La configuration cellule entière rend possible les échanges entre la pipette et le milieu intracellulaire. De ce fait, le risque encouru dans cette configuration est le remplacement de certains éléments solubles du cytoplasme par la solution de la pipette. En configuration cellule entière, les courants calciques diminuent lors de longs enregistrements [163], ce qui représentait un désavantage dans notre cas car nous voulions étudier les courants calciques I_{Ca-L} dans différentes conditions mais dans la même cellule.

Pour nos travaux, la configuration cellule entière présentait l'avantage de permettre la caractérisation des propriétés électriques de la cellule. Ainsi, nous avons choisi de garder cette configuration mais en utilisant la technique du «patch» perforé. Dans cette technique, la pipette est remplie d'une solution intracellulaire contenant un agent de perforation qui favorise l'accès électrique de la pipette au milieu intracellulaire [162]. Nous avons choisi l'amphotéricine B, un antibiotique qui se lie aux lipides membranaires pour former des pores permettant le passage de cations monovalents [164]. Cette spécificité des pores possède l'avantage de conserver la composition du cytoplasme. Nous avons effectué tous les enregistrements des courants calciques I_{Ca-L} , ainsi que des courants potassiques, I_{to} , I_{sus} et I_{K1} , avec cette configuration.

Avec l'amphotéricine B, les courants restaient stables sur des périodes pouvant aller jusqu'à 1h. Cela était particulièrement intéressant dans notre cas pour mesurer sur la même cellule les effets de différentes conditions extracellulaires.

11 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Lors de la grossesse, les adaptations hémodynamiques favorisent le développement d'une expansion du volume sanguin qui induit le remodelage du cœur. Grossman [32] a proposé que le remodelage morphologique du cœur lors de l'hypertrophie implique des modifications de la forme des cellules qui le constituent. Nous supposons par conséquent que la surcharge volumique induite par la grossesse entraîne un remodelage hypertrophique des cardiomyocytes de type excentrique, c'est-à-dire en longueur. De plus, de par la relation étroite entre la structure et la fonction qui existe dans le cœur, nous pensons que ces changements morphologiques sont aussi accompagnés d'adaptations fonctionnelles. **Notre premier objectif est donc d'identifier les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du remodelage cardiaque au niveau d'un cardiomyocyte du ventricule gauche chez la rate en fin de gestation. Sur le plan fonctionnel, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la relation entre les adaptations du métabolisme du cœur et la contractilité.** Cette étude est présentée dans le premier article : «*Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy*».

Lors d'affections de la grossesse telle que l'HG, la surcharge de pression imposée au cœur induit un remodelage hypertrophique plus important en lien avec la sévérité des complications fœto-maternelles [148]. Nous supposons que ce remodelage reflète une adaptation inadéquate du cœur que sous-tendent des altérations cellulaires. **C'est pourquoi, en se basant sur les données obtenues lors de la grossesse normale, notre second objectif est d'identifier les altérations induites par l'HG.** Cette étude est également présentée dans le premier article.

Les mécanismes régulateurs impliqués dans le remodelage du cœur lors de la grossesse sont peu connus. Une des voies de régulation connue pour son rôle dans le remodelage cardiaque pathologique est celle médiée par le RM [134, 135] : l'inhibition du RM permet de réduire l'hypertrophie et d'améliorer le fonctionnement cardiaque. Peu

d'études se sont intéressées au rôle physiologique du RM dans le remodelage du cœur. Pourtant, le RM est aussi exprimé dans le cœur de différentes espèces dont l'humain et le rat [130, 132, 133], ce qui laisse supposer que le RM aurait aussi un rôle physiologique dans le cœur. Nous présumons que le RM pourrait avoir un rôle régulateur local dans le remodelage morphologique et fonctionnel du cœur lors de la grossesse.

De plus, l'hypertrophie du ventricule est aussi associée à des changements progressifs de ses propriétés électriques [144], se manifestant chez les femmes enceintes, par une prolongation de l'intervalle QT sur l'ECG [46]. Cela suggère des modifications de la repolarisation ventriculaire et des courants potassiques qui en sont responsables. Cette idée est supportée par la diminution des courants potassiques I_{to} mesurée chez la souris gestante [21], qui est attribuée dans cette étude à l'augmentation des œstrogènes lors de la gestation. Cela montre que les changements hormonaux lors de la grossesse peuvent réguler le remodelage électrique. L'implication du RM dans le remodelage électrique a aussi été démontré chez le rat dans les conditions d'hypertrophie pathologique : leur inhibition empêche la diminution de I_{to} induite par l'hypertrophie [145]. De là vient notre hypothèse que le RM pourrait intervenir dans la régulation de la repolarisation lors de la grossesse.

Nous présumons par conséquent que le RM peut contribuer à la régulation du remodelage cardiaque lors de la grossesse. **Notre troisième objectif est donc d'une part déterminer le rôle du RM dans l'adaptation de la structure cardiaque lors de la grossesse et dans la relation fonctionnelle métabolisme/contractilité et d'autre part de déterminer le rôle du RM dans l'adaptation de la repolarisation.** Ces résultats sont présentés dans le deuxième article et le troisième article intitulés respectivement : «*Cardiac remodelling during pregnancy - The role of mineralocorticoid receptors*» et «*The role of mineralocorticoid receptors in the regulation of cardiac repolarization in late pregnancy*».

ARTICLE 1

**STRUCTURAL, FUNCTIONAL AND METABOLIC REMODELING
OF RAT LEFT VENTRICULAR MYOCYTES IN NORMAL AND IN
SODIUM-SUPPLEMENTED PREGNANCY**

Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy

Valérie Bassien-Capsa^a, Jean-Claude Fouron^{a,b}, Blandine Comte^{a,c}, Alzbeta Chorvatova^{a,b,*}

a Research Center, Sainte-Justine Hospital, Canada

b Department of Pediatrics, University of Montreal, Canada

c Department of Nutrition, University of Montreal, Canada

Cardiovascular Research; 69:423-431.2006.

* To whom correspondence should be addressed:

Dr. Alzbeta Chorvatova, Ph.D.

CHU Sainte-Justine

Research Centre

3175 Cote Sainte-Catherine

Montreal Qc Canada

Abstract

Pregnancy is an important physiological condition associated with hemodynamic and endocrine changes that affect the heart. Nevertheless, very little is known about cardiomyocyte remodeling in this condition. Here, we studied the morphological, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes that occurs in late stages of normal pregnancy (P) and in experimental preeclampsia induced by elevated (0.9%) sodium intake (P0.9). We applied confocal microscopy to examine the morphology and the contractility of single cells, while the patch clamp technique was used to assay ionic currents. Our results revealed a significant increase in the volume of single left ventricular cardiac myocytes in P, mainly resulting from cell elongation. In P0.9, further increase in the cell length led to a significant rise in the length/width ratio. Cell contractility was significantly decreased in glucose-based solutions in response to stimulation at 0.5 Hz and 6 Hz in P as well as in P0.9. The density of L-type calcium current (I_{Ca-L}) was not significantly altered in P or in P0.9. Metabolic substrates lactate and pyruvate, increased in the blood of P and P0.9 rats, enhanced contractility in P, without affecting I_{Ca-L} . The same effect, present but blunted in P0.9, was associated with a significant increase in I_{Ca-L} . Our results demonstrate that processes of adaptive remodeling take place in normal pregnancy, while maladaptive components are identified in experimental preeclampsia; they also reveal an adaptation in the use of energy substrates in pregnancy and its impairment by sodium supplementation.

Keywords: L-type calcium current; Cardiomyocytes; Metabolism; Pregnancy; Hypertension

Introduction

Pregnancy induces significant adaptations in the cardiovascular system, associated with hemodynamic and endocrine changes that contribute to maternal volume expansion and are necessary for fetal homeostasis, development and well-being [1]. Systemic arterial vasodilatation represents one of the first detectable changes in hemodynamics that initiates a cascade of compensations in the circulation and volume homeostasis that also affect the heart: cardiac output rises in response to increase in the heart rate and achieves its greatest value in the final stages of delivery, placing an enhanced volume load on the heart. Blood volume expansion leads to adaptations of the myocardium that affect mainly the left ventricle (LV), more susceptible to increased load. In contrast to pathological conditions, these alterations are associated with physiological reduction of blood pressure (BP) and are reversible. The natural volume overload in pregnancy is frequently associated with increase in LV size and mass, leading to LV hypertrophy (LVH) [2-4].

The most important pathology during pregnancy is hypertension [5], in particular preeclampsia, affecting 6 to 10% of all pregnancies. In this condition, instead of decreasing, BP is significantly increased, producing an acute pressure overload on left ventricle [6, 7]. For long, duration of the disease was thought to be too brief to induce structural cardiac changes. However, in recent years, studies of gestational hypertension identified changes in LV geometry as an important risk factor [8-10], correlating with increase in fetal and maternal mortality and morbidity. To date, very little information is available on structure/function modifications at the single cardiomyocyte level. This study examined whether left ventricular cardiomyocytes undergo structural, functional and metabolic remodeling in normal pregnancy in rat and whether this remodeling is altered by sodium supplementation. To investigate cardiomyocyte remodeling during pregnancy, a rat model was chosen due to close resemblances between pregnancies in rats [11, 12] and in humans [13]. A condition comparable to preeclampsia was induced experimentally by sodium supplementation, in regard to a recent work that showed that an increase in the dietary NaCl in the last week of pregnancy induced alterations similar to preeclampsia [14], including higher BP and significantly and durably attenuated renin-angiotensin-aldosterone system [15].

Materials and methods

Animals and cardiomyocyte isolation

Female Sprague-Dawley rats (13-14 weeks old, Charles River, Canada) received a 0.9% NaCl supplement in tap water for the last 7 days of pregnancy [14, 15]. Two groups of age-matched pregnant and never pregnant rats were also used. Rats were killed at the 21st day of pregnancy by decapitation. All procedures were performed in accordance with the NIH and the Canadian Council for the Protection of Animals (CCPA) guidelines. Left ventricular myocytes were isolated following retrograde perfusion of the heart with proteolytic enzymes [16]. Myocytes were maintained in a storage solution at 4°C until used. Only cells showing clearly defined striations were used in up to 10 h following isolation.

Whole heart echocardiography

Echocardiography was performed on isoflurane (2%/L of O₂/min)-anesthetized rats using a 128XP/10c instrument from Acuson (Mountain View, U.S.A.) equipped with a 7 MHz transducer. LV shortening fraction was calculated as (diastolic-systolic) / diastolic dimensions.

Confocal microscopy

To label sarcolemma and t-tubule system, myocytes were stained with lipophilic membrane fluorescent probe di-8-ANEPPS (5 µmol/L for 5 min at room temperature) [17]. 3D images were taken by inverted laser scanning confocal microscope LSM 510 (Zeiss, core lab of Sainte-Justine Research Center; PlanNeofluar 63×/1.3 oil, 488 nm Ar/ion, LP 505) and recorded by averaging four lines using 1.2 µm steps in the z-stack (pinhole opening of 417 Åm, scaling 0.16 µm × 0.16 µm). Sarcomere length was determined in each cell as a mean length of at least three sarcomeres. For length and width data, some measurements obtained from transmission images were also added. Fluorescent probe Tetramethylrhodamine TMRM (10 nmol/L for 10 min at room temperature) was used to image mitochondria (543 nm He/Ne, LP 560 nm, pinhole opening 106 Åm, scaling 0.2 µm × 0.2 µm). At least three measurements were averaged in each cell. Rapid line-scan confocal imaging was used to record contractions. Cells were field-stimulated to contract using Pt electrodes, operated by a pulse generator (DS-2A, Digitimer Ltd., USA) and by a trigger generator (DG-2, Digitimer Ltd., USA) under external perfusion at 35 ± 1 °C.

Maximum contraction was calculated as a percentage of Δ cell length=(length-maximal shortening) / length. Only cells with two contracting edges were taken into consideration.

Electrophysiology

Myocytes were voltage clamped using the Axopatch 200B patch clamp amplifier linked to a Digidata 1200B A/D interface. Currents were acquired using Clampex 9 and analyzed with Clampfit 9 from pClamp package (Axon Instruments, USA). Micropipettes were fabricated from filamented borosilicate glass GC150TF (Harvard, Canada) using pipette puller (PP-830, Narishige, Japan) and polisher (MF-830, Narishige, Japan) to give tip resistances of 1 M Ω , when filled with standard physiological solution (in mmol/L: CsCl, 130.0; CaCl₂, 1.0; NaCl, 10.0; HEPES, 10.0 adjusted to pH 7.25 with CsOH). Cells were pre-incubated in the presence of BAPTA-AM (10 μ mol/L for 15 min) prior to patch clamp experiments. Membrane currents were measured by the perforated patch clamp method using Amphotericin B (240-480 Ag/mL) as the pore-forming agent. All measurements were undertaken at 35 \pm 1 $^{\circ}$ C.

Blood analyses

Blood was collected immediately after decapitation. The samples were processed within 24 h and determined by standard enzymatic methods [18]. For pyruvate measurement, blood sample was treated with 5% trichloroacetic acid and immediately vortexed for 2 min. Each sample was then centrifuged for 4 min at 10,000 \times g, the supernatant collected and promptly frozen at -20 $^{\circ}$ C. Pyruvate was subsequently determined by standard enzymatic dosage. The dosages were performed by the Clinical Biochemistry Lab at Sainte-Justine Hospital.

Solutions and drugs

The storage solution contained (in mmol/L): NaCl, 130.0; KCl, 5.4; MgCl₂·6H₂O, 1.4; NaH₂PO₄, 0.4; creatine, 10.0; taurine, 20.0; glucose, 10.0; and HEPES, 10.0; titrated to pH 7.30 with NaOH. Basic external solution contained (in mmol/L): NaCl, 140.0; KCl, 5.4; CaCl₂, 2.0; MgCl₂, 1.0; glucose, 10.0; HEPES, 10.0; adjusted to pH 7.35 with NaOH. CsCl (5 mmol/L) was added to this solution for ICaL measurements. Pyruvate was prepared freshly, while lactate and octanoate were each added to the basic external solution from the 100 mmol/L stock-solution where pH was carefully adjusted to 7.2. Final concentrations of 100 μ mol/L for pyruvate, 1 mmol/L for lactate and 1 mmol/L for octanoate were used. All

chemicals were from Sigma (Canada), whereas fluorescent probes (di-8-ANEPPS and TMRM) were from Molecular Probes (USA).

Data analysis

Data are shown as mean \pm standard error (S.E.M.). Comparison between means was made using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-tests, except for I_{Ca-L} where Tukey post-tests were used. Data from at least five different animals were taken in each condition before comparison.

Results

Whole heart parameters

First, to evaluate cardiac changes during pregnancy, whole-heart parameters were determined. Animal weights were established together with weights of placenta and number of offspring in pregnant rats (Table IA). Data from healthy pregnant rats (P) were compared to age-matched non-pregnant females (NP), while pregnant rats receiving 0.9% NaCl supplement (P0.9) were related to P. When the weight of placenta was excluded from the total weight of pregnant rats (P or P0.9), the resulting body weights were not significantly different from NP. Both wet heart weights (WHWs) and dry HWs (DHWs) were compared.

Surprisingly, we observed a decrease in WHW in P, leading to a significant decrease of the WHW/DHW ratio. In P0.9, WHW was significantly increased when compared to P and this result was translated into an increase in WHW/DHW ratio. However, the WHW in P0.9 remained unchanged when compared to NP. DHWs were identical in all studied conditions. Sodium supplementation given to non-pregnant rats (NP0.9) did not affect WHW or DHW compared to NP (data not shown). Echocardiography data (Table IB), obtained from Mmode tracings (Fig. 1A), revealed significant increase in the LV wall thickness in P, without further changes in P0.9. LV dimensions of the heart were not significantly modified. The shortening fraction was significantly increased in P0.9; no significant change was identified in P. Heart rate (302 ± 13 beats/min (BPM) (n =6) in NP) had an increasing tendency in P (320 ± 12 BPM (n =6)) and in P0.9 (330 ± 11 BPM (n =11)). Recorded values were somewhat lower than previously identified [19], possibly a consequence of anesthesia. BP (120-125 mm Hg in NP and in P0.9) was decreased in P (105-110 mm Hg), as published previously [15].

Cardiomyocyte morphology

Morphology of single LV myocytes was analyzed from 3D confocal images of non-contracting cells stained with membrane probe di-8-ANEPPS (Fig. 1Ba). Table II summarizes data on the cell morphology. In P, we found significant cell elongation due to adding sarcomeres in series when compared to NP. The cross-sectional area (CSA) was consequently increased with the cell volume (geometrical approximation of a cell as an elliptic cylinder [20]: see legend of Table II), but the length/width ratio was preserved. On

the other hand, in P0.9, we identified a different structural remodeling compared to P. Our data revealed further cell enlargement leading to a significantly increased length/width ratio. Interestingly, cells tend to become thinner, allowing preservation of the cell volume. Identical diet given to non-pregnant rats had no significant effect on cell morphology (data not shown).

The length of one individual sarcomere (l_s), a contractile unit of cardiomyocyte, was also established from high precision images of di-8-Anepps stained cells (Fig. 1Bb). In NP, P and P0.9, the t-tubular spacing was estimated to $1.8 \mu\text{m}$ (Table II), in accordance with others [21]. Length and area of longitudinally positioned mitochondria were evaluated using TMRM (Fig. 1Ca and Cb). No significant differences were found in the morphology of mitochondria within the limits of the confocal resolution, suggesting their preservation in all studied conditions. Membrane capacitance, an indicator of the total cell membrane surface, was also determined in pF as an integral of capacitive transients, triggered by hyperpolarizing voltage pulses from holding potential (H.P.) -40 mV to -50 mV , divided by the applied voltage step (10 mV). This overall membrane surface was preserved in P (Table II), but was significantly increased in P0.9.

Cardiomyocyte functions

Contractility, the principal function of cardiomyocytes, was questioned using line-scan mode of confocal imaging (Fig. 2Aa) in response to field stimulation at frequency 0.5 Hz (to stabilize SR loading; Fig. 2Ab) and 6 Hz (normal heart rate of NP female rats [19]; Fig. 2Ac). In standard, glucose-based external solution, our results showed that percentage of change in cell length, an index of contractility, was significantly decreased in cells from P in response to stimulation at 0.5 Hz (Fig. 2Ba), as well as 6.0 Hz (Fig. 2Bb), indicating that this effect is not frequency-dependent. In cells from P0.9, the contractility was not significantly different when compared to P. Furthermore, no significant change in cardiomyocyte contractility was observed in NP0.9 (data not shown).

Action potentials were not significantly modified in P or P0.9 (data not shown), although some tendency towards AP prolongation was noted in P0.9. L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca-L}}$) were also isolated in Cs-based solutions, applying voltage steps of 600 ms from a holding potential of -40 mV every 5 mV at a frequency 0.5 Hz (see inset of Fig. 3Aa for voltage

protocol). Our data revealed no significant difference in the current/voltage relationship of the I_{Ca-L} density (Fig. 3Ab), expressed as pA/pF, or its activation/inactivation properties (Fig. 3Ac) between P and NP rats. In P0.9, neither I_{Ca-L} density nor activation kinetics were significantly modified, but inactivation curve was shifted towards more positive potentials, suggesting larger window current in this condition.

Metabolic changes

Pregnancy is associated with significant physiologic changes in carbohydrate metabolism [22] to allow continuous nutrients availability to the developing fetus, primarily depending on glucose. We first compared blood levels of glucose, lactate, pyruvate and triglycerides in the different conditions in fed state (Table III). In P, there was a significant decrease in glycemia, in accordance with glucose being used by the fetus. There was also a significant increase in the levels of triglycerides and lactate with a similar trend on pyruvate, which leads to a significant change in the lactate/ pyruvate ratio, indicating an important modification of the redox status. In P0.9, compared to P, neither levels of glucose nor lactate and pyruvate were significantly different, but the lactate/pyruvate ratio failed to increase. These results confirmed changes in the metabolite blood levels during pregnancy.

To question whether described differences are translated into differential use of metabolic reserves by cardiomyocytes in pregnant rats, we tested whether contractility is modified when the cell is exposed, additionally to glucose, to plasma levels of lactate and pyruvate or fatty acid. Cell shortening was assessed in standard external solution supplemented with lactate (1 mmol/L) and pyruvate (0.1 mmol/L) or octanoate (1 mmol/L), a medium chain fatty acid. Fig. 4A shows that, in the NP condition, the cell response was not significantly modified by the addition of lactate/pyruvate, whereas when considering pregnancy (P and P0.9), the addition of these substrates significantly increased cell shortening compared to the condition with glucose only. Interestingly, octanoate had a significant effect in NP, but not in P conditions. In P0.9, the effect of lactate/pyruvate was still present, but significantly blunted, while the sensitivity to octanoate was restored. In general, the responsiveness in P0.9 was significantly different from those in P conditions. The pattern of the response was the same at 6 Hz (Fig. 4B), showing that this phenomenon was not frequency-dependent. Furthermore, cells from NP and NP0.9 showed same responsiveness (data not shown).

Interestingly, lactate and pyruvate did not affect I_{Ca-L} in NP (Fig. 3Ba) or P (Fig. 3Bb), but significantly increased I_{Ca-L} amplitude in P0.9 (Fig. 3Bc). Activation/inactivation properties of I_{Ca-L} were not modified by these metabolites in either condition (data not shown).

Discussion

The major findings of our experiments were: (1) an adaptive remodeling of cardiomyocytes is put in place in normal pregnancy, while maladaptive components are identified after sodium supplementation; (2) an adaptation in the utilization of energy substrates is taking place in normal pregnancy and this process is impaired by sodium supplementation, where it involves regulation of I_{Ca-L} .

Morphological remodeling in pregnancy

Our first goal in understanding the modifications of LV cardiomyocyte remodeling in normal pregnancy and in the model of experimental preeclampsia was to characterize their structural changes. Morphological parameters gathered in non-pregnant rats were in good agreement with others [21]. In normal pregnancy, our data identified significantly increased cell length due to adding sarcomeres in series, leading to enhanced cell volume and cross-sectional area. Observed modifications are smaller in comparison to diseased cases [21, 23], but are comparable to effects induced by endurance exercise [24]. The length/width ratio and overall membrane surface are preserved in normal pregnancy, according to a proportional myocyte growth observed during volume overload [25]. These results suggest an adaptive cardiomyocyte remodeling, possibly as a result of enhanced volume load placed on the heart.

The remodeling of the heart observed during pregnancy resembles the one recorded in women following endurance exercise [26, 27], except for hormonal levels. On the other hand, in experimental preeclampsia, we identified differences in morphological remodeling compared to normal pregnancy. Our results revealed disproportionate cell enlargement in this condition leading to significantly increased length/width ratio, indicating maladaptions [28, 29]. Interestingly, to allow preservation of the cell volume, cells tend to become thinner; increase in the cell length rather than CSA was proposed to maintain better diffusion capacities in the heart [25]. Higher membrane capacitance without change in the cell volume in P0.9 suggests bigger dependence of the overall membrane area on cell length, rather than on CSA. This is translated into an increased conversion factor, pointing to disproportionate rise in the t-tubular surface area inside cardiomyocytes [30]. Morphological remodeling observed in this model of experimental preeclampsia therefore

shows maladaptive components. A failure to induce adaptive remodeling is likely to result from increased wall stress, triggered by enhanced BP, which is significantly elevated in the animals supplemented with sodium when compared to normally pregnant ones [15].

To understand repercussions of cardiomyocyte remodeling at the whole heart level, we analyzed several cardiac parameters. Observed increase in LV wall thickness in normal pregnancy is in accordance with rise in cardiomyocyte CSA. These results are in agreement with findings in pregnant women [31] that also showed increased wall thickness rather than of LV dimensions. Not significantly modified LV dimensions indicate that induced cellular changes are small, possibly reflecting cardiac adaptations. The very comparable dry weights point to similar levels of myocardial protein contents in all studied groups, in agreement with findings of our colleagues who found no change in LV mass in P vs. NP rats [32]. These data, together with significant change in heart's wet weights in P, when compared to NP condition, indicate that observed changes could be a result of modifications in water retention [33], or increase in the ejection volume. In P0.9, the significant increase in WHWs compared to P, but their similarity with NP indicates a failure to adapt to changes in water retention in this group. This hypothesis is also strengthened by observed cell prolongation, but without significant modifications in LV dimensions.

Enumerated findings in normal pregnancy are in favour with the process of remodeling put in place as an adaptive mechanism to account for hemodynamic changes. On the other hand, sodium supplementation alters this adaptive response and maladaptive components are observed, possibly in reaction to acute pressure overload and/or failure in water retention management, with for probable functional benefits the lowering of wall stress.

Functional changes

Cardiomyocyte contraction is a hallmark of cellular remodeling and its modifications are often the primary cause underlying changes of the heart function. For these reasons, we investigated whether cardiomyocyte contractile properties are modified in normal pregnancy and whether this homeostasis is altered in experimental preeclampsia. Our results showed that, in glucose-based solutions, the contractility is significantly lowered in cells from P in response to both stimulation frequencies, indicating its frequency-

independence. However, in the presence of metabolic substrates, the contractility is increased, suggesting possible compensatory effect. Indeed, fractional shortening of the heart is not significantly modified in P, although it is showing a decreasing tendency. Obtained data are in agreement with somewhat controversial findings of preserved heart contractility in normal pregnancy, reported by some [2, 31] and reversible decrease, observed by others [3, 34]. In P0.9, we noted a disconnection between fractional shortening and cardiomyocyte contractility suggesting that increase in contractile properties of the heart in this condition are due to changes in loading, metabolic and/or hormonal conditions rather than inotropic state.

Myocardial L-type Ca^{2+} channels are particularly important in triggering cardiomyocyte contractions and therefore we investigated their implication in pregnancy. However, our data indicate that $I_{\text{Ca-L}}$ is not likely to be responsible for described contractility changes in normal pregnancy, although some possible effects may have been masked by the presence of BAPTA in recorded cells. At the same time, our findings also indicate that the regulation of this current plays a role in the effect of energy substrates on contractility in experimental preeclampsia. Nevertheless, further studies are needed to better understand consequences of metabolic driven $I_{\text{Ca-L}}$ changes on excitation-contraction coupling, as well as the role of other ionic currents in the pregnancy related remodeling. We propose that observed pregnancy induced cardiac modifications result from combination of load-dependent and heart-rate-dependent changes, with likely implication of hormonal, namely estrogen and/or adrenergic, regulation. Nonetheless, our data also revealed an important contribution of metabolic substrates.

Metabolic remodeling

Pregnancy is well known to be associated with significant changes in carbohydrate metabolism [22]: glucose homeostasis is affected due to increased fetal glucose uptake. This leads in a more rapid conversion from predominantly carbohydrate to predominantly fat utilization because of earlier depletion of liver glycogen stores, associated with increased lactate and pyruvate levels. Such metabolic changes are also likely to affect heart function. Our data confirmed that, as observed in humans [22], late pregnancy in rats is associated with low blood glucose concentration and increased levels of triglycerides and lactate in fed state. Interestingly, the lactate/pyruvate ratio is also enhanced from

physiological values (below 20) to 24, suggesting an effect on redox status. Our results indicate that, in normal pregnancy, cell contractility is more dependent on lactate/pyruvate than in NP condition, but this effect does not require change in I_{Ca-L} . This dependence on lactate/pyruvate is present, but significantly blunted by sodium supplementation and, in contrast to normal pregnancy, this remaining effect involves increase in I_{Ca-L} amplitude.

We also investigated the action of fatty acids and we used the medium chain fatty acid octanoate, well used by cardiomyocytes as energy substrate, which oxidation (unlike physiological long chain fatty acids) is not regulated by the carnitine-palmitoyl-transferase 1 (CPT-1) [35]. Octanoate reduced contractility in NP, but not in P although, interestingly, the decrease in contractions could be observed in P0.9. These results suggest that fatty acids are likely to contribute to the metabolic remodeling during pregnancy. Several cardiovascular diseases have been associated with metabolic switches in the fuel partitioning for energy production, but very little is known about cardiac fuel partitioning in pregnancy. In late pregnancy, Sugden and Holness [36] showed a 35% decrease in glucose uptake/phosphorylation by the heart in fed state. Our results suggest that metabolic switch from main substrates glucose/fatty acids to lactate/pyruvate occur in normal pregnancy and that this change has functional consequences on cell contractile properties. Importantly, this adaptation seems blunted by sodium supplementation, where it requires calcium channel regulation.

Conclusion

Our results shed a new light on mechanisms underlying cardiac remodeling in pregnancy. To our knowledge, this is one of the first studies investigating changes during pregnancy at a single cell level in such details. Our data are in favor with the process of an adaptive cardiomyocyte remodeling in normal pregnancy, while maladaptive components are identified in experimental preeclampsia. Interestingly, the overall different remodeling that is put in place in experimental preeclampsia seems to result from lack of adaptations observed in healthy pregnant rats. Knowledge of cardiovascular adaptations during pregnancy is essential in understanding how these modifications affect the natural course of heart disease and its management during pregnancy.

Acknowledgements

AC is a FRSQ (No 2948) fellow supported by CFI (No 9684) and CIHR (MOP 74600). VB-C is recipient of studentship from Foundation of Sainte-Justine Hospital. We would like to thank E. De Smet for helping with some experiments.

A) Parameter	Unit	ABB.	NP	P	P0.9
Total weight	g	BW	N.A.	357.9 ± 4.2 (17)	363.4 ± 3.5 (21)
Placenta weight	g		N.A.	78.0 ± 2.1 (17)	75.3 ± 2.9 (21)
Number of fetuses			N.A.	13 ± 1 (17)	13 ± 1 (21)
Body weight	g		285.3 ± 4.3 (19)	279.9 ± 3.8 (17)	288.2 ± 2.7 (21)
Wet heart weight	mg	WHW	880.7 ± 18.3 (19)	817.7 ± 18.0 (17)*	874.9 ± 10.8 (21) ^a
Dry HW	mg	DHW	238.3 ± 5.6 (19)	234.8 ± 7.3 (17)	232.9 ± 4.1 (21)
WHW/DHW			3.70 ± 0.04 (19)	3.50 ± 0.04 (17)*	3.77 ± 0.03 (21) ^a

B) Parameter	Unit	NP	P	P0.9
LV diastolic dimensions	cm	0.54 ± 0.04 (7)	0.56 ± 0.06 (6)	0.53 ± 0.02 (10)
LV systolic dimensions	cm	0.28 ± 0.02 (7)	0.33 ± 0.05 (6)	0.26 ± 0.01 (10)
LV shortening fraction	%	47.9 ± 3.3 (7)	41.3 ± 4.2 (6)	50.2 ± 1.7 (10) ^a
LV wall thickness	mm	0.86 ± 0.17 (7)	1.30 ± 0.15 (5)*	1.20 ± 0.20 (10)

Table I

Parameter	unit	ABB.	NP	P	P0.9
Cell length	μm	l	113.4 ± 0.8 (406)	117.5 ± 1.1 (250) ^{**}	121.2 ± 1.3 (185) [#]
Cell width	μm	w	28.9 ± 0.4 (395)	29.6 ± 0.5 (248)	28.3 ± 0.5 (186)
Cell depths	μm	d	17.6 ± 0.4 (97)	17.8 ± 0.4 (89)	16.5 ± 0.4 (88)
Volume	pL	Vol	43.5 ± 1.3 (97)	48.1 ± 1.8 (89) [*]	42.6 ± 1.4 (88)
Crosssectional area	μm ²	CSA	378 ± 10 (95)	415 ± 16 (89) [*]	350 ± 10 (88) [#]
Length/width		l/w	4.19 ± 0.06 (394)	4.21 ± 0.08 (248)	4.56 ± 0.10 (185) [#]
Sarcomere length	μm	l _s	1.8 ± 0.05 (58)	1.8 ± 0.05 (54)	1.8 ± 0.05 (87)
Sarcomere Number		N _s	62 ± 1 (58)	66 ± 1 (54) [*]	67 ± 1 (87)
Mitochondrial length	μm		1.3 ± 0.1 (14)	1.3 ± 0.1 (12)	1.2 ± 0.1 (6)
Mitochondrial area	μm ²		0.7 ± 0.1 (14)	0.6 ± 0.1 (12)	0.6 ± 0.1 (6)
Membrane capacitance	pF		134.8 ± 4.6 (82)	137.8 ± 5.1 (59)	154.9 ± 6.4 (30) [#]

Table II

Parameter	Unit	NP	P	P0.9
Glucose	mmol/L	16.2 ± 0.8 (5)	9.0 ± 1.4 (5) ^{**}	7.6 ± 0.9 (5)
Lactate	mmol/L	1.22 ± 0.04 (5)	2.71 ± 0.27 (5) ^{**}	2.26 ± 0.26 (5)
Pyruvate	μmol/L	68.3 ± 9.0 (5)	103.3 ± 8.2 (5)	116.0 ± 18.8 (5)
Lactate/Pyruvate		18.8 ± 1.8 (5)	26.4 ± 1.9 (5) [*]	20.3 ± 1.4 (5) [#]
Triglycerides	mmol/L	1.35 ± 0.25 (5)	3.32 ± 0.66 (5) [*]	3.40 ± 0.35 (5)

Table III

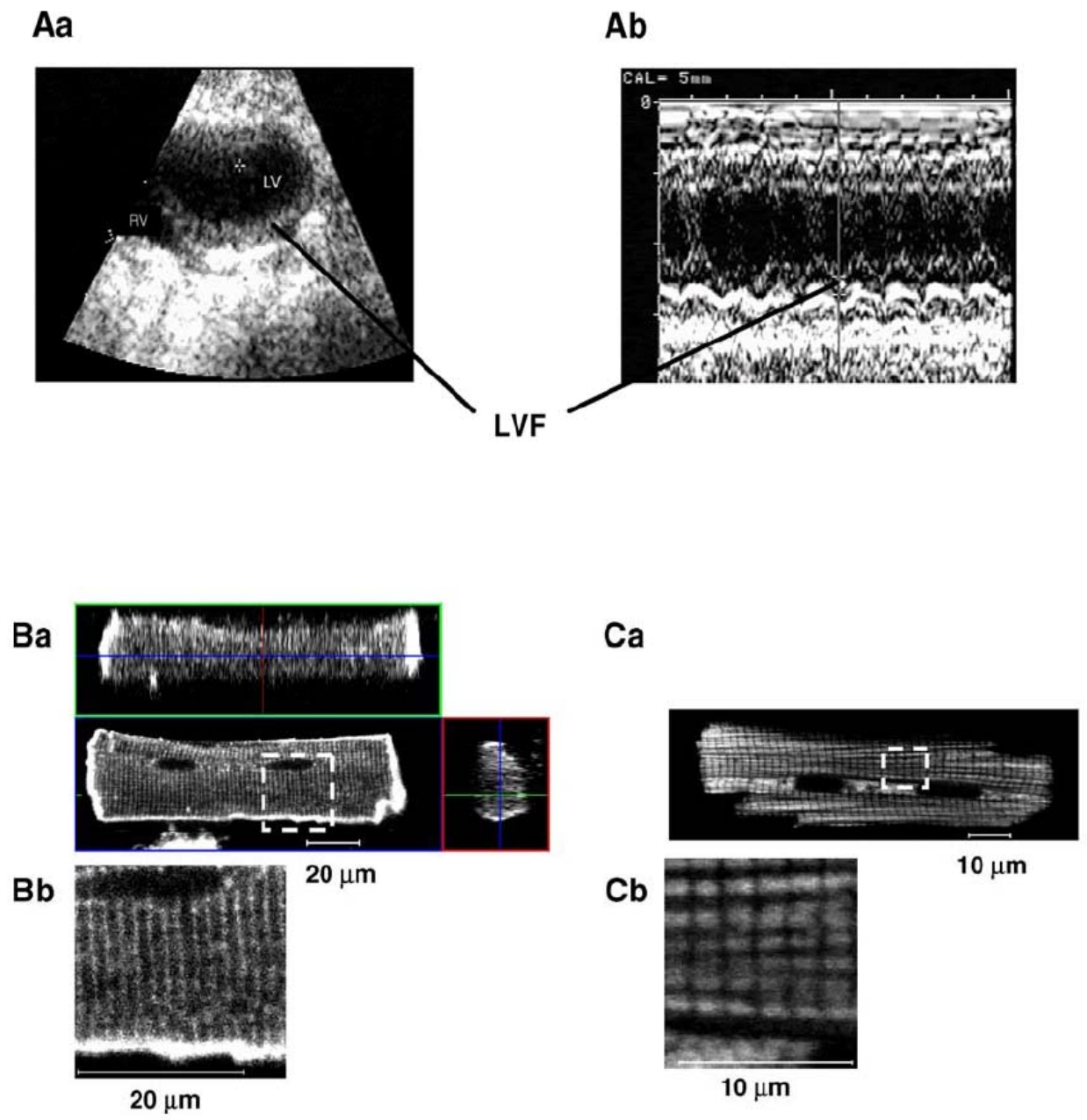


Figure 1

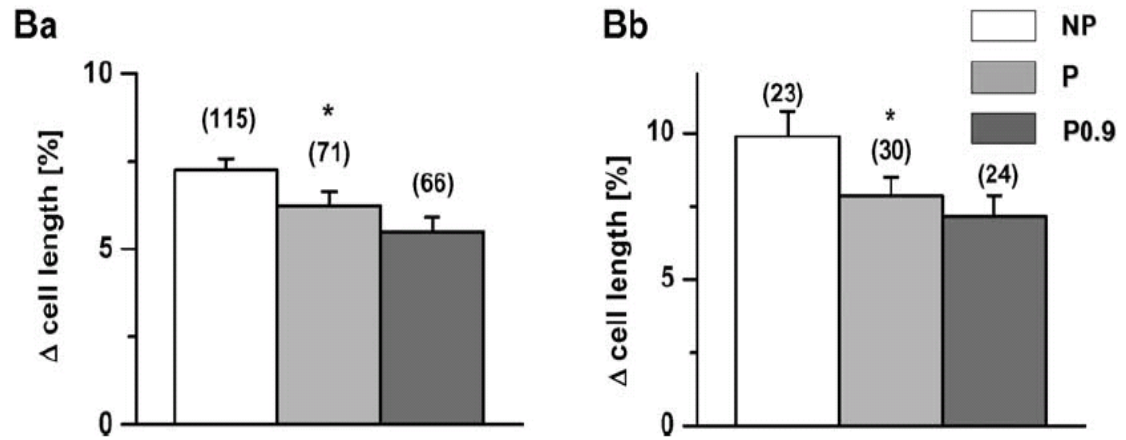
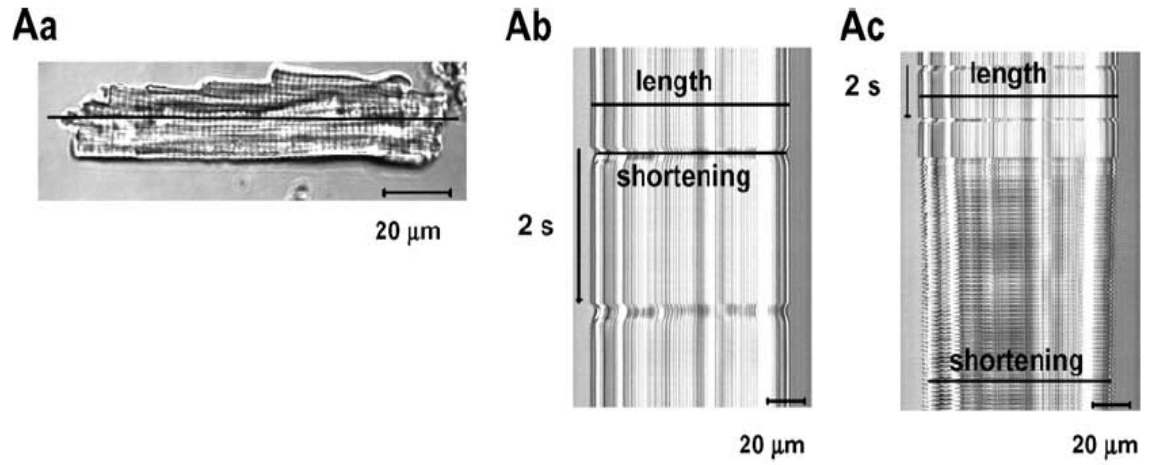


Figure 2

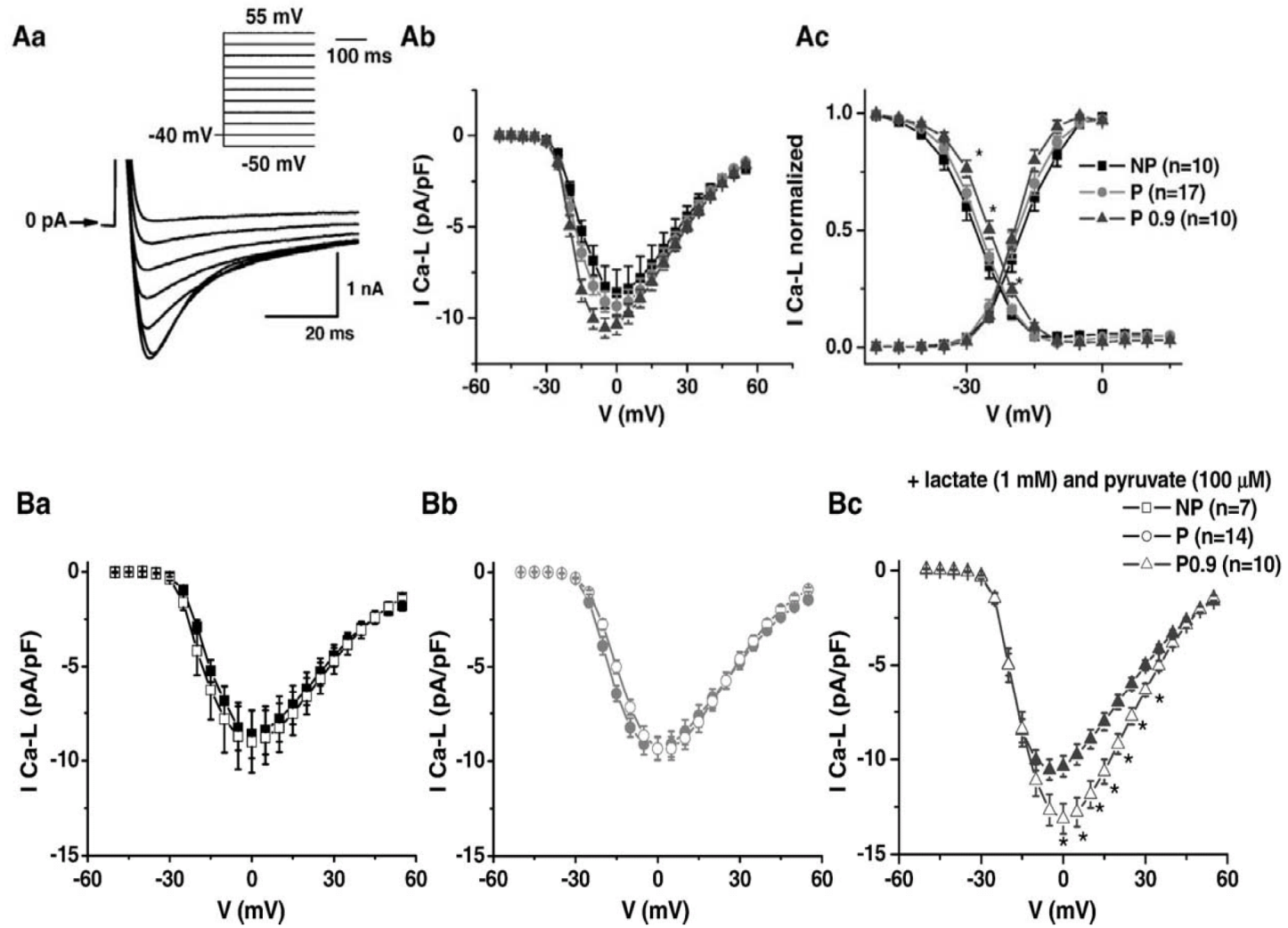


Figure 3

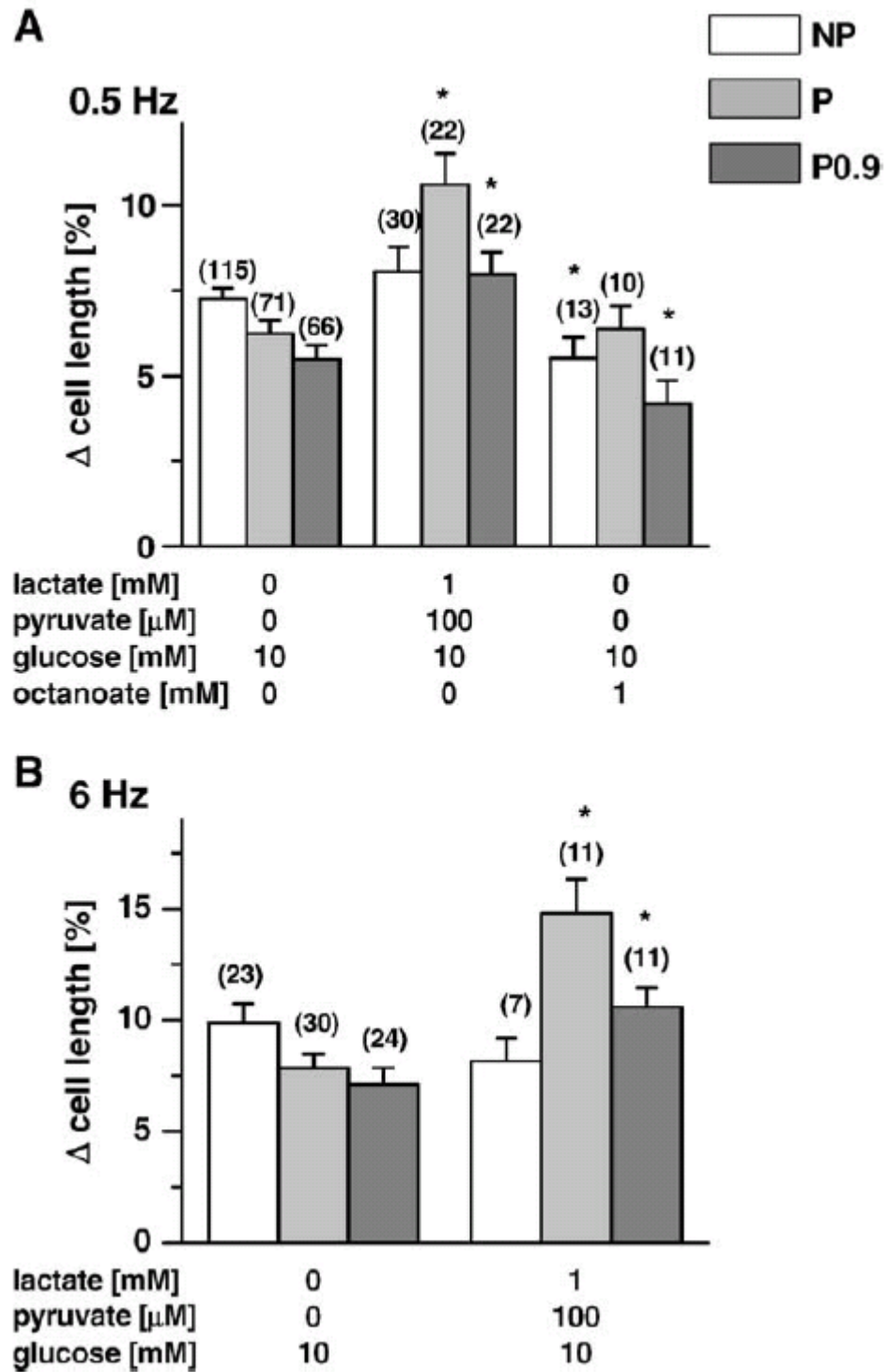


Figure 4

Figure legends

Table I. Whole heart parameters

(A) Body and heart weights were measured. DHW is determined after an overnight drying at 100°C. (B) Echocardiography measurements in anesthetized rats. Data are presented as means \pm S.E.M. (number of animals).

^a p <0.05 vs. P using an ANOVA. * p <0.05 vs. NP using an ANOVA.

Table II. Single cardiomyocyte morphology

Comparison of single cell morphology in cardiomyocytes: $Vol=l*w*d*\pi/4$, $CSA=w*d*\pi/4$, $Ns=l/l_s$; mean \pm S.E.M. (number of cells).

^a p <0.01 vs. P using an ANOVA. * p <0.05 vs. NP using an ANOVA. ** p <0.01 vs. NP using an ANOVA.

Table III. Single cardiomyocyte morphology

Blood metabolites, obtained from total blood collected in fed state; mean \pm SEM (number of samples).

* p <0.05, ** p <0.001 vs NP; # p <0.05 vs P using an ANOVA.

Figure 1. Myocardial and cardiomyocyte structure

(A) 2D-echocardiography picture of a non-pregnant rat heart (Aa). M-mode tracing of the ventricular free-wall movement (Ab). LV: left ventricle, RV: right ventricle, LVF: left ventricular free-wall. (B) 3D representation of an isolated cardiomyocyte loaded with di-8-Anepps (Ba) and detail depicting t-tubular network (Bb). (C) Distribution of mitochondria in single cardiomyocytes imaged using TMRM (Ca) and detail illustrating longitudinally positioned mitochondria (Cb).

Figure 2. Single cardiomyocyte contractions

(A) Example of line-scan-imaged cell contractions induced by field-stimulation in a cardiomyocyte (Aa) at 0.5 Hz (Ab) and 6.0 Hz (Ac). (B) Percentage of change in cell length compared at 0.5 Hz (Ba) and 6 Hz (Bb) in basic external solution; mean \pm S.E.M. (number of cells); *p <0.05 using an ANOVA.

Figure 3. L-type calcium currents

(A) Example of original recording of L-type calcium current recorded at 35 °C using 600 ms voltage pulses, applied from -50 mV to +55 mV from H.P. -40 mV by an increment of 5 mV at a frequency 0.5 Hz with the voltage protocol in the inset (Aa). I/V relationship of I_{Ca-L} density, obtained as a difference between peak and end pulse current values (Ab) and its activation and inactivation (at 0 mV) curves (Ac). (B) Effect of 100 μ mol/L pyruvate and 1 mmol/L lactate on I_{Ca-L} (white symbols) compared to the effect of glucose (dark symbols) in NP (Ba), P (Bb) and P0.9 (Bc); * $p < 0.05$ using an ANOVA.

Figure 4. Effect of metabolite changes on single cell contractility

Cell contractility assessed at (A) 0.5 Hz or (B) 6 Hz in the presence of 1 mmol/L lactate, 100 μ mol/L pyruvate or 1 mmol/L octanoate in basic external solution; mean \pm S.E.M. (number of cells); * $p < 0.05$ using an ANOVA.

Permission to use the figures granted by Oxford Journals as first author of the article (c.f. Annexe I).

ARTICLE 2

**CARDIAC REMODELLING DURING PREGNANCY – THE
ROLE OF MINERALOCORTICOIDS**

Article soumis à Cardiovascular Research

Cardiac Remodelling During Pregnancy – The Role of Mineralocorticoids

Bassien-Capsa V¹, Elzwiei F¹, Aneba S¹, Comte B^{1,2}, Fouron J-C^{1,3}, and Chorvatova A^{1,4}✉

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

²Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand

³Department of Paediatrics, University of Montreal, Montreal, Canada

⁴Department of Biophotonics, International Laser Center, Bratislava, Slovakia

Abbreviated title: Hormonal regulation of heart remodelling during pregnancy.

Correspondence to: **Alzbeta Chorvatova**

International Laser Centre

Ilkovičova 3

841 04 Bratislava

Slovakia

Preuve de soumission

----- Forwarded Message -----

From: Cardiovascular Research <CVR@physiologie.med.uni-giessen.de>

To: alzbeta.chorvatova@ilc.sk; achorvat1968@yahoo.com

Sent: Wed, May 5, 2010 2:11:27 PM

Subject: Manuscript Submission CVR-2010-515

Dear Dr. Chorvatova,

Your submission entitled "Cardiac Remodelling During Pregnancy ? The Role of Mineralocorticoids." has been assigned the following manuscript number: CVR-2010-515. Please use this number in any correspondence concerning your manuscript.

Thank you for submitting your work to this journal.

With best regards,

The Editorial Office
Cardiovascular Research

Abstract

Background: Pregnancy is associated with significant heart remodelling. The regulatory mechanisms involved in morphological and functional cardiac adaptations during pregnancy are still largely unknown. In pathological conditions, mineralocorticoids have been shown to mediate structural as well as functional remodelling of the heart. However, their role in cardiac physiological conditions is not completely understood. Here, we examined the mineralocorticoid involvement in the regulation of cardiac remodelling in the late stages of rat pregnancy.

Methods and Results: Our results revealed that mineralocorticoid receptors (MR) inhibition during pregnancy elicited a significant reduction of heart systolic and diastolic dimensions compared to control pregnant rats, studied by echocardiography. This change was associated with a decrease in cardiac myocyte volume, measured by confocal microscopy. MR inhibition also induced functional alterations during pregnancy. Blood levels of energy substrates, particularly lactate, were decreased. As a consequence, the cardiomyocyte contractile response to these substrates, identified by rapid video-imaging, was blunted, without modifications of L-type calcium current density recorded by patch clamp technique. Interestingly, this response was associated with the change in NAD(P)H levels identified by fluorescence spectroscopy.

Conclusion: This study demonstrates that in pregnancy, mineralocorticoids contribute to both, structural and functional adaptations of cardiac myocytes. By regulating energy substrate levels and metabolic state in the cells, mineralocorticoids affect the contractility responsiveness to these substrates. In the future, understanding cardiac adaptations during pregnancy will help to comprehend their pathophysiological alterations.

Keywords: Pregnancy, mineralocorticoids, cardiomyocyte remodelling, energy metabolism, calcium currents

Introduction

Pregnancy induces significant adaptations of the maternal cardiovascular system. In pregnant women, haemodynamic modifications produce an increased workload for the heart, which undergoes structural remodelling of the left ventricle (LV) [1]. Such changes have also been shown in other mammalian species, such as mice [2] and rats, in our previous study [3].

The crucial role of mineralocorticoids in cardiac remodelling is now well-established. Two clinical trials, the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) [4] and the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) [5], have demonstrated that blockers of the mineralocorticoid receptor (MR) spironolactone and eplerenone reduce significantly the morbidity and mortality in patients with heart failure. The physiological function of MR is principally to mediate the effects of the mineralocorticoid aldosterone, which targets the kidneys to increase sodium and water re-absorption as well as potassium excretion. MR are also expressed in the heart of humans and rodents [6, 7], indicating possible direct actions. In addition, MR possess a high affinity for glucocorticoids [8]. Aldosterone binding to MR is preserved by the enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2); however, its amount is negligible in the heart [9]. Consequently, it is believed that cardiac MR are occupied by glucocorticoids acting as MR antagonists [10]. Glucocorticoid-MR complexes have been proposed to be activated by lowered NADH levels, a determinant of the redox state and/or by reactive oxygen species [11]. In our previous work, we identified in pregnant rats an increased plasma lactate/pyruvate ratio [3], indicating a change in the metabolic redox status. This led us to investigate whether modifications in mineralocorticoids are also involved in metabolic remodelling in pregnancy.

During pregnancy, the foetus has a developmental requirement for glucose. Late pregnancy is, therefore, characterized by post-absorptive hypoglycaemia [12, 13], especially manifest after a fasting period [14, 15]. As a consequence, the heart progressively reduces its glucose utilization [13]. Supporting this fact, we previously observed that the energy substrate utilization of rat cardiac myocytes is modified by pregnancy, as myocytes use lactate and pyruvate rather than glucose [3]. However, the mechanisms involved in these switch processes are still largely unknown. Different studies have reported that gluconeogenesis, occurring mainly in the liver and kidneys, is increased in late pregnancy [14, 16]. Interestingly, Liu *et al.* [17] implicated MR in the regulation of enzymes participating in liver gluconeogenesis, leading us to suggest that they could also contribute to carbohydrate metabolism adaptation during pregnancy.

Based on the known actions of mineralocorticoids on the heart and recent evidence of MR involvement in glucose metabolism, the goals of the present study are: 1) to examine the role of mineralocorticoids in cardiac morphology remodelling during pregnancy, and 2) to establish the impact of mineralocorticoids on metabolic remodelling and their effects on the adaptations of the cardiac function during pregnancy.

Methods

Ethics approval

All procedures were performed in accordance with the NIH and the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines for the care and use of laboratory animals, after evaluation by the local Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques sur les Animaux en Recherche (CIBPAR), accredited by the CCAC.

Animal models

Female Sprague-Dawley rats (13-14 weeks old, Charles River, Canada) were studied. One group of never pregnant (NP) animals served as controls for normally pregnant rats (P). All groups were fed a standard rodent diet (Harlan Teklad, Canada). To determine the role of mineralocorticoids in the regulation of cardiac adaptations, a group of P (P_{can}) and a group of NP (NP_{can}) rats were both treated with a MR antagonist, potassium canrenoate (20 mg/kg/day), in tap water *ad libitum* [18, 19]. Canrenoic acid is one of the major biologically-active metabolites of spironolactone. It has the advantage of being water-soluble, with a longer half-life (≈ 16.5 h) than spironolactone (≈ 1.5 h) [20]. For these reasons, we chose canrenoate treatment to investigate MR-related effects. P_{can} and NP_{can} rats drank on average 39.8 ± 1.1 mL ($n=18$) and 26.2 ± 2.3 mL ($n=8$) respectively, corresponding to a daily canrenoate dose of 21.2 ± 0.5 mg/kg and 18.2 ± 1.9 mg/kg for P_{can} and NP_{can} rats, respectively.

The animals were treated over the last 7 days of pregnancy because glucocorticoids and aldosterone levels in rats rise progressively from the 15th to the last day of pregnancy [21, 22]. Age-matched NP_{can} controls were also treated for 7 days until the day of sacrifice. P rats were euthanized on the 21st day of pregnancy (1 day prior to parturition).

Whole heart study

Echocardiography was performed on isoflurane-anaesthetized rats (2%/L of O₂/min) with a 128XP/10c instrument from Acuson (Mountain View, USA) equipped with a 7-MHz transducer. LV fractional shortening was calculated as [(diastolic-systolic)/diastolic dimensions].

For comparative purposes, body weight (BW) of P rats was defined as BW without the weight of the placenta and foetuses. Dry heart weight (HW) was quantified after overnight drying at 100°C.

Blood analyses

Blood was analyzed as described previously [3]; in brief, blood was collected promptly after decapitation. Samples were processed within 24h and analyzed by standard enzymatic methods [23]. For pyruvate measurement, blood specimens were treated with 5% trichloroacetic acid and immediately vortexed for 2min. After each sample was centrifuged for 4min at 10,000×g, the supernatant was collected and immediately frozen at -20°C. Pyruvate was subsequently quantified by standard enzymatic assay in the Clinical Biochemistry Laboratory at CHU Sainte-Justine.

Cell isolation

LV myocytes were isolated after retrograde perfusion of the heart with proteolytic enzymes [24]. Myocytes were maintained in storage solution at 4°C until used. Only cardiac myocytes showing clearly-defined striations and edges were studied.

Confocal microscopy

3D ultrastructure of isolated cells was investigated by di-8-ANEPPS staining (5 μmol/L for 5min at room temperature) using confocal microscopy, as previously described [25]. Three-dimensional images were taken by LSM 510 inverted laser scanning confocal microscope

(Plan Neofluar 63×/1.3 oil, 488nm Ar/ion, LP505, Zeiss, USA) and recorded by averaging 4 lines with 1.2- μm steps in z-stack (pinhole opening of 417 μm , scaling 0.16 μm × 0.16 μm).

Cell contractions

Contractions were recorded by rapid video-imaging with a camera (A602f with CMOS sensor, 100fps, Basler, USA) and BCAM 1394 driver, while custom-based Cell Analyser software was employed for line-scan recording and data analysis. Cells were field-stimulated to induce contractions by Pt electrodes operated by a pulse stimulator (DS-2A, Digitimer Ltd., USA) and a trigger generator (DG-2, Digitimer Ltd.). Experiments were carried out under external perfusion at 35±1°C. Only cells with two contracting edges were taken into consideration. Cell contraction was calculated as a percentage of Δ cell length = [(maximal length - maximal shortening)/maximal length].

Electrophysiology

Myocytes were voltage-clamped with Axopatch 200B patch clamp amplifier linked to a Digidata 1200B A/D interface. Membrane currents were measured by the perforated patch clamp method with Amphotericin B (240-480 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as perforating agent [3]. The cells were pre-incubated in the presence of BAPTA-AM (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ for 15 min) prior to the patch-clamp experiments. Currents were acquired by Clampex 9 and analyzed with Clampfit 9 from the pClamp package (Axon Instruments, USA). Micropipettes were produced from filamented borosilicate glass GC150TF (Harvard, Canada) with pipette puller (PP-830, Narishige, Japan) and polisher (MF-830, Narishige) to give tip resistances of 1 M Ω when filled with standard physiological solution (in mmol/L: CsCl, 130.0; CaCl₂, 1.0; NaCl, 10.0; HEPES, 10.0 adjusted to pH 7.25 with CsOH). All measurements were taken at 35±1°C.

NAD(P)H fluorescence

NAD(P)H fluorescence was measured by spectrally-resolved time-correlated single photon counting (TCSPC), as described previously [26]. In brief, a 375-nm picosecond laser diode (BDL-375, Becker&Hickl, Boston Electronics, USA) was used as an excitation source with ~1 mW output power. The laser beam was reflected to the sample through the epifluorescence path of the Axiovert 200M (Zeiss, Canada) inverted microscope. The emitted fluorescence was separated from laser excitation by 395nm dichroic and 397nm long-pass filter and detected by 16-channel photomultiplier array (PML-16, Becker&Hickl, Boston Electronics) via an imaging spectrograph (Solar 100, Proscan, Germany). To avoid artefacts induced by photobleaching, data were always evaluated from the first scan of each cell (measured for 30s at 16 spectral channels simultaneously). Fluorescence intensity was evaluated as total photon counts.

Solutions and drugs

The storage solution contained (in mmol/L): NaCl, 130.0; KCl, 5.4; MgCl₂·6H₂O, 1.4; NaH₂PO₄, 0.4; creatine, 10.0; taurine, 20.0; glucose, 10.0; and HEPES, 10.0; titrated to pH 7.30 with NaOH. The basic external solution contained (in mmol/L): NaCl, 140.0; KCl, 5.4; CaCl₂, 2.0; MgCl₂, 1.0; glucose, 10.0; HEPES, 10.0; adjusted to pH 7.35 with NaOH. CsCl (5 mmol/L) was added to the solution for L-type calcium current (I_{Ca-L}) measurements.

Pyruvate was freshly prepared, while lactate was added to basic external solution from stock solution (100 mmol/L, pH 7.2). The final concentrations were 100 μmol/L of pyruvate and 2 mmol/L of lactate.

All chemicals were from Sigma (Canada), whereas the fluorescent probe di-8-ANEPPS was from Molecular Probes (USA).

Data analysis

The data are reported as means±standard error of the means (SEM). Means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-tests, except for I_{Ca-L} , where Tukey post-tests were used. Data were collected from at least 3 different animals/group.

Results

Whole heart

First, we examined changes in whole heart parameters after treatment with potassium canrenoate (Table IA). Treatment had no significant effect on HW, as wet and dry HW were comparable in all groups. At the same time, inhibition of MR abolished in P_{can} the decrease in the wet/dry HW ratio observed in P compared to NP, indicating a possible role of MR in cell volume regulation. In addition, BW in both treated groups was higher than in the controls.

Echocardiographic measurements revealed that while LV dimensions or wall thickness were not affected in P (Table IB), LV diastolic and systolic dimensions were significantly decreased in P_{can} compared to P. In fact, canrenoate effects reached significance only during pregnancy. LV wall thickness was not significantly modified in the treated groups *vs* their controls.

Cell morphology

Cell morphology was studied after recording 3D confocal images of cardiac myocytes stained with the membrane probe di-8-ANEPPS. Our previous observation [3] of cell volume in P being significantly increased in comparison to NP was confirmed (Table II). This hypervolemia resulted from cell elongation and enlargement. Concordant with whole heart dimensions, cell volume was decreased in P_{can} , mainly due to reduced cell width. Membrane capacitance, an indicator of the total cell surface, was also measured by patch-clamp technique [3]. This parameter was not modified in P_{can} , indicating that mineralocorticoids affect cell size during pregnancy most likely via processes regulating water and salt balance. Altogether, the morphological investigation supported a role of MR in structural remodelling of the heart during pregnancy.

Metabolism

Late pregnancy is characterized by a post-absorptive hypoglycaemic state [13], which is especially manifest during fasting in women [14] and rats [15]. We have previously shown [3] that in late pregnancy post-absorptive hypoglycaemia was associated with changes in plasma levels of lactate and pyruvate, which are key glycolytic metabolites and also gluconeogenic substrates. With pregnancy, lactate concentrations were significantly elevated, leading to a higher lactate/pyruvate ratio, an indicator of the metabolic redox status. Plasma triglyceride levels were also increased by pregnancy. To evaluate MR involvement in these metabolic adaptations, glucose, lactate, pyruvate as well as triglyceride levels were measured in the canrenoate-treated groups.

Our results revealed that MR inhibition had significant effects on lactate levels (Table III). In both NP_{can} and P_{can} rats, plasma lactate levels dropped significantly in comparison to NP and P controls, respectively, indicating that MR can contribute to carbohydrate metabolism regulation but also in adaptation to pregnancy. Pyruvate levels, although not significantly modified, tended to decrease in these groups and, consequently, the lactate/pyruvate ratio remained unchanged. Interestingly, there was no effect on glycemia in NP_{can} and P_{can} rats. Increased triglyceride levels during pregnancy were not affected in P_{can} rats, reinforcing the idea of MR involvement in carbohydrate metabolism adaptations.

Contractility

In our previous study, we showed that cardiac myocytes use lactate and pyruvate rather than glucose as energy substrates for contraction during normal pregnancy [3]. Here, we tested the influence of MR inhibition on cardiomyocyte contraction, determined as cell shortening and recorded in either standard external solution with glucose (10 mM) or after 10-min perfusion of glucose buffer solution supplemented with lactate (2 mM) and pyruvate (100 μ M); concentrations chosen to match the blood ones (Table 3).

Cardiomyocyte contractility was assessed by rapid video-imaging in response to field stimulation at 0.5 Hz frequency, which allows stabilization of sarcoplasmic reticulum loading (see original recording at Fig. 1Ab). MR inhibition during pregnancy did not affect the contractile response when evaluated in the glucose-based conditions only (Fig. 1B). However, it prevented the contractility increase observed in normal pregnancy in the presence of lactate and pyruvate (Fig. 1B). These results suggest that MR are involved in the transition of energy substrate utilization in pregnancy: from glucose to lactate and pyruvate. In NP_{can}, MR inhibition had no significant effect on cell contractility in either metabolic condition (Fig. 1B); consequently, it seems specific to pregnancy.

Calcium currents

I_{Ca-L} are the main entry of calcium ions during cardiomyocyte contraction. To determine whether the described differences in contractility could underlie modifications in I_{Ca-L} , these currents were isolated in Cs-based solutions by applying voltage steps of 600 ms from -50 to +55 mV with a 5 mV increment at a frequency of 0.5 Hz (see Fig. 2A inset). Holding potential was -40 mV.

In agreement with our previous study [3], we observed no change in I_{Ca-L} density in the presence of lactate/pyruvate compared to glucose in NP or P rats (Fig. 2A & 3A). In P_{can}, however, we noted significantly decreased I_{Ca-L} density in glucose vs lactate/pyruvate conditions (Fig. 3B). The difference was not related to modifications in activation or inactivation properties, as normalized density curves were not altered (Fig. 3C). Interestingly, in P_{can}, lactate and pyruvate increased I_{Ca-L} density to values comparable to those in P, suggesting that MR are not involved in I_{Ca-L} regulation in this metabolic condition. As a result, cell contractility changes induced by MR inhibition are not likely to originate from I_{Ca-L} modifications (Fig. 1B).

It is noteworthy that comparison in glucose-based conditions revealed that I_{Ca-L} density in P_{can} was lower than in P (Fig. 3D), implying that MR may rather intervene in I_{Ca-L} regulation elicited by glucose. As mentioned above, cell contractility was not altered in P_{can} in the presence of glucose (Fig. 1B) and, therefore, decreased I_{Ca-L} density was not sufficient to affect the contractile response to glucose. In NP_{can} rats, MR inhibition had no significant influence on I_{Ca-L} density (Fig. 2C) showing that the observed effects are specific of pregnancy.

NAD(P)H fluorescence

Metabolic state plays a crucial role in the regulation of contractility in cardiac cells. NAD(P)H has extensively been used for non-invasive fluorescence probing of the metabolic state; we therefore investigated NAD(P)H levels and their responsiveness to the presence of lactate/pyruvate, as compared to glucose only. NAD(P)H was measured directly in living cardiac cells (Fig. 4A) as spectrally-resolved cell autofluorescence excited by 375 nm laser [27]. Emission peak at 450 nm (Fig. 4B), as well as the fluorescence sensitivity to metabolic regulators (data not shown) confirmed NAD(P)H origins of the autofluorescence. Our results revealed no significant effect of the lactate/pyruvate on NAD(P)H fluorescence in NP (Fig. 4B) or in NP_{can} (Fig. 4D). Importantly, lactate/pyruvate significantly increased NAD(P)H levels in P (Fig. 4C), and this rise was blunted in P_{can} (Fig. 4E).

Discussion

Pregnancy represents a particular situation where the heart has to accommodate its structure and function to support the growth of the foetus. The regulatory mechanisms involved in these cardiac adaptations are still largely unknown. Therefore, the goal of our study was to determine whether mineralocorticoids can contribute to cardiac adaptations to pregnancy at both the structural and functional levels. Our principal findings are that: (1) during pregnancy, MR inhibition affected the heart's morphology by inducing a significant decrease in systolic and diastolic dimensions; (2) this was associated with a reduction in cell volume of LV myocytes; (3) MR inhibition also elicited metabolic and functional changes: blood levels of energy substrates, particularly lactate, were diminished; (4) consequently, the cardiomyocyte contractile response to these substrates was significantly blunted; (5) this decreased responsiveness was associated with NAD(P)H rather than I_{Ca-L} changes.

Role of mineralocorticoids in structural remodelling of the heart in late pregnancy

Pregnancy is associated with structural remodelling of the heart. Our results support mineralocorticoid involvement in pregnancy-induced cardiac remodelling. Indeed, MR inhibition led to a significant decline of cell volume, mainly caused by reduced cell width. This was in agreement with a significant decrease in LV diastolic and systolic dimensions. Our previous data [3] already identified the decrease in wet/dry HW in pregnancy. The present contribution confirmed this finding, primarily related to modifications in wet HW, which can be explained by changes in water and salt retention accompanying pregnancy. In addition, reduced cell volume without change in the membrane capacitance in P_{can} also supports water and salt osmotic modifications. Our data disclosed that the role of MR in LV myocytes is exclusive to pregnancy. Indeed, in NP_{can} rats, MR inhibition did not induce the same effects. The BW was increased in treated groups when compared to their controls. This result is not in agreement with another study where female rats were treated with the

same dose of canrenoate but for a longer period without changes in BW [28]. However, in this study we used Sprague-Dawley rats and they use Wistar rats. It is envisageable that canrenoate treatment affects salt appetite in our animals, which leads to an increased ingestion of normal diet and water.

Cardiac adaptations to metabolic/energy substrate changes in late pregnancy

In the heart, metabolism and function are very closely related, as the heart possesses limited energy stores. As a consequence, cardiac function is highly dependent on exogenous energy supply. During pregnancy, metabolism plays a pivotal role in cardiac remodelling as the heart must adapt its functioning to the metabolic changes induced by this condition. Our previous data [3] point to little effect of fatty acid oxidation on changes in cardiomyocyte contractility in pregnancy. In addition, in this contribution, we noted no effect of canrenoate on plasma level of triglycerides, despite its significant rise in pregnancy. On the other hand, canrenoate significantly lowered the lactate levels in the blood. For these reasons, we focused primarily on studying the effects of carbohydrate metabolites, namely the lactate and pyruvate. Indeed, glucose is quantitatively the most important substrate transferred to the placenta and, therefore, normal pregnancy is associated with decreased post-absorptive glycaemia. As a consequence, it was reported in rat pregnancy that to spare glucose for the foetus, the heart and skeletal muscles of the mother progressively diminish their glucose utilization with a maximum effect reached in late pregnancy [13]. Congruent with this study, our previous work demonstrated that such metabolic adaptation translated into a change in contractility at the cellular level: in pregnancy, cardiomyocytes consumed lactate and pyruvate rather than glucose as energy fuel for contraction [3]. Our present results show that MR contribute to this functional adaptation and this can happen by at least two ways: heightening the availability of lactate and pyruvate in the plasma and promoting their use for cardiomyocyte contraction.

To the best of our knowledge, it is the first time that the interrelationship of lactate, pyruvate, mineralocorticoids and cardiac functioning during pregnancy has been addressed. Regarding lactate, our results show that MR contribute to pregnancy-induced increase in lactate levels. Maternal lactate levels are dependent on placental and foetal metabolism. Indeed, it has been shown that in late pregnancy the human foetus produces lactate, which is partly ($\approx 2/3$) transferred to the mother and partly ($\approx 1/3$) metabolized by the placenta [29]. This corroborates our results that maternal lactate levels are increased in late pregnancy, despite a decrease in glucose use previously described [13]. Lactate transport is facilitated by symporters namely H^+ -monocarboxylate transporters (MCT) and varies according to its concentration gradient. Different MCT isoforms have been characterized in human and rat placenta [30, 31]. Interestingly, other studies have proved that MR are expressed in placenta [32, 33], suggesting that one possible mechanism whereby MR could influence lactate plasma levels is by targeting its carriers, which could lead to enhanced lactate efflux toward maternal plasma, and therefore be part of mechanisms protecting the foetus against lactate acidosis. As for pyruvate, its levels had a tendency to increase in pregnancy and MR are not likely to be involved in its regulation. It is assumable that pyruvate is metabolized by the foetus and the placenta, and therefore less pyruvate is transferred back to the mother. Such results could also be explained by rapid interconversion between lactate and pyruvate catalyzed by erythrocyte lactate dehydrogenase, which has been proposed to occur in mammalian blood [34].

Role of mineralocorticoids in functional cardiomyocyte changes during late pregnancy

The most efficient way to increase cell contractility is to raise intracellular calcium concentrations. I_{Ca-L} are the principal entry for exogenous Ca^{2+} ions into cardiac myocytes. As observed in our previous study, in pregnancy, I_{Ca-L} were not modified in the presence of glucose or lactate and pyruvate [3]. Therefore, I_{Ca-L} were not responsible for increased contractility in the presence of lactate and pyruvate. MR inhibition in pregnant rats revealed a difference in the regulatory effects of glucose, lactate and pyruvate on I_{Ca-L} . Indeed, I_{Ca-L}

density was not significantly modified by pyruvate and lactate compared to normal pregnancy. Although data suggest that MR could interfere with glucose regulation of I_{Ca-L} , and consequently prevent I_{Ca-L} decrease to maintain cardiac functioning during pregnancy, changes in I_{Ca-L} density cannot explain MR-sensitive contractility responsiveness to lactate and pyruvate.

On the other hand, lowered NADH levels were proposed to play a role in activating glucocorticoids-MR complexes [11]. In addition, the correlation between changes in metabolic state, studied as cell endogenous fluorescence, and contractility is well documented [35]. We therefore investigated the possible role of NAD(P)H in the contractility responsiveness to lactate and pyruvate. Our data revealed that, in pregnancy, lactate/pyruvate increased both, the contractility and the NAD(P)H levels. Such result corroborates an inotropic effect of pyruvate, where an increased pyruvate and NADH production is resulting from higher consumption of lactate and NAD. This responsiveness, which does not exist in NP, was blunted by MR inhibition. Consequently, gathered data strongly suggest that the regulation of metabolic state, rather than that of I_{Ca-L} currents is responsible for the observed effects of lactate/pyruvate in pregnancy and that mineralocorticoids play a role in this regulation.

MR inhibition can lead to modification in the responsiveness of cardiomyocyte contractility to metabolic/energy substrates via different mechanisms. The fate of lactate and pyruvate and their known effects on the heart can provide the basis for understanding their functional relationship with mineralocorticoids. Under certain conditions that demand high myocardial energy, such as physical exercise, glycolysis is stimulated to improve tissue ATP concentrations [36]. Therefore, lactate enters cardiac myocytes through sarcolemmal MCT in humans and rats [37]. Halestrap *et al.* [38, 39] have suggested that lactate transporters may be working at a level close to maximal capacity in the working heart. Increase in MCT

activity and/or expression can be one mechanism used by MR to facilitate the entry of lactate into cardiac myocytes.

Other studies in isolated hearts indicate that pyruvate inotropism is dependent on mitochondrial metabolism; indeed, pyruvate is oxidized in the heart to produce ATP via the Krebs cycle and, then, oxidative phosphorylation in the mitochondria [40]. Consequently, pyruvate induces an increase in cytosolic phosphorylation potential, i.e [ATP]/[ADP] [41, 42], which improves the efficiency of ATP-dependent processes involved in contraction, such as Ca^{2+} -activated myosin ATPase, and actin-activated myosin ATPase, and therefore enhance cardiac contractility. This effect of pyruvate could be another mechanism responsible for the MR-sensitive contractility increase observed in pregnancy.

Altogether, our results point to the fact that the effect of mineralocorticoids on blood energy substrate levels affect cardiomyocyte contractility responsiveness via modification of the cell mitochondrial metabolism.

Conclusions

To our knowledge, this study is one of the first to examine mineralocorticoid participation in cardiac adaptive remodelling in pregnancy. Our results provide evidence of mineralocorticoid contribution at the structural and functional levels. At the structural level, mineralocorticoid effects consist of changes in cell volume in correlation with decreased systolic and diastolic dimensions. At the functional level, we identified that mineralocorticoid effects on contractility go through actions on blood energy substrates, namely lactate, via regulation of mitochondrial NAD(P)H levels. In the last decade, maternal cardiac function was studied in normal and complicated pregnancies, where LV geometry and its changes were shown to be valuable predictors of adverse outcomes in hypertensive pregnant women. Therefore, it is important to identify and characterize the

regulatory mechanisms involved in cardiac remodelling during normal pregnancy to understand their alteration in pathological conditions.

Acknowledgements

This study was supported by grants to AC from Fonds de la recherche en santé du Québec (No. 2948), the Canadian Institutes Health Research (MOP 84450), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. VB-C received a studentship from the CHU Sainte-Justine Foundation and a studentship of excellence from the Department of Physiology of the University of Montreal.

A. Whole heart parameters					
	Unit	NP	NPcan	P	Pcan
Total weight	g	N.A	N.A	358.0 ± 3.7 (20)	377.0 ± 5.6(19)
Placenta+fetus weight	g	N.A	N.A	78.9 ± 1.9 (20)	80.4 ± 2.1 (19)
Number of fetuses		N.A	N.A	14 ± 1 (20)	13 ± 1 (19)
Body weight	g	284.6 ± 3.3 (26)	298.6 ± 4.7 (13)*	279.1 ± 3.4 (20)	296.6 ± 4.6 (19) #
Wet HW	mg	851 ± 18 (26)	872 ± 25 (13)	814 ± 16 (20)	830.0 ± 17 (19)
Dry HW	mg	231.0 ± 5.8 (26)	240.2 ± 7.7 (13)	231.4 ± 6.5 (20)	228.1 ± 5.4 (19)
Wet HW/ Dry HW		3.79 ± 0.07 (26)	3.64 ± 0.04 (13)	3.53 ± 0.04 (20) *	3.65 ± 0.04 (19)
B. Echocardiography parameters					
Systolic dimensions	cm	0.30 ± 0.03 (9)	0.26 ± 0.02 (6)	0.31 ± 0.03 (13)	0.21 ± 0.02 (8) #
Diastolic dimensions	cm	0.56 ± 0.03 (9)	0.49 ± 0.04 (6)	0.56 ± 0.03 (13)	0.43 ± 0.05 (8) #
Fractional shortening	%	46.0 ± 3.3 (9)	46.2 ± 1.4 (6)	47.2 ± 3.0 (13)	49.9 ± 2.3 (8) #
LV wall thickness	mm	1.48 ± 0.24 (9)	1.81 ± 0.21 (6)	1.34 ± 0.07 (13)	1.58 ± 0.15 (8)

Table I

Parameter	Unit	NP	NPcan	P	Pcan
Length	μm	107.5 ± 1.6 (63)	104.9 ± 3.0 (26)	116.8 ± 2.4 (68) *	119.1 ± 2.6 (51) †
Width	μm	20.9 ± 0.7 (63)	23.5 ± 1.0 (26) *	29.5 ± 1.1 (68) *	26.2 ± 0.9 (51) #
Depth	μm	18.5 ± 0.5 (63)	17.0 ± 0.5 (26)	17.4 ± 0.4 (68)	16.3 ± 0.5 (51)
Volume	pL	31.9 ± 1.3 (63)	32.6 ± 1.7 (26)	47.6 ± 1.8 (68) *	38.9 ± 1.6 (51) #;†
Cross-sectional area	μm^2	297.7 ± 11 (63)	315.2 ± 17 (26)	408.7 ± 14 (68) *	326.3 ± 11 (51) #
Length/width		5.6 ± 0.3 (63)	4.7 ± 0.3 (26) *	4.2 ± 0.2 (68) *	4.9 ± 0.2 (51) #
Cell capacitance	pF	129.1 ± 3.8 (111)	131.6 ± 4.1 (62)	132.1 ± 4.4 (92)	131.9 ± 4.6 (84)

Table II

Parameter	Unit	NP	NPcan	P	Pcan
Glucose	mM	14.3 ± 0.8 (9)	14.8 ± 0.7 (6)	8.3 ± 0.9 (8) *	7.1 ± 0.5 (8) †
Lactate	mM	1.6 ± 0.2 (9)	1.0 ± 0.2 (6) *	2.8 ± 0.2 (8) *	2.0 ± 0.2 (8) #†
Pyruvate	μM	104.8 ± 16.2 (9)	92.0 ± 13.8 (6)	124.2 ± 13.1 (8)	101.9 ± 12.2 (8)
Lactate/pyruvate		16.4 ± 1.5 (9)	11.9 ± 2.3 (6)	23.8 ± 1.8 (8) *	20.3 ± 1.2 (8) †
Triglycerides	mM	1.47 ± 0.16 (9)	1.56 ± 0.28 (6)	3.49 ± 0.49 (8) *	3.95 ± 0.44 (8) †

Table III

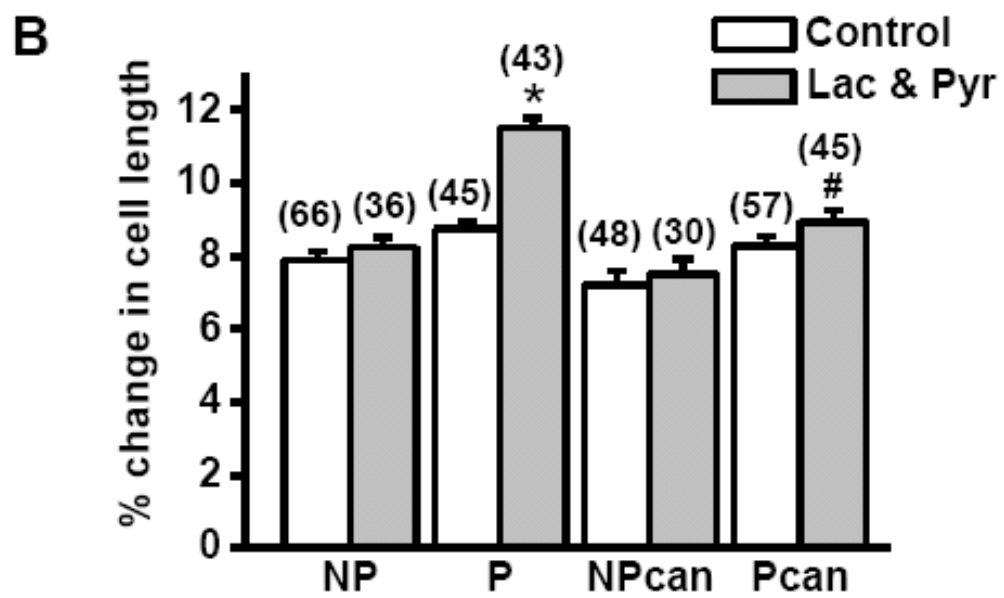
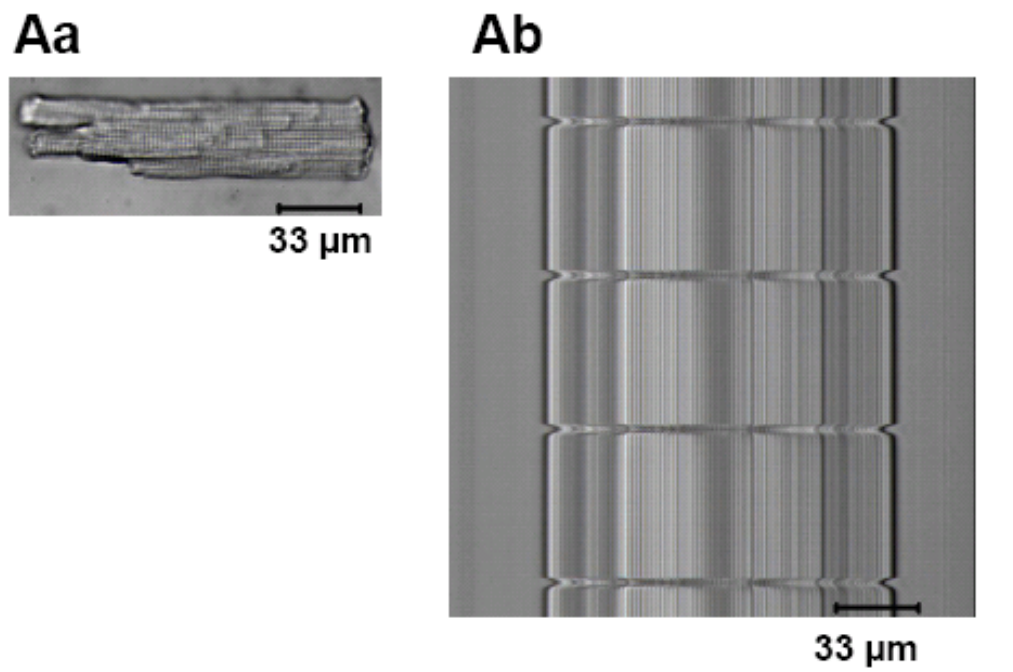


Figure 1

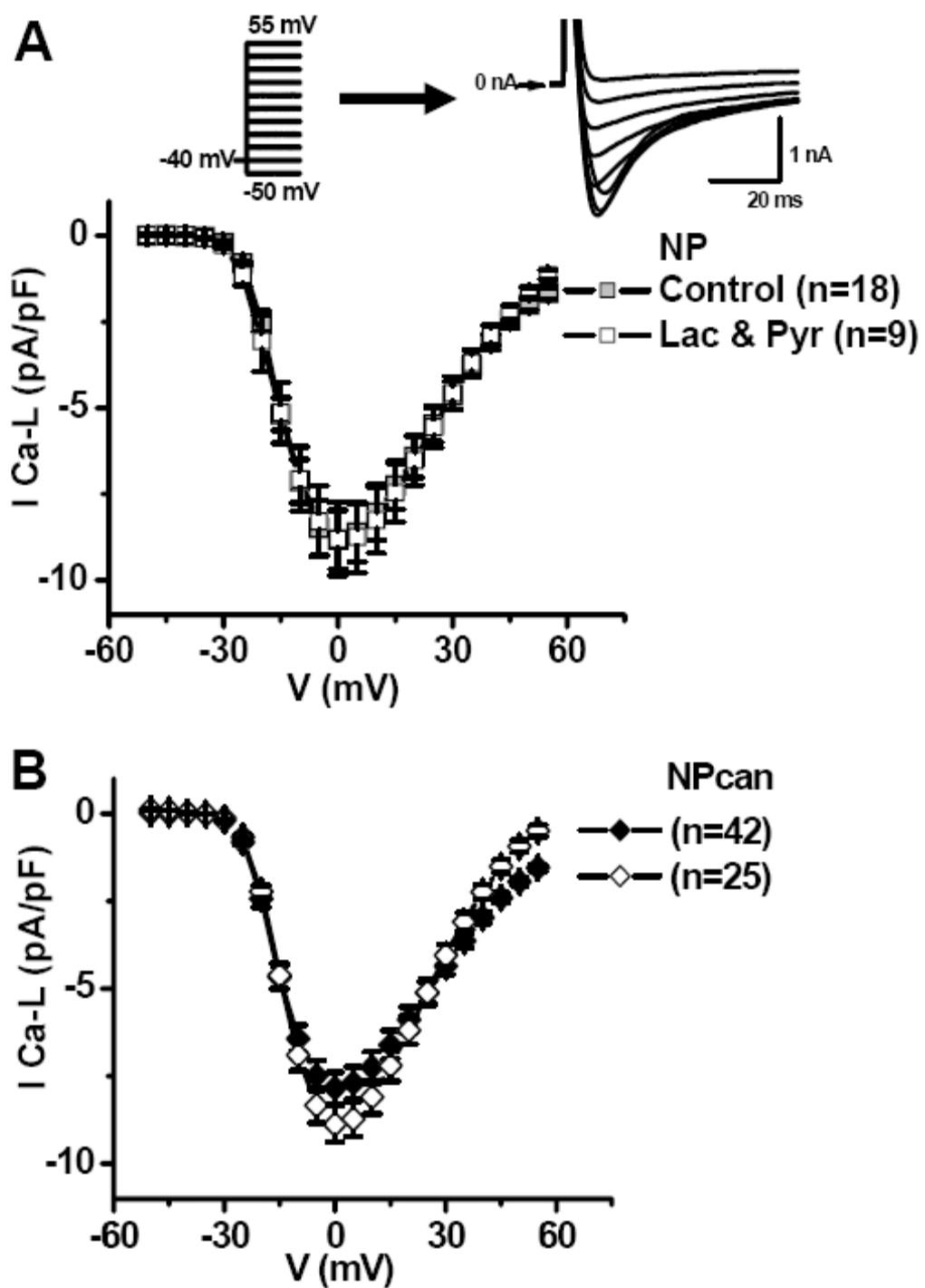


Figure 2

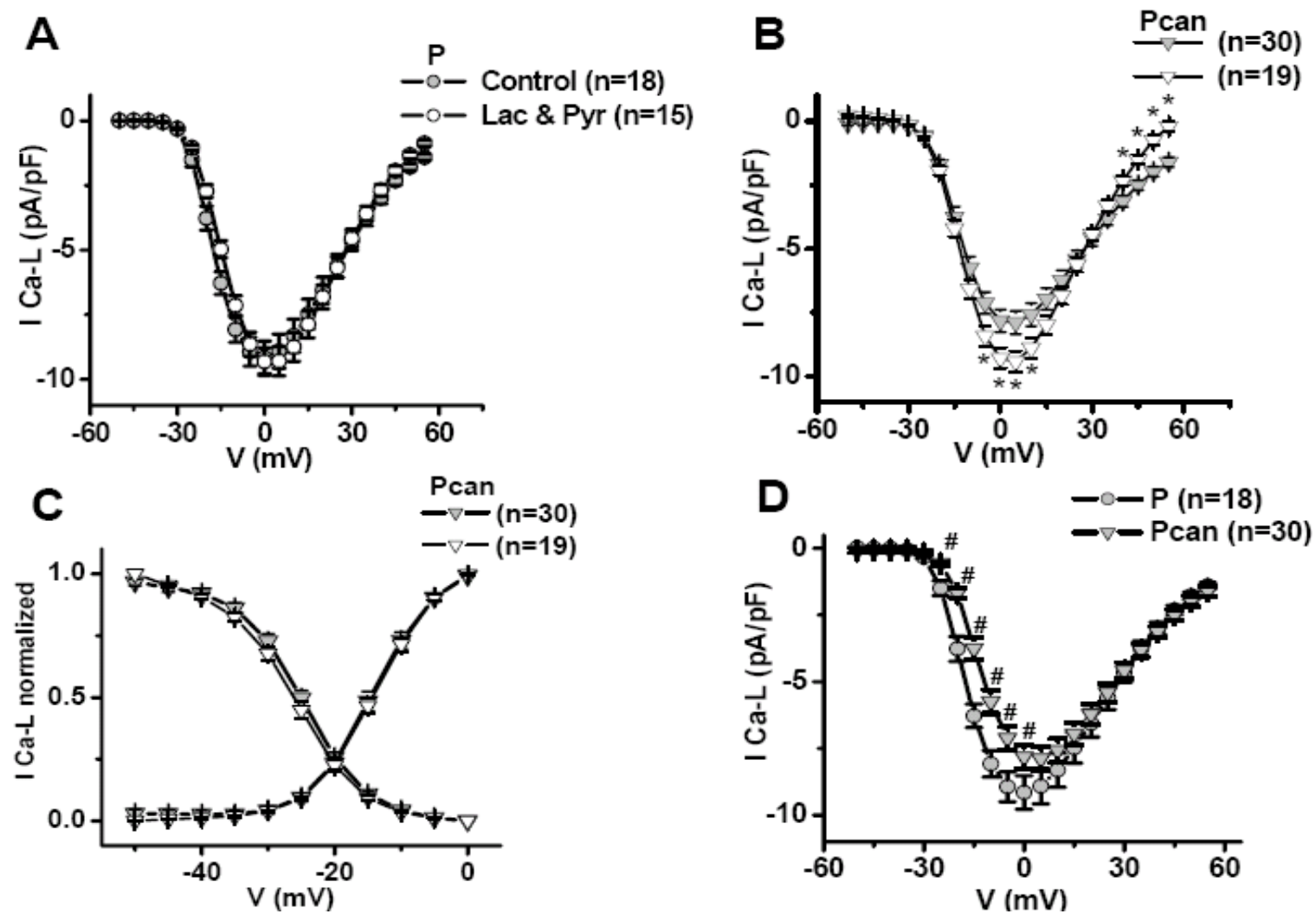


Figure 3

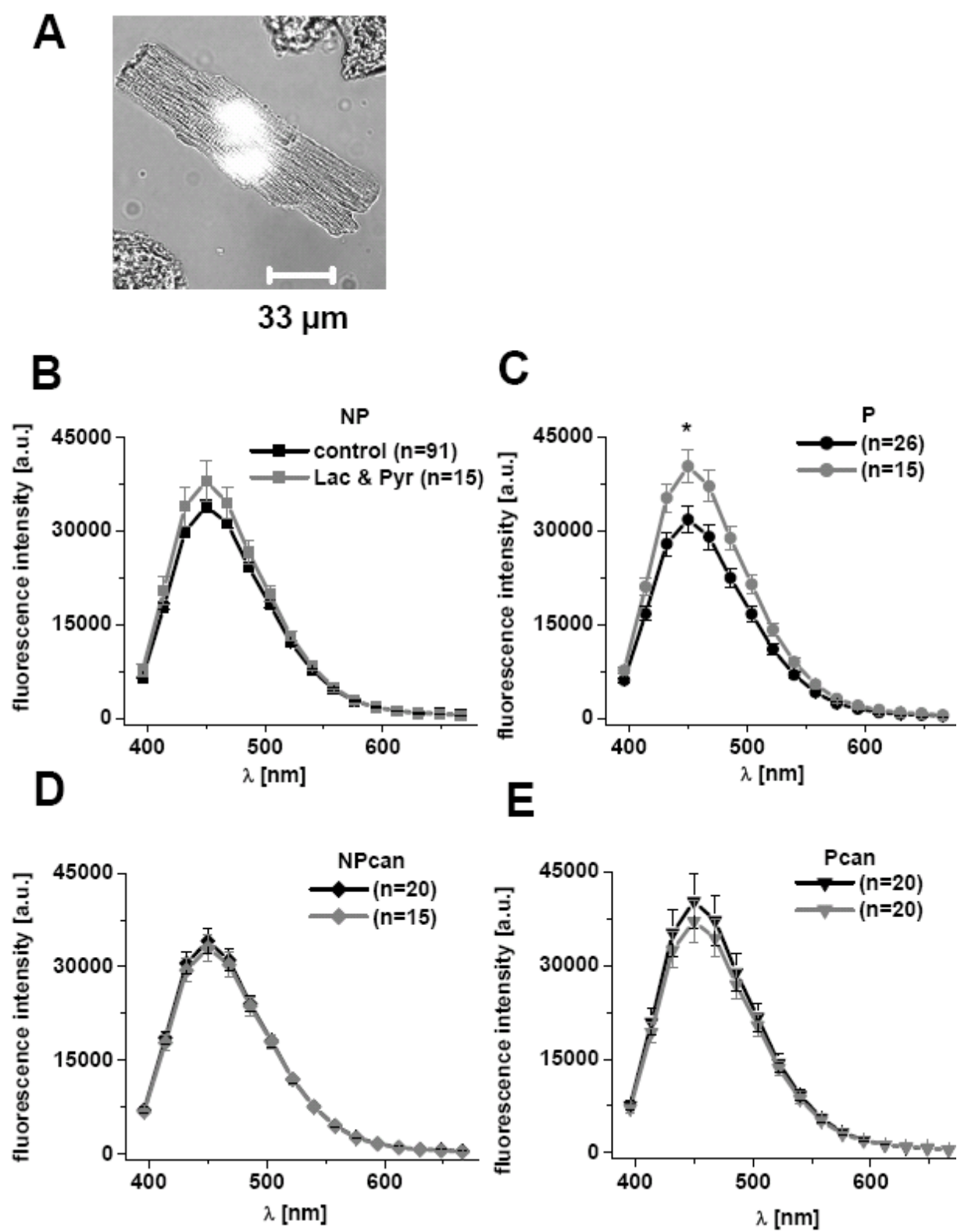


Figure 4

Figure legends

Table I. Animal size and whole heart parameters

A. HW was measured and compared to BW in non-pregnant rats, control (NP) and canrenoate-treated (NP_{can}), as well as in pregnant rats, normal (P) and canrenoate-treated (P_{can}). B. Echocardiography recordings in anaesthetized animals. BW: body weight; HW: heart weight; LV: left ventricle; the numbers represent the number of animals; * $p < 0.05$ vs. NP; # $p < 0.05$ vs. P.

Table II. Left ventricle myocyte morphology

Cell morphology was studied by confocal microscopy; the numbers represent the cell number. Cell volume and cross-sectional area were estimated by the following equations:

$$\text{Cell volume} = \text{length} * \text{width} * \text{depth} * \pi / 4$$

$$\text{Cross-sectional area} = \text{width} * \text{depth} * \pi / 4$$

Cell capacitance was measured by patch-clamp technique; * $p < 0.05$ vs. NP; # $p < 0.05$ vs. P; † $p < 0.05$ vs. NP_{can} .

Table III. Plasma metabolite levels

Plasma samples were collected in the fed state; the numbers represent the number of animals; * $p < 0.05$ vs. NP; # $p < 0.05$ vs. P; † $p < 0.05$ vs. NP_{can} .

Figure 1. Cardiac myocyte contractions

A. Example of a cardiac myocyte (a) and its contractions induced by field-stimulation at 0.5 Hz. (b). B. Cell contractility was measured in the presence of glucose (10 mM) alone or supplemented by lactate (2.0 mM) and pyruvate (100 μ M); the numbers represent the cell number. The percentage of change in cell length was determined as: [(maximal length - maximal shortening)/maximal length]; * $p < 0.05$ vs. NP; # $p < 0.05$ vs. P.

Figure 2. Cardiac myocyte L-type calcium currents (I_{Ca-L}). I_{Ca-L} were recorded in the presence of glucose (10 mM) alone (grey symbols) or supplemented by lactate (2.0 mM) and pyruvate (100 μ M) (open symbols). A. The original recording of I_{Ca-L} and the applied voltage protocol are presented in the inset. Comparison of I_{Ca-L} density in both conditions: A. in NP (squares), B. in NP_{can} (diamonds).

Figure 3. I_{Ca-L} in pregnant rat cardiac myocytes. I_{Ca-L} were recorded in the presence of glucose (10 mM) alone (grey symbols) or supplemented by lactate (2.0 mM) and pyruvate (100 μ M) (open symbols) (see applied protocol in Fig.2). A. Comparison of I_{Ca-L} density in both conditions in P. B. I_{Ca-L} density in P_{can} . C. Normalized current activation (ascending) and inactivation (descending) curves in P_{can} in both metabolic conditions. D. Comparison of I_{Ca-L} density in P (circles) and P_{can} (triangles) groups in the presence of glucose. The numbers represent cell number; [#] $p < 0.05$ vs. P.

Figure 4. NAD(P)H fluorescence. Fluorescence intensity, evaluated as total photon counts was recorded in the presence of glucose (10 mM) alone (black symbols) or supplemented by lactate (2.0 mM) and pyruvate (100 μ M) (grey symbols). A. Representative image of the illumination of a single cardiac myocyte. Comparison of the fluorescence intensity B. in NP, C. in P (circles), D. in NP_{can} , and D. in P_{can} . The numbers represent cell number; * $p < 0.05$ vs. NP.

References

- [1] Mone SM, Sanders SP, Colan SD. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation* 1996;94:667-72.
- [2] Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96:1208-16.
- [3] Bassien-Capsa V, Fouron JC, Comte B, Chorvatova A. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc Res* 2006;69:423-31.
- [4] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
- [5] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
- [6] Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987;14:859-66.
- [7] Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994;135:834-40.
- [8] Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237:268-75.
- [9] Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 2006;47:656-64.
- [10] Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93:69-76.
- [11] Funder JW. RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:121-5.
- [12] Leturque A, Hauguel S, Revelli JP, Burnol AF, Kande J, Girard J. Fetal glucose utilization in response to maternal starvation and acute hyperketonemia. *Am J Physiol* 1989;256:E699-E703.

- [13] Holness MJ, Changani KK, Sugden MC. Progressive suppression of muscle glucose utilization during pregnancy. *Biochem J* 1991;280 (Pt 2):549-52.
- [14] Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, O'Brien A. Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *J Clin Invest* 1997;100:1775-81.
- [15] Cacho J, Sevillano J, de CJ, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1269-E1276.
- [16] Zorzano A, Herrera E. Effects of anesthetics and starvation on in vivo gluconeogenesis in virgin and pregnant rats. *Metabolism* 1984;33:553-8.
- [17] Liu G, Grifman M, Keily B, Chatterton JE, Staal FW, Li QX. Mineralocorticoid receptor is involved in the regulation of genes responsible for hepatic glucose production. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1291-6.
- [18] Araki T, Shimizu M, Yoshio H, Ino H, Mabuchi H, Takeda R. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and aldosterone antagonist on myocardial collagen in cardiomyopathic hamsters. *Jpn Circ J* 1995;59:213-8.
- [19] Bos R, Mougenot N, Mediani O, Vanhoutte PM, Lechat P. Potassium canrenoate, an aldosterone receptor antagonist, reduces isoprenaline-induced cardiac fibrosis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:1160-6.
- [20] Karim A. Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev* 1978;8:151-88.
- [21] Mark PJ, Augustus S, Lewis JL, Hewitt DP, Waddell BJ. Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: impact on placental corticosterone levels and regulation by progesterone. *Biol Reprod* 2009;80:1209-15.
- [22] Brochu M, Lehoux JG, Picard S. Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 1997;138:2354-8.
- [23] Williamson DH, Mellanby J. *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press; 1974, p. 1836-43.
- [24] Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M. Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 2005;565:197-205.
- [25] Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am J Physiol* 1999;277:H603-H609.
- [26] Chorvat D, Jr., Chorvatova A. Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes. *Eur Biophys J* 2006;36:73-83.

- [27] Cheng Y, Dahdah N, Poirier N, Miro J, Chorvat D, Jr., Chorvatova A. Spectrally and time-resolved study of NADH autofluorescence in cardiac myocytes from human biopsies. *Proceedings of SPIE* 2007;6771:677104-1-677104-13.
- [28] Jonassen TE, Promeneur D, Christensen S, Petersen JS, Nielsen S. Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with chronic aldosterone-receptor blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F246-F256.
- [29] Piquard F, Schaefer A, Dellenbach P, Haberey P. Lactate movements in the term human placenta in situ. *Biol Neonate* 1990;58:61-8.
- [30] Alonso de la Torre SR, Serrano MA, Alvarado F, Medina JM. Carrier-mediated L-lactate transport in brush-border membrane vesicles from rat placenta during late gestation. *Biochem J* 1991;278 (Pt 2):535-41.
- [31] Settle P, Mynett K, Speake P, Champion E, Doughty IM, Sibley CP et al. Polarized lactate transporter activity and expression in the syncytiotrophoblast of the term human placenta. *Placenta* 2004;25:496-504.
- [32] Driver PM, Kilby MD, Bujalska I, Walker EA, Hewison M, Stewart PM. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes and corticosteroid hormone receptors in primary cultures of human trophoblast and placental bed biopsies. *Mol Hum Reprod* 2001;7:357-63.
- [33] Hirasawa G, Takeyama J, Sasano H, Fukushima K, Suzuki T, Muramatu Y et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1306-9.
- [34] Romijn JA, Chinkes DL, Schwarz JM, Wolfe RR. Lactate-pyruvate interconversion in blood: implications for in vivo tracer studies. *Am J Physiol* 1994;266:E334-E340.
- [35] Chorvat D, Jr., Cagalinec M, Bassien-Capsa V, Comte B, Chorvatova A. Are changes in mitochondrial redox state, measured using autofluorescence, correlated with modifications in cell shortening? A study in single cardiomyocytes. *Biophysical Journal* 2004;86:297a.
- [36] Bergman BC, Tsvetkova T, Lowes B, Wolfel EE. Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *J Physiol* 2009;587:2087-99.
- [37] Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006;31:31-9.
- [38] Poole RC, Halestrap AP, Price SJ, Levi AJ. The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J* 1989;264:409-18.
- [39] Wang X, Levi AJ, Halestrap AP. Kinetics of the sarcolemmal lactate carrier in single heart cells using BCECF to measure pHi. *Am J Physiol* 1994;267:H1759-H1769.

- [40] Mallet RT. Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:136-48.
- [41] Mallet RT, Bungler R. Energetic modulation of cardiac inotropism and sarcoplasmic reticular Ca²⁺ uptake. *Biochim Biophys Acta* 1994;1224:22-32.
- [42] Mallet RT, Sun J. Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res* 1999;42:149-61.

ARTICLE 3

**THE ROLE OF MINERALOCORTICOID RECEPTORS IN THE REGULATION OF
CARDIAC REPOLARIZATION IN LATE PREGNANCY**

(article en préparation)

The role of mineralocorticoid receptors in the regulation of cardiac repolarization in late pregnancy

Authors:

Bassien-Capsa Valérie.¹ Chorvatova Alzbeta.^{1,2*}

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

²Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

* To whom correspondence should be addressed:

Dr. Alzbeta Chorvatova, Ph.D.

Current address: Department of Biophotonics

International Laser Centre

Ilkovičova 3

841 04 Bratislava

Slovak Republic

Abstract

Large gaps remain in the knowledge of adaptations of cardiac cell electrical properties in normal pregnancy and their regulatory mechanisms, crucial for the comprehension of heart alterations in pathological pregnancies. Here, we therefore examined the involvement of mineralocorticoid receptors (MR) in the regulation of cardiac repolarization in the late stages of rat pregnancy. Lead I electrocardiograms were recorded on anesthetized animals. Potassium currents were studied in left ventricle cardiomyocytes by patch-clamp technique. Our results revealed that normal pregnancy induced a prolongation in QTc interval, which correlates with a decrease in the density of the transient outward current (I_{to}) and of the inwardly rectifying current (I_{K1}). Potassium canrenoate, a MR antagonist, administered to pregnant rats, prevented the lowering of I_{to} induced by normal pregnancy, but did not significantly modify I_{K1} . Sustained outward current (I_{sus}) was unaltered in all studied conditions. Our data indicate that, in normal pregnancy, MR activation is involved in the regulation of I_{to} , but not of I_{K1} or I_{sus} . In perspective, gathered data will provide a new insight into understanding of the role of mineralocorticoid actions in cardiovascular adaptations in pregnancy.

Keywords: Pregnancy, mineralocorticoid receptors, potassium currents, cardiomyocyte remodeling.

Running title: Hormonal regulation of potassium currents in pregnancy.

Introduction

Pregnancy is a particular physiological condition, which induces major hemodynamic adaptations necessary for fetal homeostasis and well-being. These adaptations are characterized by a fall in blood pressure and total peripheral resistance, together with an increase in cardiac output and heart rate. The resulting volume increase induces adaptations of the heart that affects mainly the left ventricle (LV), leading to LV hypertrophy (LVH) [1]. Our previous work in Sprague-Dawley rats showed an adaptive hypertrophic remodeling of the LV in normal pregnancy also observable at the cellular level [2].

Clinical studies have demonstrated that hormones can be major contributors to cardiac remodeling. Two major clinical trials, Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) [3] and Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) [4] demonstrated that the mineralocorticoid receptor (MR) blockers spironolactone and eplerenone significantly reduced morbidity and mortality in patients with heart failure. Furthermore, both mRNA and protein levels of MR have been found in rodent as well as in human hearts [5, 6], indicating possible direct actions on the heart. The MR is a member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors. It mediates the effects of the mineralocorticoid aldosterone, which plays an important role in the balance of fluids and electrolytes.

It is also noteworthy that the MRs also possess high affinity for glucocorticoids and progesterone [7, 8], and in pregnancy, levels of these three hormones are increased. This has been observed in humans [9-11] as well as in rats [12, 13]. To preserve the binding specificity of aldosterone to MR, some organs have the capacity to convert glucocorticoids to receptor-inactive products by the 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β -HSD2); however the amount of 11β -HSD2 is almost negligible in the heart [14]. In cardiovascular non-epithelial tissue, MRs are therefore proposed to be occupied by glucocorticoids, blocking, rather than activating MRs [15]. A novel mechanism for non-epithelial MR activation has been proposed by Funder et al. [16], suggesting that glucocorticoid-MR complexes can be activated by lowering NADH levels, an important

determinant of the redox state, and/or by generation of reactive oxygen species. Confirming this hypothesis, numerous studies show that elevations in circulating aldosterone are accompanied by a pro-inflammatory/fibrogenic vascular phenotype [17]. This pathological response being blocked by both spironolactone and anti-oxidants indicates MR-mediated aldosterone-induced oxidative stress [17]. In addition, up-regulation of NAD(P)H gene expression and activity seems to play a role in aldosterone-induced cardiovascular injury through MR [18].

Interestingly, in our previous work, we have identified in normal pregnant rats an increased plasma lactate/pyruvate ratio, which indicates an oxidative redox status, [2]. This ratio was decreased in our model of gestational hypertension induced by high-sodium diets (also characterized by decreased aldosterone blood levels [12]). We can suppose that in normal pregnancy, changes in the cell redox state may be responsible for MR-glucocorticoids complexes activation. Consequently, hormonal changes that occur during pregnancy may be a factor determining heart remodeling during pregnancy.

It is now well-established that hypertrophy of cardiac cells is correlated with the change of cell electrical properties [19]. In pregnant women, myocardium structural changes are observed together with the modulation of its electrical properties, such as prolonged QT interval normalized to heart rate (QTc), and modifications in ventricular repolarization and depolarization patterns [20]. These findings suggest the possible involvement of potassium currents in pregnancy-induced heart remodeling.

Reduced density of the transient outward potassium current (I_{to}) is one of the most consistent ionic current changes in cardiac pathological hypertrophy [19], mostly observed in pathological situations. Recent work with the use of mouse model shows that pregnancy-related heart hypertrophy also presents this characteristic, and estrogen involvement was demonstrated in this decrease [21]. This study proves that in pregnancy hormones can also regulate cardiac electrical remodeling. The MRs have also been shown to be involved in cardiac electrical remodeling in pathological conditions. Indeed, MR antagonism was reported to down-regulate I_{to} expression in two different rat models of heart hypertrophy [22].

Despite investigations of the role of MR in the heart remodeling in pathological conditions, very little is known on their involvement in the physiological heart regulation, such as in conditions of pregnancy. In this contribution, we have therefore examined the possible involvement of MRs in the regulation of repolarization during pregnancy-induced heart remodeling.

Methods

Ethics approval

All procedures were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were evaluated by the local committee, Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques sur les Animaux en Recherche (CIBPAR), accredited by the CCAC.

Animal models

Female Sprague-Dawley rats (13-14 weeks old, Charles River, St-Constant, QC, Canada) were used in this study. One group of never pregnant (NP; n=18) rats served as controls for normally pregnant rats (P; n=16). To determine the role of MR in the regulation of potassium currents, a group of pregnant rats was treated with a MR antagonist, potassium canrenoate, also known as canrenic acid potassium salt (20 mg/kg/day), in tap water *ad libitum* (P_{can}; n=11). Canrenic acid is, one of the major biologically active metabolites of spironolactone. Moreover, canrenic acid has the advantage to be water soluble and has a longer half-life value (≈ 16.5 hours) than spironolactone (≈ 1.5 hours) [23]. For these reasons, we have chosen the treatment with canrenoate to investigate MR-related effects. Animals were treated for the last 7 days of pregnancy because, in rats, a rise in aldosterone levels is apparent from the 14th day of pregnancy [24], effect which is accompanied by gradually decreasing blood pressure [12]. The rats were sacrificed by decapitation on the 21st day of pregnancy (1 day prior to parturition).

Cardiac Measurements

Electrocardiograms (ECGs) were recorded under face mask anesthesia (1.5-2% isoflurane/O₂) using needle electrodes (29g). Lead I ECGs were acquired using the Dual bio amp amplifier and Power lab/8SP analog-digital converter. ECG parameter values were averaged from representative 10 to 20 s recording periods. QT intervals were corrected for heart rates according to the Bazett's formula: Corrected QT (QT_C) = QT Interval / $\sqrt{\text{RR interval}}$ [25]. All equipment was from ADInstruments (Colorado Springs, CO, USA).

Isolation of cardiomyocytes

Left ventricular myocytes were isolated following retrograde perfusion of the heart with proteolytic enzymes: collagenase type II using 42-45 mg/ 50 ml (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and protease XIV using 2-3 mg/ 50 ml (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in low CaCl_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) at 36 ± 1 °C [2]. The pellets of myocytes were resuspended in an enzyme-free isolation solution containing 750 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 . Myocytes were maintained in this storage solution at 4°C until used. Only cells that showed clearly defined striations and edges were used in up to 10 hours following isolation.

Electrophysiology

Myocytes were pre-incubated with BAPTA-AM (10 $\mu\text{mol/L}$) for 15 min in the storage solution at room temperature, prior to all recordings. An aliquot of myocytes was then placed in a recording chamber (volume ~500 μL) mounted on the stage of an inverted microscope. After allowing the myocytes to settle to the bottom of the chamber, the storage solution was replaced by continuous superfusion of the external solution (see Solutions for details).

The patch-clamp technique was performed on voltage-clamped myocytes using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA) linked to a Digidata 1200B A/D interface (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Currents acquisition and analyse was performed using Clampex 9 and Clampfit 9 softwares respectively (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Micropipettes were fabricated from filamented borosilicate glass GC150TF (Harvard, St-Laurent, QC, Canada) using PP-830 pipette pooler (Narishige, Tokyo, Japan) and were heat polished by a MF-830 microforge (Narishige, Tokyo, Japan) to give tip resistances of 1 $\text{M}\Omega$ when filled with standard KCl filling solutions. Membrane currents were recorded by the perforated patch-clamp method using amphotericin B (240 $\mu\text{g/mL}$) as the pore-forming agent. The holding potential (HP) for the recordings was -40 mV, as used previously by Chorvatova & Hussain [26]. Recorded currents were plotted against voltage and normalized for membrane capacitance for each cell to compare the current density in all studied experimental

conditions. Current/voltage (I/V) relationships were not corrected for junction potential. All measurements were undertaken at 35 ± 1 °C.

Solutions

The physiological salt solution for myocytes isolation and storage contained (in mmol/L): NaCl, 130; KCl, 5.4; MgCl₂.6H₂O, 1.5; NaH₂PO₄, 0.4; creatine, 10; taurine, 20; glucose, 10; and HEPES, 10; titrated to pH 7.30 with NaOH. It was supplemented with CaCl₂ for different stages of the isolation procedure, as described above.

The basic external solution perfused on single myocytes during recording contained (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 2; MgCl₂.6H₂O, 1; glucose, 10; HEPES, 10; adjusted to pH 7.35 with NaOH. CdCl₂, at final concentration of 300 µmol/L, was added to this solution to inhibit L-type Ca²⁺ currents. The pipette-filling solution contained (in mmol/L): KCl, 20; NaCl, 10; L-glutamic acid, 120; CaCl₂, 1; HEPES, 10; adjusted to pH 7.25 with KOH. Amphotericin B was added to the solution as described above. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard error (SEM). Cells from at least 3 different animals were compared in each condition. Means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Cardiac electrical properties in pregnancy and the role of MRs

We recorded ECG from anesthetized rats. In normal pregnancy, P rats showed a significant prolongation of the QTc interval compared to NP rats. The QTc interval was increased from 174.2 ± 3.2 ms (n=5) to 189.8 ± 3.7 ms (n=5) (Table I). Interestingly, MR antagonism in pregnancy prevented the QTc interval prolongation observed in normal pregnancy. Indeed, the value of QTc was shorter when compared to P: 169.8 ± 3.7 ms (n=5). These results imply that MRs are involved in the regulation of cardiac ventricle repolarization during pregnancy.

Heart rate was also significantly increased in pregnancy when compared to non-pregnant rats: 371 ± 11 beat/min (n=5) in P vs 334.2 ± 10.4 beat/min (n=5) in NP. This parameter was not significantly modified by MR antagonism in pregnancy, with a value of 356.2 ± 11 beat/min (n=5), pointing to the fact that changes in electrophysiological properties are rather underlying the MR effect on QTc interval prolongation.

Electrophysiological measurements

Membrane capacitance was measured by applying 10 mV-hyperpolarizing pulses from HP. Normal pregnancy did not significantly modify the membrane capacitance: 132.1 ± 4.4 pF (n=92) in P rats vs 129.1 ± 3.8 pF (n=111) in NP rats. The treatment with canrenoate in pregnancy did not affect this parameter with a value of 131.9 ± 4.6 pF (n=84) in P_{can} rats.

Transient outward potassium current (I_{to}) in pregnancy and the role of MR

We applied conventional double-pulse protocols to investigate changes in the voltage-dependence of I_{to} in late stages of normal pregnancy. Myocytes isolated from P rat hearts were compared to those obtained from age-matched NP rats. Membrane potential was stepped up from -80 to +80 mV (HP -40 mV) in 10-mV increments for a pulse duration of 800 ms and at a frequency 0.2 Hz (see inset in Fig.1A). I_{to} was isolated from the original recordings (Fig.1A), as I_{peak} (peak current) – I_{sus} (sustained outward potassium current). I_{sus} was observed at the end of a

square voltage step and measured exactly at 600 ms. Four-aminopyridine (4-AP; 5 mmol/L) added in the extracellular perfusion [26] completely abolished I_{to} (Fig.1B), confirming its transient and outward nature.

Our results revealed that I_{to} adaptation to normal pregnancy in rats is characterized by significantly reduced density (Fig.1C). This result corroborates the prolongation of QTc observed in P rats. The current/voltage relationship, normalized to maximum values recorded in each cell at +80 mV (Fig.1D), showed no significant difference in I_{to} activation between P and NP rats.

Inactivation being a hallmark of I_{to} in the heart, the steady-state inactivation properties were also investigated: the same voltage protocol was applied, but the cell was then depolarized from -40 to +50 mV for 100 ms to assess the degree of current inactivation (see arrow in Fig.1A). Figure 1E depicts normalized I_{to} plotted as a function of the pre-pulse potential and fitted by Boltzmann approximation. The obtained inactivation curve was not significantly different in the two conditions.

To evaluate changes in the time-dependent decay of I_{to} , we also determined the time-constant of decay, τ_{decay} , from a mono-exponential fit (Fig.2A). Our data showed that τ_{decay} was not significantly altered in normal pregnancy: when values found at +40 to +80 mV (Fig.2B) were averaged, we estimated τ_{decay} to be 15.2 ± 0.1 ms (n=19) and 13.7 ± 0.2 ms (n=11) in NP and P rats, respectively. Furthermore, to assess the time-dependence of reactivation, we measured I_{to} recovery from inactivation (Fig.2C). We applied a double-pulse protocol with a variable interpulse duration [27]. The cells were depolarized by two steps from -60 mV (HP) to +50 mV. The first step of 300 ms was undertaken to induce I_{to} maximal activation. The second step evoked the current at ascending time intervals for a duration of 125 ms and a frequency of 0.2 Hz. This step indicated the fraction of channels recovered from inactivation (Fig.2b). The time course was fitted by a biexponential function. No significant changes in fast and slow time constants were found between the two groups: $\tau_{fast} = 29.0 \pm 3.3$ ms and $\tau_{slow} = 508 \pm 135$ ms (n=13) in NP rats and $\tau_{fast} = 12.9 \pm 1.6$ ms and $\tau_{slow} = 495 \pm 145$ ms (n=12) in P rats (Fig.2b). Resolved τ_{fast} was comparable to the 31-ms value, reported previously for female rats [28], while

τ_{slow} value was \approx 4-fold lower in our study. This could be attributed to the higher temperature used in our experiments 35°C compared to 22-26°C. Taken together, our data indicate that adaptation of I_{to} to pregnancy is not related to changes in channel electrophysiological properties, but that diminished I_{to} density is more likely resulting from a reduction in the number of functional channels in the cell membrane and/or their opening probability.

MR antagonism by canrenoate (P_{can} group) prevented the decrease of I_{to} density induced by normal pregnancy (Fig.3A). Interestingly, I_{to} density in this group was similar to that in the NP group. This result correlates with changes in the value of QTc interval in this group, which was shorter than the QTc value recorded in normal pregnancy, and comparable to QTc values found in NP (Table1). Treatment with canrenoate did not produce alterations in voltage-dependent activation (Fig.3B), or in its inactivation properties (Fig.3C). Canrenoate also did not affect τ_{decay} (Fig.3D) and the time constants of recovery after inactivation (Fig.3E). The absence of changes in electrophysiological properties of the channel strongly points to MR being rather involved in the modulation of channel expression or of single channel properties, more particularly open probability, during pregnancy.

Sustained outward potassium current (I_{sus}) in pregnancy and MR antagonism

We also investigated possible modifications of I_{sus} in pregnancy. I_{sus} is a background current remaining at the end of long depolarising voltage steps. I_{sus} was identified as the current at the end of the same pulse applied to activate I_{to} (Fig.1A). Characterised by slow activation and lack of inactivation, it is blocked by tetraethylammonium (TEA) ions [29, 30]. As expected, in the presence of 4-AP, TEA (5.4 mmol/L) in the extracellular perfusion, lowered the end-pulse current (Fig.1B). Normal pregnancy did not affect I_{sus} (Fig.1F), and neither did MR antagonism in pregnant (Fig.3F) or non-pregnant rats (Fig.4F). The small current that remained after inhibition by TEA was not different between groups (results not shown). These results demonstrate that I_{sus} density is maintained in normal pregnancy and that MR are not likely to be involved in the current regulation in this condition.

Inwardly rectifying (I_{K1}) potassium current during pregnancy and the role of MR

In cardiomyocytes, I_{K1} contributes to the terminal phase of repolarization [31]. The current is characterized by marked inward rectification with a small outward current component between -60 and -20 mV. To assess possible modifications of I_{K1} in pregnancy, descending voltage ramps were applied from +80 mV to -120 mV from HP -40 mV at the rate of 100 mV/sec and at the stimulation frequency of 0.1 Hz (Fig.5A). Application of $BaCl_2$ (1.0 mmol/L) in the extracellular perfusion [26] completely inhibited both the inward and the outward component of I_{K1} (Fig. 5A). The current was, therefore, determined as the difference in the absence and presence of barium. We observed a significant decrease in the density of barium-sensitive I_{K1} current in myocytes from P rats: -7.5 ± 1.3 pA/pF (n=14) vs -13.5 ± 1.8 pA/pF (n=15) in NP rats (Fig. 5B).

MR antagonism did not reverse the reduced density of this current in pregnancy (Fig. 5C). In the P_{can} group, I_{K1} density at -120 mV was found to be -5.6 ± 0.6 pA/pF (n=14). This value was not significantly different from the one in P rats. This result indicates that MRs are not likely to be involved in the regulatory mechanisms underlying I_{K1} pregnancy-induced decrease. Moreover, this shows that I_{K1} decrease is not a major contributor to the prolonged repolarization in pregnancy, otherwise the shortening of the QTc interval duration induced by MR antagonism would have been only partial.

Discussion

Despite growing knowledge of the molecular changes that occur during pathological heart hypertrophy, the mechanisms underlying physiological pregnancy-related heart adaptations are still largely unknown.

In our previous work, we identified adaptive hypertrophic LV remodeling in rat pregnancy [2]. Hypertrophic remodeling of the myocardium is usually associated with modifications of its electrical properties. Here, we focused primarily on the modifications of cardiac repolarization in late pregnancy, and the role of MRs in this regulation. Our major findings are: (1) a prolongation of QTc interval in normal pregnancy, which is reversed by MR antagonism, (2) I_{to} density is decreased in normal pregnancy, and MR antagonism prevented this effect, (3) I_{K1} current is reduced in normal pregnancy, but MR antagonism is not involved in this regulation.

Heart electrical properties in pregnancy

The QT interval on the ECG represents the time during which the ventricles are depolarized, and consequently, a modification in the QT interval represents a change in the processes underlying ventricular repolarization. In our study, QTc (QT interval corrected for heart rate) was significantly prolonged in normal pregnancy, implying a longer duration of ventricular electrical activity. This characteristic was previously observed in late pregnancy, in mice [21], as well as in pregnant women [20].

The regulation mechanisms involved in this myocardial adaptation are still largely unclear. Gender-based studies demonstrated that QTc duration can be influenced by sexual hormones. Although conflicting results exist regarding the role of female hormones, some clinical findings imply that cyclical changes in levels of these hormones affect the repolarization. Indeed, clinical evidence suggests that progesterone has protective effects against prolonged QT-associated arrhythmias by shortening ventricular depolarization. A recent study found that repolarization duration is shorter in the luteal phase than in the follicular phase [32]. Regarding the effects of estrogens on QTc intervals in women, the response came from hormone replacement therapy

(HRT) in postmenopausal women. Indeed, in postmenopausal women, while HRT with progestin and estrogens has no significant effects on QTc intervals, estrogens alone have been associated with an increase in QTc duration [33, 34].

The influence of other steroid hormones on repolarization has not yet been investigated in pregnancy. Our study is the first to show that MR inhibition in pregnant rats can prevent QTc prolongation observed in normal pregnancy, demonstrating MR involvement in adaptation of cardiac repolarization to pregnancy. MR inhibition in non-pregnant rats did not affect QTc compared to control rats (data not shown). This suggests that in the physiologic non-pregnant condition sexual hormones, more particularly progesterone, have more influence on QTc regulation than MRs. Consequently, taken together, these results show that MR contribution to QTc prolongation is a characteristic of pregnancy.

A modification in the QT interval implies MR-induced changes in the processes underlying ventricular repolarization, which is mainly controlled by potassium currents. Moreover, potassium channels are well-known targets for long-term control of excitability by physiological stimuli, as their changes are often seen in hypertrophic remodelling [35]. For these reasons, we explored modifications in potassium currents in late pregnancy, and possible role of MRs in this action.

Adaptation of potassium currents to pregnancy

I_{to} is the major repolarizing current in ventricular myocytes that dominates the onset of repolarization. Its reduction is one of the most consistent ionic current changes in pathological cardiac hypertrophy [35] and leads to action potential prolongation. In the rat LV, the different I_{to} subtypes were assigned distinct time-constants of current decay [36]; the fast ($I_{to,f}$), encoded by Kv4.2/4.3 genes, is characterized by a τ_{decay} close to 25 ms and the slow ($I_{to,s}$), encoded by Kv1.4, is defined by a τ_{decay} of 100-200 ms. In the preparation of LV myocytes from NP rats, we identified I_{to} with a τ_{decay} close to 15 ms, indicating that we are more likely dealing with $I_{to,f}$.

The present study revealed that decreased I_{to} density accompanied the adaptive cardiomyocyte remodeling that we identified previously in normal pregnancy [2]. This has also been observed in the mouse heart in late pregnancy [21], pointing to the fact that reduced I_{to} density in pregnancy-induced cardiac hypertrophy is likely a species-independent necessary for heart adaptation to pregnancy. This result substantiates the prolongation of QTc interval observed in normal pregnancy in our experiments. In addition, this mechanism, common among species, possibly underlies the slowed ventricular repolarization patterns observed in pregnant women [20].

The other outward potassium current studied, I_{sus} , was not modified by normal pregnancy. Similar results were observed in other types of cardiac hypertrophy [37, 38], including spontaneously hypertensive rats [39, 40], where I_{to} density was reduced, while I_{sus} remained unchanged. The absence of I_{sus} changes in other models of hypertrophy is in agreement with our observation that this current is not likely to have a strong impact on cardiomyocyte remodeling in pregnancy. Being a background current, which activates slowly but does not inactivate [30], I_{sus} is important for the transition between the plateau phase and the action potential late repolarization phase. As pregnancy is characterized by slowed ventricular repolarization patterns [20], modification of this current is not likely to be a mechanism contributing to heart adaptations to pregnancy.

The density of the inwardly-rectifying I_{K1} current that sets the resting membrane potential and plays an important role in the terminal phase of repolarization [31], was significantly decreased in pregnancy. I_{K1} reduction with the development of cardiac hypertrophy has been observed previously in diseased hearts [37, 38, 41]. However, our findings are the first to demonstrate that the I_{K1} diminution also accompanies the physiological heart remodeling induced by pregnancy. As I_{K1} promotes the late phase of repolarization, the reduction noted in our study could also explain the slowed ventricular repolarization patterns in pregnant women [20].

Role of MR in the regulation potassium currents

In this study, we have focused on the role of MRs in the potassium current regulation in pregnancy. Our results show that MR antagonism with canrenoate prevented the decrease in I_{to} density induced by normal pregnancy. This effect was also observed in two different models of heart pathological hypertrophy, myocardial infarction and abdominal aortic constriction [22], where MR antagonist RU 28318 blunted the down-regulation of I_{to} in rat cardiomyocytes. Our results therefore show, for the first time, that in the physiological condition of pregnancy, MR activation is important for the adaptation of cardiac electrical properties. In addition, current density in the canrenoate-treated group was similar to that in non-pregnant rats, reinforcing the importance of MR involvement in the adaptive regulation of I_{to} in pregnancy. Furthermore, this demonstrates that the decrease in I_{to} density is one of the mechanisms involved in MR-induced prolongation of QTc observed in normal pregnancy. These findings suggest that alterations in mineralocorticoid actions, for example during pathological pregnancy, such as in conditions of gestational hypertension, can have deleterious effects on the heart.

Regarding I_{K1} , treatment with canrenoate did not prevent the decrease observed in pregnancy: the current density was similar in the canrenoate-treated group. Our finding, therefore, shows not only that MR are not responsible for the observed I_{K1} reduction in this condition, but also that distinct mechanisms are likely to regulate the adaptation of I_{K1} and I_{to} in normal pregnancy. Furthermore, as MR antagonism in pregnancy completely prevented QTc interval prolongation, this result demonstrates that I_{K1} decrease is not likely to affect the prolonged repolarization in pregnancy.

What are the likely mechanisms underlying MR regulation of I_{to} density in pregnancy?

Being a ligand-inducible transcription factors, the classical mechanism for MR signalling pathway is through regulation of transcription. It has been demonstrated, in cardiomyocytes in culture that aldosterone induced a up-regulation of L-type Ca^{2+} channels (I_{Ca-L}) leading to increased $[Ca^{2+}]_i$. In turn, this activated Ca^{2+} /calmodulin-regulated phosphatase calcineurin, a Ca^{2+} -sensitive transcription factor, known to activate the heart hypertrophy pathway. This

activation induces the down-regulation of I_{to} functional expression [42, 43]. This pathway has been proposed as a possible mechanism responsible for I_{to} reduction in pathological hypertrophy in rats [43]. However, our previous results demonstrated that no significant change in I_{Ca-L} is present in normal pregnancy [2], which rather points to a different mechanism involved in I_{to} regulation in pregnancy. Besides, these results were obtained in the absence of $[Ca^{2+}]_i$ regulation (due to the presence of the Ca^{2+} chelator BAPTA-AM in the cells) and/or of I_{Ca-L} (due to their inhibition by $CdCl_2$).

Also, it has been demonstrated that I_{to} currents in rat cardiomyocytes can be down-regulated by experimentally-induced oxidative stress [44]. As mentioned previously, pregnancy is associated with an oxidative status; consequently, we propose that in normal pregnancy, stimulation of MRs by mechanism involving changes in the cell redox state may be responsible for decreasing I_{to} .

Other hormonal pathways could contribute to I_{to} regulation in pregnancy. Indeed, estrogen involvement was demonstrated in Kv4.3 decrease in cardiomyocyte in mouse pregnancy [21]. The expression of both estrogen and MRs in cardiomyocytes emphasizes possible interactions between their signaling pathways as a mode of I_{to} regulation [45, 46].

Conclusions

In conclusion, this is the first study to investigate the role of MR in the regulation of cardiac repolarization in pregnancy. On one hand, our findings confirmed in rats a previous observation in mice that QTc prolongation during pregnancy could be explained by the decrease in potassium currents densities, namely, I_{to} . These modifications represent characteristics of pregnancy-induced heart remodeling. They are likely put in place to ensure functional adaptation of the heart to pregnancy, and accompany adaptive morphological remodeling in this condition. On the other hand, for the first time, our results revealed that MRs contribute to QTc prolongation by inducing I_{to} decrease in normal pregnancy. Knowledge of ionic current changes in pregnancy is crucial for the future investigation of their possible alterations in conditions of pathological hypertrophy, such as in gestational hypertension. Understanding the regulation and mechanisms

involved in normal pregnancy is essential in determining the optimal management and treatment of pregnant women with cardiovascular diseases.

Acknowledgements

Dr. Alzbeta Chorvatova received support from Fonds de Recherche en Santé du Québec (No. 2948), Canadian Institutes Health Research (MOP 84450), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. Valerie Bassien-Capsa received a studentship from Foundation of CHU Sainte-Justine and studentship of excellence from the Department of Physiology of the University of Montreal. Dr. Alzbeta Chorvatova is currently employed by the

	QTc [ms]	RR [ms]	HR [beat/min]
NP	174.2 ± 3.2	180.3 ± 5.8	334 ± 10
P	189.8 ± 3.7* ;#	162.4 ± 5.0	371 ± 11
Pcan	164.9 ± 3.5	169.0 ± 5.3	356 ± 11

Tableau I

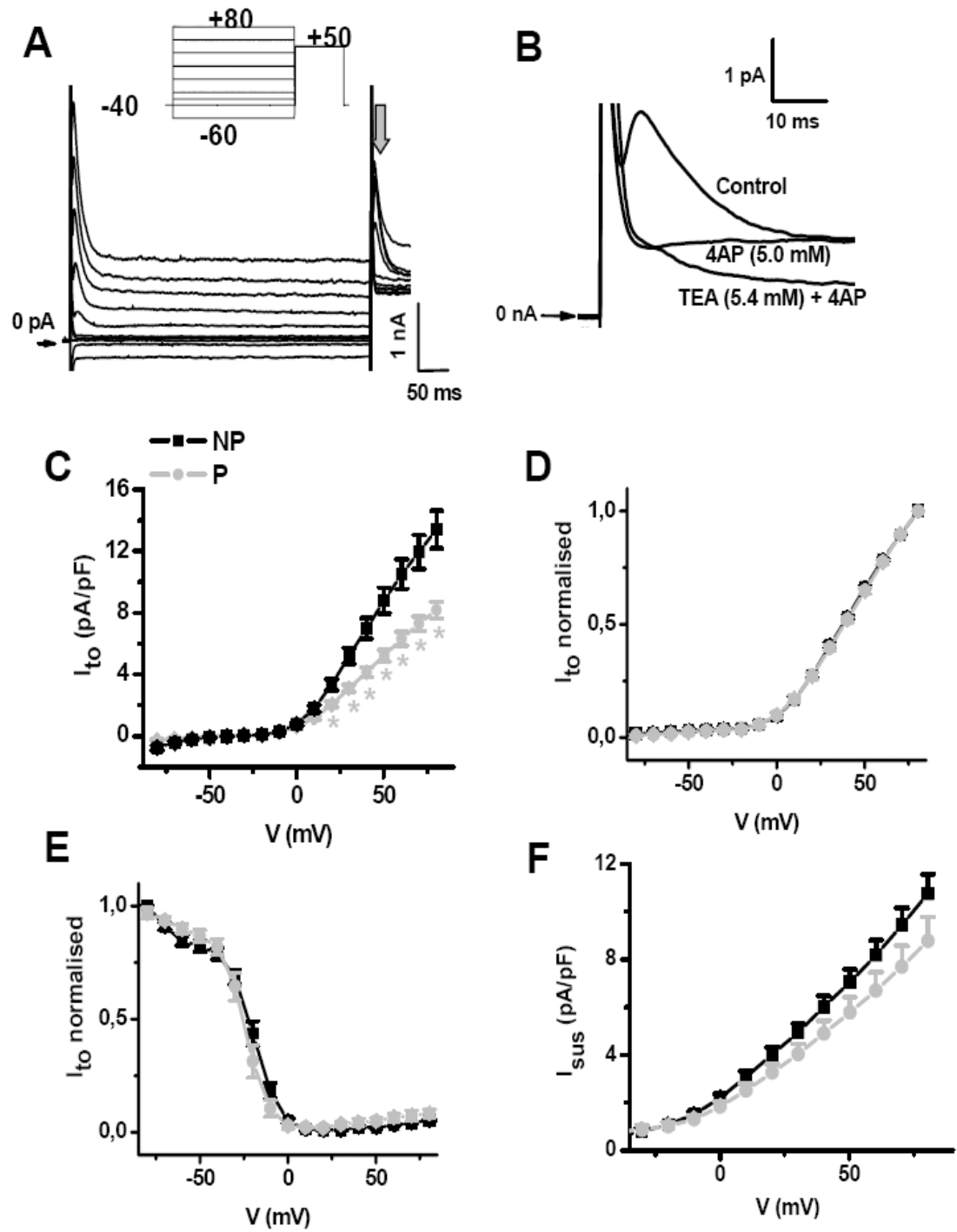


Figure 1

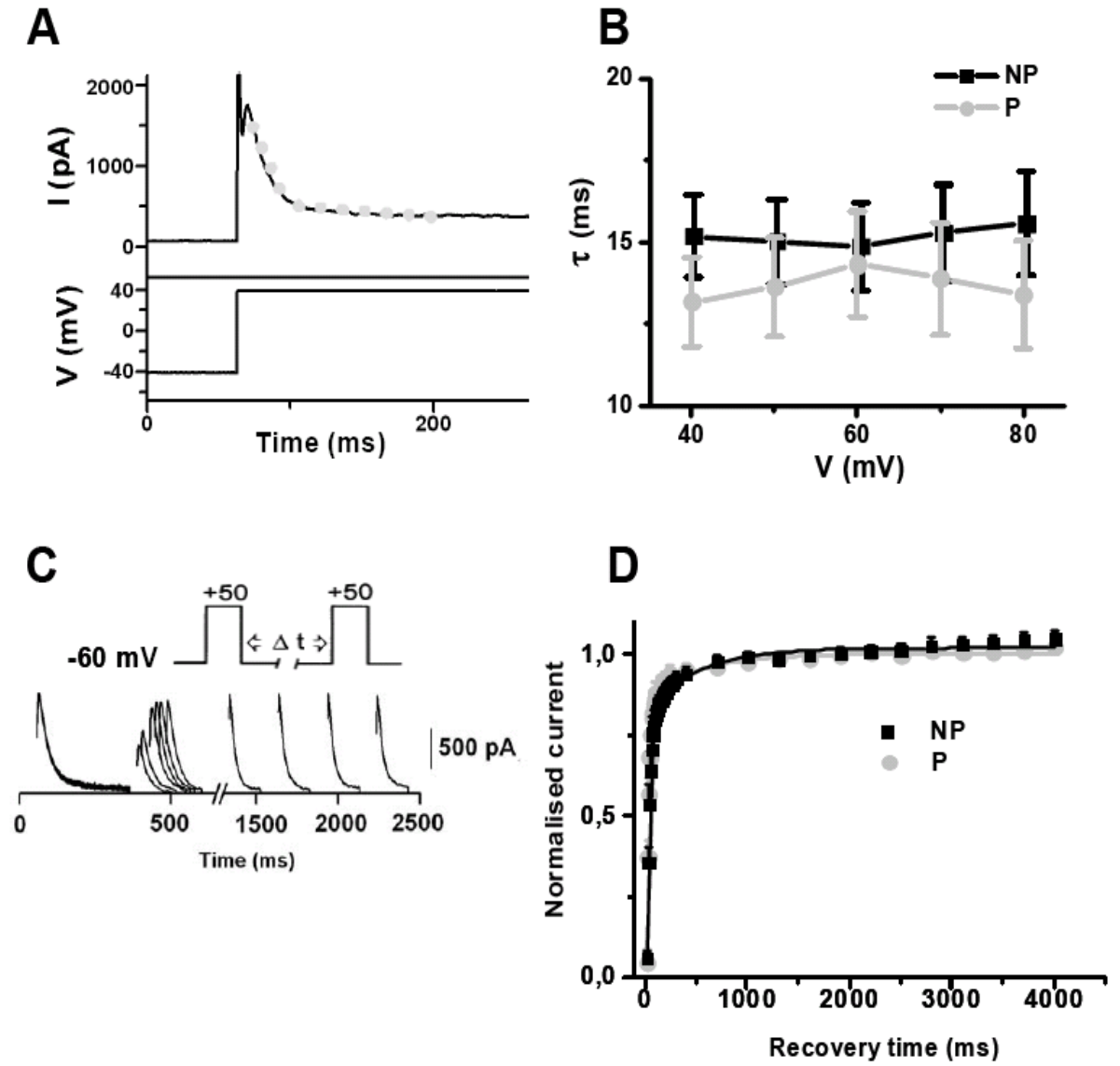


Figure 2

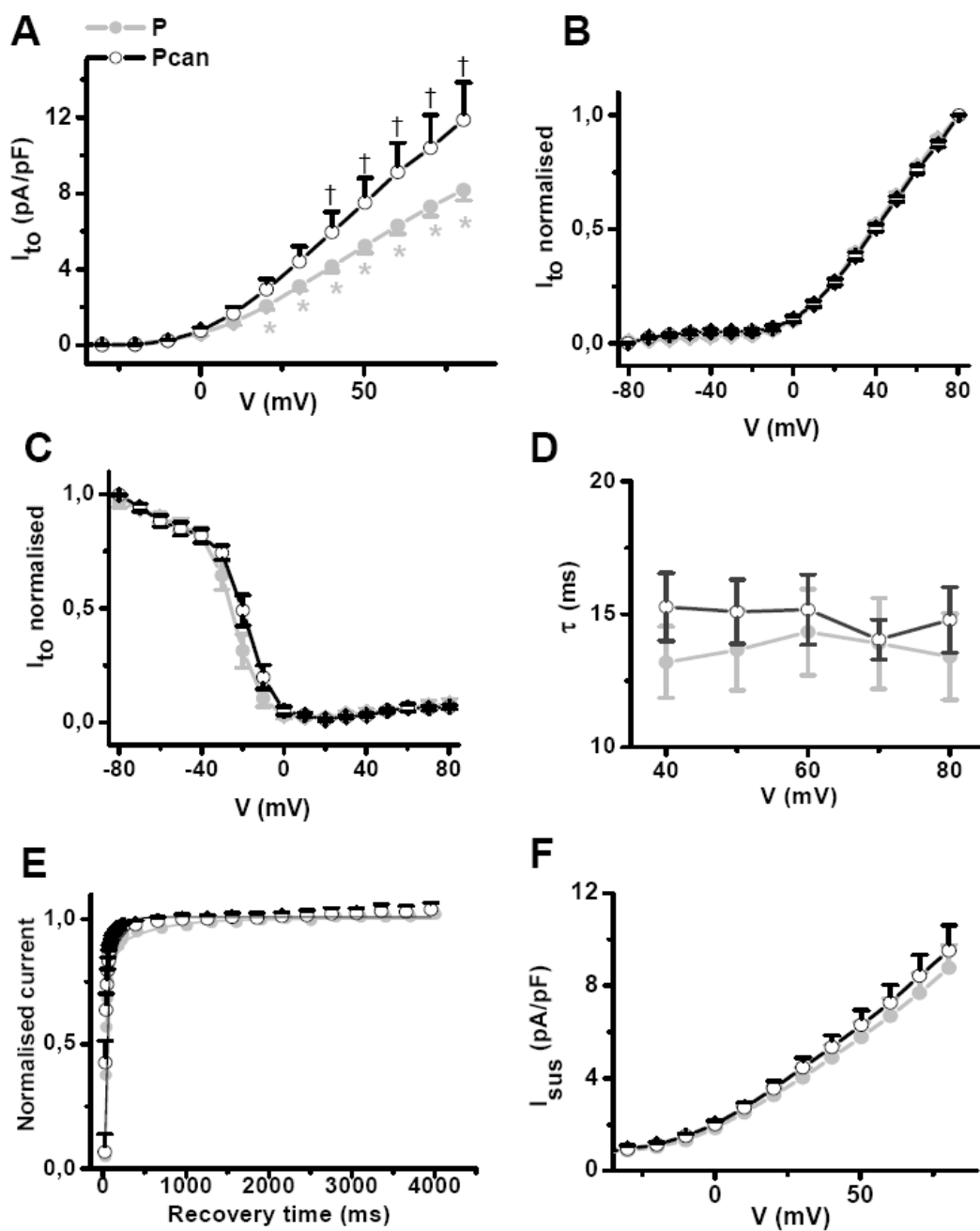


Figure 3

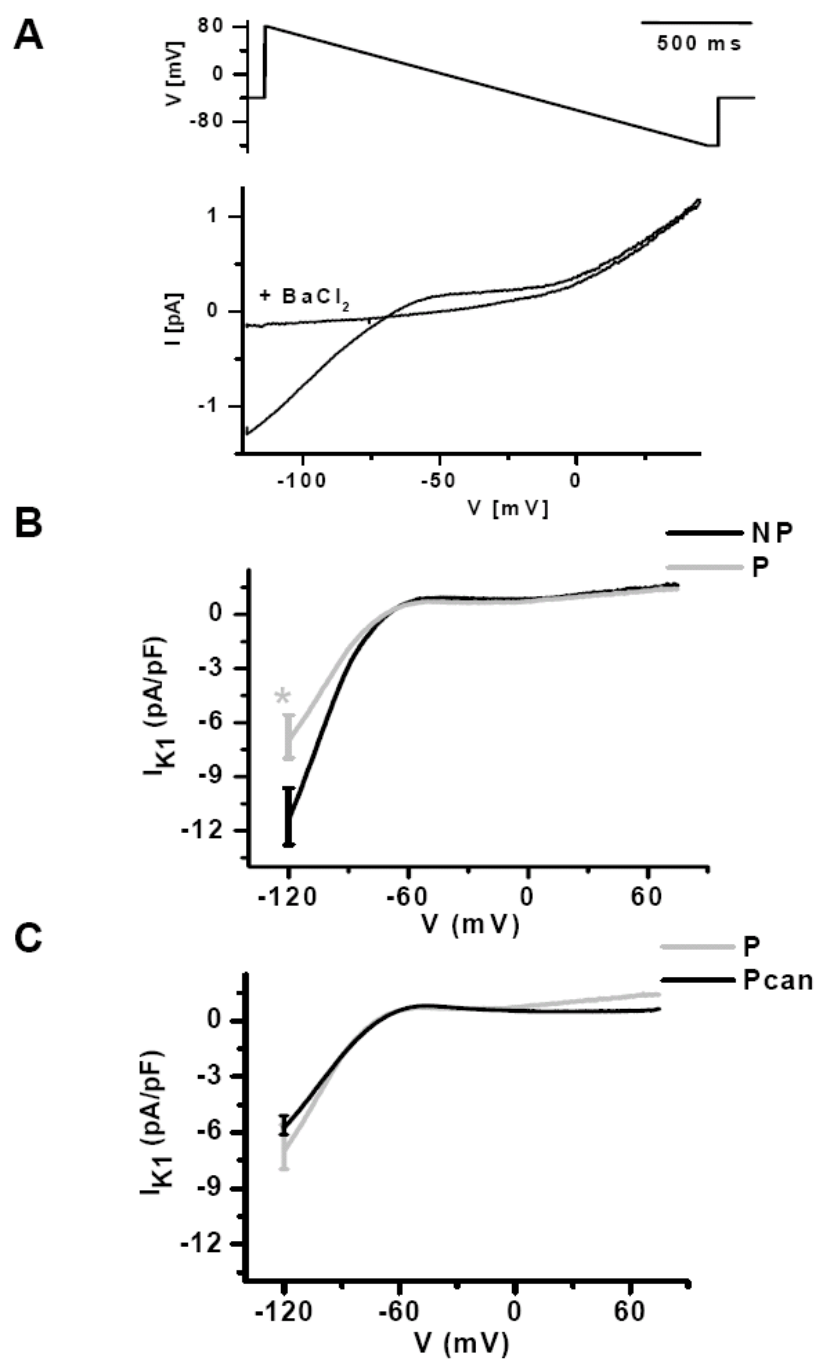


Figure 4

Figure legends

Table I ECG in control and in treated rats

HR indicates heart rate. Values are means \pm SEM, n=5/group. * P vs NP and †P vs P_{can}.

Fig. 1 I_{to} and I_{sus} in normal pregnancy. A. Original recording of I_{to} current in response to voltage pulses from -80 mV to +80 mV, applied every 10 mV from holding potential -40 mV (inset: applied voltage protocol, stimulation frequency 0.2 Hz). B. Sensitivity of I_{to} to 4-aminopyridine (4-AP, 5.0 mmol/L) and of I_{sus} to tetraethylammonium (TEA, 5.4 mmol/L) at +50 mV. C. Current/voltage (I/V) relationship of I_{to} in cells from pregnant (P; n=11) and non-pregnant rats (NP; n=19). D. Normalized activation curve plotted as a function of applied potential. E. Inactivation curve of I_{to} (see arrow in inset), plotted as a function of pre-pulse potential and fitted by Boltzmann approximation. F. I/V relationship of I_{sus} in cells from P (n=11) and NP (n=19) rats. Values are means \pm SEM. * P vs NP.

Fig. 2 Time constant of decay and recovery after inactivation of I_{to} . A. Example of a mono-exponential fit represented by grey circles. The fit was applied at +50 mV to calculate the time constant of decay (τ_{decay}) of I_{to} . B. Comparison of τ_{decay} recorded in cardiomyocytes from NP (n=19) and P (n=14) rats, plotted as a function of applied potential. C. Original recording of I_{to} recovery after inactivation with the applied voltage protocol in the inset. D. Mean recovery after inactivation in NP (n=13) and P (n=12) rats. Values are means \pm SEM.

Fig. 3 I_{to} in canrenoate-treated pregnancy. A. Comparison of I/V relationship of I_{to} in cells from normally pregnant P (n=11) and canrenoate-treated pregnant P_{can} (n=10) rats. B. Normalized I_{to} activation curve plotted as a function of applied potential. C. Inactivation curve of I_{to} . D. τ_{decay} in P and P_{can} rats. E. Mean recovery after inactivation in P (n=12) and P_{can} (n=6) rats. F. I/V relationship of I_{sus} in P (n=11) and P_{can} (n=10) rats. Values are means \pm SEM. * P vs NP and † P vs P_{can}.

Fig. 4 Ba²⁺-sensitive I_{K1} currents in normal and canrenoate-treated pregnancy. A. Inhibition by BaCl₂ (1 mM) of I_{K1} recorded using the voltage ramp presented in inset (from +80 to -120 mV at a rate of 100 mV/s and at a stimulation frequency of 0.1 Hz). B. Comparison of I/V relationship of Ba²⁺-sensitive I_{K1} in NP (n=15) and P (n=14). C. I_{K1} recorded in cells from P and P_{can} (n=14) rats. Values are means± SEM. * P vs NP.

References

- [1] Schannwell CM, Zimmermann T, Schneppenheim M, Plehn G, Marx R, Strauer BE. Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology* 2002;97:73-8.
- [2] Bassien-Capsa V, Fouron JC, Comte B, Chorvatova A. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc Res* 2006;69:423-31.
- [3] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
- [4] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
- [5] Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994;135:834-40.
- [6] Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987;14:859-66.
- [7] Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237:268-75.
- [8] Myles K, Funder JW. Progesterone binding to mineralocorticoid receptors: in vitro and in vivo studies. *Am J Physiol* 1996;270:E601-E607.
- [9] Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2001;264:182-5.
- [10] Ho JT, Lewis JG, O'Loughlin P, Bagley CJ, Romero R, Dekker GA et al. Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:869-77.
- [11] Johansson ED, Jonasson LE. Progesterone levels in amniotic fluid and plasma from women. I. Levels during normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1971;50:339-43.

- [12] Beausejour A, Auger K, St Louis J, Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H375-H383.
- [13] Valdez SR, Penissi AB, Deis RP, Jahn GA. Hormonal profile and reproductive performance in lactation deficient (OFA hr/hr) and normal (Sprague-Dawley) female rats. *Reproduction* 2007;133:827-40.
- [14] Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 2006;47:656-64.
- [15] Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93:69-76.
- [16] Funder JW. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217:263-9.
- [17] Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002;161:1773-81.
- [18] Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 2001;38:1107-11.
- [19] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-62.
- [20] Lechmanova M, Parizek A, Halaska M, Slavicek J, Kittnar O. Changes of the electrical heart field and hemodynamic parameters in the 34th to 40th weeks of pregnancy and after delivery. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266:145-51.
- [21] Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96:1208-16.
- [22] Perrier E, Kerfant BG, Lalevee N, Bideaux P, Rossier MF, Richard S et al. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:776-83.
- [23] Karim A. Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev* 1978;8:151-88.
- [24] Brochu M, Lehoux JG, Picard S. Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 1997;138:2354-8.
- [25] Bazett HC. An analysis of time relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353-67.

- [26] Chorvatova A, Hussain M. Effects of caffeine on potassium currents in isolated rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 2003;446:422-8.
- [27] Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-98.
- [28] Volk T, Nguyen TH, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H. Regional alterations of repolarizing K⁺ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol* 2001;530:443-55.
- [29] Hussain M, Orchard CH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, L-type Ca²⁺ current and the Ca²⁺ transient in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J Physiol* 1997;505:385-402.
- [30] Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999;113:661-78.
- [31] Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH et al. Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation* 1994;90:2534-9.
- [32] Nakagawa M, Ooie T, Takahashi N, Taniguchi Y, Anan F, Yonemochi H et al. Influence of menstrual cycle on QT interval dynamics. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006;29:607-13.
- [33] Carnethon MR, Anthony MS, Cascio WE, Folsom AR, Rautaharju PM, Liao D et al. A prospective evaluation of the risk of QT prolongation with hormone replacement therapy: the atherosclerosis risk in communities study. *Ann Epidemiol* 2003;13:530-6.
- [34] Haseroth K, Seyffart K, Wehling M, Christ M. Effects of progestin-estrogen replacement therapy on QT-dispersion in postmenopausal women. *Int J Cardiol* 2000;75:161-5.
- [35] Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:270-83.
- [36] Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:851-72.
- [37] Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G. Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1999;42:391-401.
- [38] Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K⁺ channel down-regulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):229-45.

- [39] Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;11:611-22.
- [40] Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res* 1994;28:1180-7.
- [41] Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:379-85.
- [42] Benitah JP, Perrier E, Gomez AM, Vassort G. Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 2001;537:151-60.
- [43] Perrier E, Perrier R, Richard S, Benitah JP. Ca²⁺ controls functional expression of the cardiac K⁺ transient outward current via the calcineurin pathway. *J Biol Chem* 2004;279:40634-9.
- [44] Li X, Li S, Xu Z, Lou MF, Anding P, Liu D et al. Redox control of K⁺ channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:339-49.
- [45] Meyer R, Linz KW, Surges R, Meinardus S, Veas J, Hoffmann A et al. Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol* 1998;83:305-21.
- [46] Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998;273:4883-91.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les maladies cardiaques font partie des trois causes principales de mort maternelle et la première cause qui n'est pas d'origine obstétricale. Des complications cardiovasculaires telles que l'hypertension gestationnelle (HG), les cardiomyopathies et les arythmies peuvent survenir chez des femmes en bonne santé ou encore chez des femmes possédant déjà une affection cardiovasculaire et qui de ce fait auront plus de difficultés à y faire face.

Les cardiomyocytes isolés ont été utilisés comme modèle depuis maintenant plusieurs décennies pour caractériser les altérations morphologiques et fonctionnelles induites par les conditions pathologiques ainsi que l'effet de médicaments sur le cœur. Cependant, en dépit des difficultés à diagnostiquer et traiter les maladies cardiovasculaires induites par la grossesse, les modifications morphologiques et fonctionnelles des cardiomyocytes du ventricule gauche durant la grossesse n'ont pas été encore étudiées. En effet, les études menées jusqu'à ce jour sur les cardiomyocytes isolés lors de la grossesse portent sur les cardiomyocytes fœtaux et très peu sur les cardiomyocytes maternels. Pourtant, une meilleure compréhension du remodelage des cardiomyocytes lors de la grossesse permettrait d'élaborer des traitements plus appropriés pour les maladies cardiovasculaires gestationnelles.

Ainsi, nos travaux ont pour objectif de caractériser les adaptations des cardiomyocytes qui sous-tendent l'hypertrophie cardiaque lors de la gestation normale afin d'identifier les altérations induites par l'HG. Notre étude effectuée chez la rate a démontré un remodelage ayant des caractéristiques communes avec le remodelage observé lors du développement du cœur. De plus, l'adaptation du métabolisme des carbohydrates, notamment du lactate, a un impact sur le fonctionnement des cardiomyocytes et la relation métabolisme/contractilité est plus étroite lors de la gestation. Nous avons aussi démontré que la régulation hormonale de ces adaptations fait intervenir le récepteur aux minéralocorticoïdes tant pour la morphologie que pour la fonction. Par ailleurs, chez notre modèle d'hypertension gestationnelle induit par un supplément sodique (0.9% NaCl), nous avons caractérisé des altérations de l'adaptation du cœur.

REMODELAGE MORPHOLOGIQUE

Grossesse normale

Les études échocardiographiques effectuées chez les femmes enceintes ont associé l'hypertrophie de grossesse à celle observée chez les athlètes pratiquant un sport d'endurance [24, 29]. Cette hypertrophie cardiaque dite excentrique est causée par la surcharge volumique. Elle est caractérisée par une augmentation de la masse du ventricule et de sa paroi, accompagnée d'un élargissement de la cavité ventriculaire.

Notre étude est la première à caractériser les changements cellulaires sous-jacents au remodelage hypertrophique du ventricule gauche lors de la gestation. Dans l'article 1, le remodelage que nous avons observé chez la rate gestante est similaire à celui observé lors du développement du cœur après la naissance, dans lequel il y a une croissance de la cellule en longueur et en largeur proportionnelle [172]. En effet, lors de la gestation, l'hypervolémie cellulaire est principalement due à un allongement cellulaire. Nous avons déterminé que cet allongement était causé par un ajout de sarcomères en série, ce qui correspond à la définition de l'hypertrophie excentrique. De plus, la valeur du rapport longueur/largeur qui est similaire à celui déterminé chez les rates nullipares témoigne de la croissance proportionnelle des cellules et atteste du caractère physiologique de ce remodelage [165].

Le calcul du volume ne prend pas en compte les invaginations membranaires, nommées tubules-transverses. C'est la raison pour laquelle les mesures de la capacité membranaire, qui est un indicateur de la surface membranaire totale, nous ont été utiles pour l'étude morphologique. Ce paramètre n'est pas modifié par la gestation, ce qui reflète la préservation de l'organisation membranaire, du cytosquelette et des organelles.

Pour déterminer comment se traduisait ce changement de la structure des myocytes sur la morphologie du ventricule, nous avons effectué des mesures échocardiographiques. Selon nos résultats, les dimensions diastoliques et systoliques ne sont pas modifiées par la gestation comme cela a aussi été observé chez la femme [156, 173]. Cependant, l'épaisseur de la paroi du ventricule est augmentée chez la rate. Etant donné la disposition du cardiomyocyte dans le ventricule, une augmentation de la paroi est associée à une

augmentation de l'aire de la coupe transversale (ACT) cellulaire («cross-sectional area» dans l'article), ce qui est confirmé par nos résultats. Les données chez la femme sont discordantes pour ce paramètre. Il a été rapporté soit une augmentation de l'épaisseur de la paroi [29] soit l'absence de changement [156, 174]. L'augmentation du volume sanguin qui est commune à la femme et la rate est pourtant en faveur d'une augmentation de la paroi. Les discordances peuvent être d'origine diverses : le nombre de sujets, le moment de la mesure puisque l'augmentation est plus manifeste au dernier trimestre [29], ainsi que la technique employée pour les mesures échocardiographiques, les mesures en M-mode étant plus précises que celles en 2D.

Sur le plan morphologique, le remodelage du cœur de la rate gestante que nous avons caractérisé présente des ressemblances avec le remodelage excentrique décrit chez la femme. Au niveau cellulaire, la comparaison entre la femme et la rate ne peut être établie car ces données ne sont pas disponibles pour la femme. Néanmoins, nos résultats montrent que le remodelage cellulaire du cœur de la rate gestante s'accorde avec la définition du remodelage excentrique et possède les caractéristiques d'un remodelage physiologique. Ainsi, nous démontrons que la rate est un modèle adéquat pour l'étude du remodelage morphologique du cœur lors de la grossesse. La similitude des remodelages entre la rate et la femme constituait une condition *sine qua non* pour la suite de notre étude étant donné la relation étroite entre la structure et la fonction qui existe dans le cœur.

Les caractéristiques du remodelage morphologique du cœur déterminées lors de la gestation normale, nous ont servi de référence pour l'étude de ce remodelage lors de l'HG que nous verrons dans la section suivante. Nous nous attendions à observer des altérations des ces adaptations chez notre modèle d'HG.

Hypertension gestationnelle

Dans notre modèle, l'hypertension gestationnelle a été induite par un supplément sodique de 0.9% NaCl [136]. Ce modèle n'induit pas de protéinurie ni d'altérations significatives de la croissance fœtale, comme cela est observé dans la prééclampsie [136]. Ainsi, parmi les différents types de désordres hypertensifs de la grossesse, notre modèle présente plus de similarités avec celui de l'hypertension gestationnelle ou gravidique observée chez la femme [152].

Notre étude est la première à s'intéresser aux particularités du remodelage morphologique lors de l'HG. Dans l'article 1, le remodelage cellulaire que nous avons observé se distingue de celui de la gestation normale par une élongation plus importante de la cellule. De plus, l'ACT est significativement diminuée. Etant donné que le volume est le produit de la multiplication de l'ACT par la longueur, la diminution de l'ACT empêche l'augmentation du volume cellulaire, ce dernier aurait même tendance à diminuer. Contrairement à la gestation normale où le volume était essentiellement dépendant de la longueur cellulaire, nous constatons que le volume est plus dépendant de l'ACT, donc de la largeur et de l'épaisseur. Par ailleurs, la valeur du rapport longueur/largeur est supérieure à celle déterminée chez les rates en gestation normale et prouve que le remodelage est disproportionné et par conséquent pathologique.

L'allongement cellulaire étant associé à un élargissement de la cavité ventriculaire [165], nous nous attendions par conséquent à mesurer des variations des dimensions systoliques et diastoliques. Cependant, ces dernières ne sont pas significativement modifiées. De plus, la diminution de l'ACT mentionnée précédemment est en corrélation avec l'amincissement de la paroi ventriculaire, bien qu'il ne soit pas significatif dans notre cas. Ainsi, les mécanismes mis en place à l'origine pour permettre de réduire le stress imposé par la surcharge pressique ont évolué en un remodelage pathologique.

Lors de l'hypertension essentielle, le remodelage observé chez l'humain ou le rat est dans un premier temps une augmentation de l'ACT afin de compenser la surcharge de pression, puis lors de la progression vers l'insuffisance cardiaque l'ACT ne change pas tandis que la longueur augmente ce qui résulte en une paroi ventriculaire amincie [175]. Il semblerait que la phase d'allongement cellulaire sans augmentation adéquate de l'ACT soit une caractéristique commune à la transition vers l'insuffisance cardiaque indépendamment de l'étiologie [27, 175, 176]. Le remodelage observé dans notre modèle d'hypertension s'approche de celui observé dans cette phase critique.

Le poids frais du cœur est augmenté, cependant dans ce modèle d'HG la natrémie n'est pas affectée par le traitement [136]. De ce fait, l'augmentation du poids frais ne peut résulter d'une entrée d'eau dans les cellules. Par ailleurs, le volume des cellules a tendance à diminuer. Les dimensions diastoliques et systoliques ne sont pas significativement modifiées, ce qui indique aussi que la taille de la cavité est similaire. Il est probable que la

différence vient des autres types de cellulaires qui constituent le cœur notamment les fibroblastes qui forment un réseau autour des myocytes et/ou du remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, chez le rat dont l'hypertrophie est induite par constriction aortique et qui génère une surcharge pressive, Stewart et al. [177] ont démontré des modifications des fibroblastes et du collagène. Ils ont en effet observé une semaine après la chirurgie une prolifération des fibroblastes ainsi qu'une augmentation du collagène. De plus, comme des études précédentes l'avaient prouvé [178-180], ils ont démontré que les fibroblastes possédaient la capacité de comprimer le gel hydraté de collagène grâce à l'interaction entre le collagène leurs intégrines. Ce type de remodelage de la matrice extracellulaire serait une voie intéressante à explorer pour expliquer cette augmentation du poids du cœur lors de l'HG.

Dans notre cas, les changements de la longueur cellulaire ne proviennent pas de modifications de l'expression des protéines constituant les sarcomères car ces derniers ne sont pas modifiés tant au niveau du nombre que de la longueur. Par contre, la capacité membranaire est augmentée. Cela implique un remaniement au niveau des tubules-transverses qui servent de réserve de membrane. Ceci a été observé auparavant chez le rat dont l'hypertrophie du ventricule gauche, générée par constriction aortique, résulte en une augmentation de la surface des tubules-transverses [181]. Le but de ces altérations morphologiques est de tenter de maintenir le rapport surface/volume dans les cellules hypertrophiées pour préserver leur fonction.

Ainsi, chez notre modèle d'hypertension, il semblerait que pour pallier l'inadaptation morphologique des mécanismes sont mis en place au niveau cellulaire, si bien qu'au niveau du cœur entier la fonction contractile est maintenue comme en témoigne la valeur de la fraction de raccourcissement dans notre étude. Cela pourrait expliquer pourquoi le remodelage excentrique, aussi observé chez les femmes enceintes hypertendues, [154, 182] est associé à une incidence moins importante de complications fœto-maternelles que le remodelage concentrique [154]. Les résultats de l'étude morphologique démontrent l'intérêt des études à l'échelle cellulaire. Les paramètres mesurés pour le cœur ne sont pas significativement modifiés, alors que ces cellules présentent déjà des caractéristiques d'inadaptation à la gestation. Ainsi, les mécanismes identifiés chez les cellules peuvent évoluer vers des complications avant que le cœur ne

montre des symptômes. De ce fait, nous voulions déterminer les répercussions de ce remodelage morphologique sur le fonctionnement cellulaire.

REMODELAGE FONCTIONNEL: MÉTABOLISME ET CONTRACTILITÉ

CELLULAIRE

La libération de l'énergie sous forme de molécules d'ATP s'effectue dans le cœur à partir du métabolisme enzymatique des substrats et la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. De ce fait, il est évident que la contraction et le métabolisme sont intimement liés. Le cœur a la capacité de produire de l'énergie à partir de l'oxydation d'acides gras, du glucose et de ses substrats pyruvate et lactate. L'utilisation de ces substrats varie avec leur disponibilité et le profil d'utilisation de ces substrats s'appelle le phénotype métabolique. Ainsi, nous devons déterminer dans quel contexte métabolique le cœur se trouve lors de la gestation afin d'en déterminer les répercussions sur le phénotype métabolique et par conséquent le fonctionnement des cardiomyocytes.

Grossesse normale

Pendant la grossesse, le cœur se retrouve dans une situation où il doit adapter son métabolisme d'une part à ses modifications structurales nécessaires pour optimiser la perfusion placentaire et d'autre part aux besoins métaboliques du fœtus en croissance. Dans l'article 1, le contexte métabolique que nous avons déterminé en conditions post-prandiales était caractérisé par une diminution de la concentration plasmatique du glucose, une augmentation de celle des triglycérides et du lactate et une tendance à l'augmentation de celle du pyruvate [149]. Ceci est en accord avec les précédentes études chez la femme [110, 183-185] et la rate [108, 109, 186]. Nous avons choisi d'effectuer les mesures plasmatiques en phase post-prandiale et non à jeun car ces valeurs allaient nous servir pour reproduire le milieu auquel les cardiomyocytes se sont adaptés lors des mesures de contraction.

Ayant déterminé le contexte métabolique, nous voulions déterminer le phénotype métabolique du cœur lors de la gestation. La seule caractéristique connue de ce phénotype est la diminution de l'utilisation du glucose [108]. Nous avons mesuré les contractions des cardiomyocytes en présence de glucose, lactate, pyruvate et octanoate, un acide gras à

chaîne moyenne, qui peut entrer dans la mitochondrie sans la carnityl-transférase (cf. Métabolisme des acides gras dans la partie Introduction), donc facilement métabolisable.

Notre étude de la contractilité cellulaire a permis de révéler une autre particularité du phénotype métabolique du cœur lors de la grossesse. En effet, parmi tous les substrats, seuls le lactate et le pyruvate ont induit une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes. Etant donné que les triglycérides ont une concentration plus élevée que celles de ces deux substrats réunies, il apparaît que la disponibilité n'est pas le seul facteur pris en compte dans l'utilisation des substrats par les cellules. Le principe du cycle de Randle (oxydation du substrat en fonction de sa disponibilité; voir section Métabolisme énergétique des cardiomyocytes de la partie Introduction), ne semble par conséquent pas s'appliquer à la grossesse. Cela laisse aussi supposer que le remodelage morphologique induit par la gestation n'affecterait pas le phénotype métabolique. Ainsi, pendant la grossesse, il semblerait que ce soient les besoins métaboliques du fœtus qui régissent les adaptations métaboliques et le phénotype métabolique du cœur.

Le choix de ces substrats énergétiques dans l'adaptation métabolique du cœur à la grossesse peut se justifier à différents niveaux :

- **la disponibilité**

Le fœtus qui consomme activement le glucose transfère le lactate au placenta qui en métabolise une partie et renvoie le reste dans la circulation maternelle, ce qui explique l'augmentation du taux plasmatique maternel.

- **la protection du fœtus**

Faciliter l'efflux de lactate vers la mère permet de maintenir le pH placentaire et fœtal et par conséquent d'assurer la protection de la circulation fœtale contre l'acidose lactique.

- **l'économie d'énergie**

L'utilisation du lactate et du pyruvate permet d'économiser des molécules d'ATP utilisées lors de la glycolyse pour former du pyruvate.

- **les effets inotropes**

Le lactate est transporté par les MCT. Chez le rat, l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge volumique chronique est caractérisée par un transport accru du lactate associé à une augmentation de l'expression des MCT [187]. Lors de l'exercice

d'endurance, le transport du lactate est accentué dans les cellules cardiaques ce qui permet d'augmenter la concentration d'ATP disponible [188, 189]. Lors de la gestation, la surcharge volumique pourrait aussi entraîner de tels changements au niveau du transport du lactate, ce qui favoriserait l'augmentation de la concentration d'ATP.

De plus, le lactate peut être converti en pyruvate par la LDH. L'augmentation de NAD(P)H mesurée dans les cardiomyocytes de rates gestantes indique que l'équilibre de la réaction catalysée par la LDH se déplace vers la formation du pyruvate. L'effet inotrope du pyruvate a été caractérisé et vient du fait qu'en étant métabolisé par la mitochondrie, il favorise la production d'ATP cellulaire. Ainsi, il augmente l'activité des protéines qui sont dépendantes de l'ATP et impliquées dans le processus de contraction. Concordant avec ce rôle possible du lactate et du pyruvate dans l'adaptation de la contractilité cardiaque pendant la grossesse, il a été démontré que l'activité de l'ATPase activée par l'actine est augmentée chez la rate gestante [190].

Une autre possibilité pour augmenter la contractilité est d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$. Les courants calciques I_{Ca-L} représentent une des voies principales d'entrée des ions Ca^{2+} dans les cardiomyocytes. Les courants I_{Ca-L} n'ont pas été affectés par les différents substrats énergétiques lors de la grossesse. De ce fait, il est peu probable qu'ils fassent partie des mécanismes impliqués dans l'augmentation de contractilité observée lors de la grossesse en présence de lactate et pyruvate. Nous envisageons ainsi que la $[Ca^{2+}]_i$ pourrait être modifiée par des changements au niveau des organelles constituant des réserves de calcium comme le réticulum sarcoplasmique (RS). Corroborant notre hypothèse d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, l'activité de la myosine activée par le Ca^{2+} est aussi augmentée chez la rate gestante [190]. Le RS possède une Ca^{2+} -ATPase qui pompe les ions Ca^{2+} du cytosol vers le RS. L'augmentation de l'ATP cellulaire par le lactate si il est converti en pyruvate pourrait permettre une activité plus importante de la Ca^{2+} -ATPase du RS et par conséquent plus d'ions Ca^{2+} pourront être libérés pour augmenter la puissance de la prochaine contraction.

L'adaptation du métabolisme à la gestation a un impact conséquent sur le fonctionnement des cardiomyocytes. Lors de la grossesse, les changements métaboliques de la rate [108, 109, 186] et la femme [110, 183-185] sont similaires, mais la relation entre les substrats énergétiques et le fonctionnement cardiaque n'a pas encore été évaluée chez la femme. Nos résultats démontrent que lors de la gestation, la relation entre le métabolisme

des cardiomyocytes et leur fonctionnement n'est plus régi par la disponibilité des substrats. Le phénotype métabolique des cardiomyocytes est tributaire des besoins métaboliques du fœtus. Etant donné que l'HG est associée à des altérations du fonctionnement cardiaque, nous voulions déterminer si elle pouvait altérer le phénotype métabolique et donc le fonctionnement cellulaire.

Hypertension gestationnelle

Dans notre modèle d'hypertension, les résultats n'ont pas montré de différences significatives au niveau des concentrations plasmatiques des substrats énergétiques : glucose, lactate, pyruvate et triglycérides. Néanmoins, le rapport [lactate]/[pyruvate] est plus faible, ce qui témoigne d'une inadaptation métabolique. Ainsi, le cœur se retrouve dans un contexte métabolique inadéquat. Compte tenu de la relation que nous avons observée entre ces substrats énergétiques et le fonctionnement cellulaire lors de la gestation normale, nous nous attendions à ce que cela se répercute sur la contractilité des cardiomyocytes.

Cela a été confirmé par nos résultats car l'augmentation de la contractilité cellulaire observée en gestation normale en présence de lactate et pyruvate est significativement atténuée dans les cellules de rates hypertendues. Ainsi, notre étude est la première à mettre en relation les altérations métaboliques induites par l'HG avec des altérations du fonctionnement des cardiomyocytes. Etant donné que les concentrations de ces substrats ne sont pas significativement différentes entre les rates en gestation normale et hypertendues, une des possibilités que nous envisageons est que l'altération fonctionnelle provienne du transport de ces substrats dans les cardiomyocytes. En effet, l'expression des MCT, qui transportent lactate et pyruvate, pourrait être diminuée.

De plus, le transport du lactate et du pyruvate s'effectuant selon leur gradient de concentration, le rapport [lactate]/[pyruvate] reflète le rapport intracellulaire. L'équilibre de la réaction catalysée par la LDH pourrait alors favoriser la formation du lactate dans les cardiomyocytes. Il en découle une autre possibilité pour l'altération de la contractilité : l'effet inotrope du pyruvate serait altéré dans ces cellules en raison d'un rapport [ATP]/[ADP][Pi] diminué.

Quant au métabolisme des lipides, l'autre voie de production énergétique du cœur, la réponse contractile témoigne là encore d'une inadaptation à la grossesse. En effet, la contractilité cellulaire est diminuée par la présence de l'octanoate, alors que ce dernier n'affecte pas la contractilité en gestation normale. Il semblerait que lors de la gestation normale, le fonctionnement cardiaque soit indépendant du métabolisme des lipides mais qu'une certaine dépendance persiste lors de l'HG.

Face à cette situation, des mécanismes de compensation ont été mis en place, visant à maintenir la fonction contractile du cœur, comme l'illustre la valeur de la fraction de raccourcissement qui est supérieure à celle en gestation normale. Ces mécanismes ont pour cibles entre autres les courants I_{Ca-L} qui sont augmentés en présence de lactate et pyruvate chez ces rates. Notre méthode consiste à perfuser la même cellule avec le glucose puis avec le lactate et le pyruvate, par conséquent les modifications des courants I_{Ca-L} observées dans nos conditions expérimentales ne peuvent provenir que de la régulation du fonctionnement du canal. Il a été démontré que les courants I_{Ca-L} peuvent être régulés par l'ATP de la glycolyse plutôt que par celui issu de la phosphorylation oxydative [191]. Il est probable que cette régulation soit modifiée lors de l'HG de sorte que l'ATP issu de la phosphorylation oxydative ait un rôle prédominant dans la régulation des courants I_{Ca-L} . Les femmes enceintes hypertendues sont traitées avec des inhibiteurs des canaux calciques tels que la nifédipine, qui reste la plus utilisée [192]. L'efficacité de ces traitements à agir sur les vaisseaux pour baisser la pression artérielle est reconnue [193-196]. Cependant, ils agissent sur les canaux calciques des vaisseaux et ceux du cœur selon un rapport de 10/1. Ils peuvent par conséquent affecter la chronotropie (capacité à générer des impulsions électriques par le nœud sino-auriculaire) et l'inotropie (capacité contractile du cœur) du cœur [197]. Dans notre cas, l'utilisation de tels agents pharmacologiques aurait affecté l'augmentation des courants I_{Ca-L} mise en place pour maintenir le fonctionnement contractile du cœur. Si une telle adaptation se produit chez les femmes enceintes hypertendues, le traitement par les inhibiteurs des canaux calciques pourrait entraîner des complications cardiaques.

L'étude de la contractilité a donc mis en évidence que l'HG se caractérise par une altération du phénotype métabolique du cœur comprenant des anomalies de l'adaptation du métabolisme lipidique et du métabolisme du lactate et du pyruvate, qui troublent le

fonctionnement des cardiomyocytes. La singularité de l'HG vient du fait que le fonctionnement des cardiomyocytes se rapproche à la fois de celui d'une gestante et celui d'une rate nullipare. En effet, la réponse contractile au lactate et au pyruvate est augmentée mais reste inférieure à celle de la gestation normale et la réponse aux lipides est similaire à celle des rates nullipares. Dans le cas de l'HG, il semblerait que ce soit l'entrée d'ions Ca^{2+} menant à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui permettrait le maintien de la contraction tandis que la contractilité lors de la grossesse normale semble être dépendante des réserves calciques intracellulaires.

RÉGULATION DU REMODELAGE CARDIAQUE LORS DE LA GESTATION : RÔLE DES RÉCEPTEURS AUX MINÉRALOCORTICOÏDES

Les mécanismes de régulation impliqués dans le remodelage du cœur pendant la grossesse sont peu connus. Bien que la surcharge volumique soit un stimulus important du remodelage cardiaque pendant la grossesse, les changements hormonaux peuvent aussi être un facteur déterminant de ce remodelage hypertrophique. Parmi les différents systèmes hormonaux modifiés pendant la grossesse nous avons choisi d'étudier le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM), dont le rôle dans le remodelage cardiaque est reconnu dans les conditions pathologiques mais peu connu en conditions physiologiques.

Régulation de la morphologie

Dans différents cas d'hypertrophie cardiaque pathologique, l'implication des RM dans le remodelage cardiaque a été démontrée par la capacité de leurs inhibiteurs à induire une diminution de la masse ventriculaire. Ceci a été prouvé chez l'humain ou le rat [146, 151, 198]. Cependant, le RM n'a jamais été associé au remodelage physiologique induit par la grossesse.

Nos travaux présentés dans l'article 2 sont ainsi les premiers à révéler que le RM fait partie des voies de régulation impliquées dans le remodelage morphologique du cœur lors de la gestation. En effet, l'inhibition du RM pendant la gestation a conduit à un rétrécissement du volume cellulaire. Cette diminution du volume est due à la réduction de l'ACT, ce qui va à l'opposé du remodelage induit par la grossesse. De plus, le rapport

longueur/largeur est significativement augmenté par rapport la gestation normale, ce qui témoigne d'un remodelage disproportionné et par conséquent traduit une inadaptation à la gestation. Il faut tout de même souligner que le volume cellulaire dans le cas de l'HG est inférieur à celui de la grossesse normale mais supérieur à celui d'une rate nullipare traitée au canrénoate. Cela indique que le RM contribue à l'adaptation des cellules cardiaques à la gestation mais n'est pas le seul acteur de cette de régulation.

La diminution du volume cellulaire est concordante avec la diminution des dimensions diastoliques et systoliques du ventricule. Paradoxalement, la diminution de l'ACT des cellules ne s'est pas traduite par un amincissement de la paroi ventriculaire. Il est important de noter que le remodelage du myocarde peut impliquer un réarrangement des cellules mais aussi de la matrice extracellulaire. Nous envisageons donc que le RM peut réguler ce remodelage des cardiomyocytes en agissant sur le cytosquelette et/ou la matrice.

L'ensemble de ces résultats nous a donc permis d'associer l'activité des RM à l'adaptation de la structure du cœur lors de la gestation. La voie médiée par le RM est nécessaire puisque l'inhibition de cette voie conduit à un remodelage présentant des caractéristiques pathologiques. Néanmoins, il apparaît qu'il ne s'agit pas de la seule voie responsable. Etant donné que notre étude sur la gestation normale nous avait permis de découvrir la relation étroite qui existe entre les adaptations métaboliques et la contractilité des cardiomyocytes, nous voulions déterminer si le RM pouvait aussi être impliqué dans la régulation de cette relation fonctionnelle.

Régulation de la contractilité

Notre étude sur la gestation normale a montré que la contractilité des cardiomyocytes est augmentée en présence de lactate et de pyruvate dont les concentrations plasmatiques sont augmentées. Les voies de régulation impliquées dans le remodelage fonctionnel cardiaque lors de la grossesse sont inconnues.

Nos résultats présentés dans l'article 2 montrent que l'adaptation de la concentration plasmatique du lactate ne pouvait pas avoir lieu quand le RM était inhibé. L'inhibition du RM par contre n'a pas d'effet significatif sur la concentration de pyruvate ni sur celle du glucose. Ce résultat a permis de mettre en évidence l'influence du RM sur la concentration

du lactate lors de la gestation, ce qui n'avait pas été fait auparavant. La concentration du lactate est augmentée par rapport à celle de la rate nullipare traitée au canrénoate mais reste inférieure à celle de la rate en gestation normale, ce qui indique que d'autres voies de régulation sont impliquées dans cette adaptation métabolique.

Pour agir sur la concentration du lactate, il faut agir sur son transport ou sa formation. Etant donné que la glycolyse est réduite lors de la grossesse, une action sur le transport semble plus vraisemblable. Au niveau placentaire, le transporteur du lactate MCT4 est plus exprimé sur la membrane du côté maternel que du côté fœtal [117]. Par ailleurs, différentes études ont prouvé que le RM est exprimé au niveau placentaire [199, 200]. Une des voies de régulation connue pour augmenter l'expression de MCT4 est le facteur HIF «hypoxia inducible factor» (ce qui signifie : facteur activé par l'hypoxie) [201], qui est par ailleurs exprimé dans le placenta [202]. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune étude ne s'est penchée sur la relation entre HIF et le RM.

Nos résultats révèlent aussi que le RM peut modifier le phénotype métabolique du cœur lors de la gestation. L'utilisation du lactate et du pyruvate pour la contraction cellulaire n'est pas possible quand les RM sont inhibés. Ainsi, nous proposons que l'action régulatrice du RM s'effectue là encore via la régulation du transport du lactate. De ce fait, l'action du RM pourrait favoriser l'utilisation du lactate par les cardiomyocytes comme substrats pour la contraction en ciblant les isoformes MCT1, 2 et 4 de son transporteur exprimées dans les cardiomyocytes [87].

Ces résultats indiquent que les RM peuvent contribuer non seulement à l'adaptation du métabolisme du lactate à la gestation mais aussi à l'adaptation du cœur aux changements métaboliques. Les RM semblent être impliqués dans la relation métabolisme/contractilité de deux façons: en facilitant la disponibilité des substrats énergétiques dans le plasma maternel et en favorisant leur utilisation pour la contraction.

L'inhibition du RM pendant la grossesse a exposé des effets distincts de la régulation du glucose, du lactate et du pyruvate sur les courants I_{Ca-L} : le glucose induisant leur diminution. Compte tenu de nos conditions expérimentales, les modifications des courants I_{Ca-L} observées ne peuvent provenir que de la régulation du fonctionnement du canal. Losito et al. [191]. ont observé une différence intéressante entre l'effet de l'ATP

provenant de la glycolyse et celui provenant de la phosphorylation oxydative sur la densité des courants I_{Ca-L} chez le lapin. En effet, ils ont comparé l'effet du cyanure, un inhibiteur de la phosphorylation oxydative à celui de deux inhibiteurs de la glycolyse, le 2-désoxyglucose, analogue du glucose mais qui ne peut être métabolisé par la cellule et l'iodoacétamide qui inhibe la 3-glycéraldéhyde déshydrogénase, une enzyme de la glycolyse. Ils ont démontré que la diminution (d'environ 40%) de la densité des courants I_{Ca-L} dans les cardiomyocytes de lapin se produisait lorsque la glycolyse était inhibée et que l'inhibition de la phosphorylation oxydative n'avait pas d'effet sur leur densité. Il semblerait que le RM favorise le contraire lors de la grossesse car l'effet du glucose sur les courants I_{Ca-L} n'apparaît que lorsqu'il est inhibé. Nous pouvons supposer que cette adaptation des courants calciques est en relation avec la diminution de l'utilisation du glucose par le cœur lors de la grossesse. Le glucose étant essentiel au fœtus, l'intérêt de cette adaptation de la grossesse serait alors de réguler les courants I_{Ca-L} avec l'ATP provenant de l'oxydation du lactate et du pyruvate qui sont plus abondants et moins utilisés par le fœtus.

Remodelage électrique

Adaptation de la repolarisation lors de la gestation

Chez la femme enceinte, le remodelage hypertrophique du cœur est associé à des modifications de ses propriétés électriques plus particulièrement la repolarisation. Cela se manifeste notamment par la prolongation de la durée de l'intervalle QTc de l'ECG [46].

Nous avons enregistré des ECG chez des rates gestantes afin de vérifier si le cœur présentait aussi des changements de repolarisation. Nos résultats présentés dans l'article 3 ont confirmé que le QTc est prolongé chez les rates gestantes, ce qui n'avait pas été démontré auparavant. La prolongation de l'intervalle QTc n'avait été démontrée jusqu'à présent que chez la souris par Eghbali et al. [21]. Ces résultats attestent que cette propriété du ventricule pendant la gestation n'est pas dépendante de l'espèce et que la rate est aussi un modèle adéquat pour l'étude des changements électriques qui sous-tendent la prolongation de l'intervalle QTc chez la femme.

La prolongation de l'intervalle QTc nous a conduits à étudier les modifications des courants potassiques. Nos résultats montrent que les courants I_{to} et I_{K1} sont significativement diminués lors de la gestation alors que le courant I_{sus} n'est pas modifié. Ces caractéristiques du remodelage électrique du cœur chez la rate gestante sont les premières à être identifiées.

La diminution des courants I_{to} se produit souvent en conditions pathologiques [49, 59, 64, 203]. Mis à part notre étude, seule l'étude d'Eghbali et al., effectuée chez la souris gestante, a aussi démontré une diminution de I_{to} dans les cardiomyocytes [21]. La diminution des courants I_{to} est associée à la prolongation du PA [56, 204]. Ainsi, ce résultat est concordant avec le prolongement de l'intervalle QTc du cœur que nous avons observé.

Il existe une différence entre les espèces en ce qui concerne l'expression des canaux potassiques. Il y a deux sortes de courant I_{to} , $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$. Ils qui se distinguent par la constante d'inactivation du courant qui est d'environ 20 ms pour $I_{to,f}$ et de 100-200 ms pour $I_{to,s}$ [59]. En se basant sur les résultats obtenus pour cette constante, nous en avons déduit que le sous-type de I_{to} dans nos enregistrements était $I_{to,f}$, qui est aussi communément appelé I_{to} . Chez l'humain, dans le ventricule, l'ARNm codant pour la sous-unité principale de $I_{to,f}$ est Kv4.3 [205, 206]. Chez le rat, dans le ventricule, les sous-unités du canal de I_{to} sont les protéines Kv4.2/Kv4.3 [207] qui contribuent à la moitié environ du courant I_{to} [208]. Néanmoins, chez la souris, il a été démontré que le canal de I_{to} pouvait être constitué d'homomultimères (Kv4.2 ou Kv4.3) ou d'hétéromultimères (Kv4.2+Kv4.3) et que seule la forme d'hétéromultimères était fonctionnelle [209]. Par ailleurs, chez la souris gestante, Eghbali et al. ont démontré que le courant I_{to} était significativement diminué et que cela était associé à une diminution de l'expression de Kv4.3 [21]. Ces modifications de Kv4.3 indiquent que les rongeurs peuvent aussi servir de modèle pour l'humain. Les propriétés d'activation et d'inactivation du courant I_{to} n'étant pas modifiées dans notre étude, nous supposons que la gestation peut aussi affecter l'expression de Kv4.3.

Peu d'études se sont penchées sur les mécanismes impliqués dans la prolongation de l'intervalle QT pendant la grossesse. De ce fait, la diminution du courant I_{K1} dans le remodelage du cœur électrique lors de la gestation n'a pas été associée à d'autres espèces en gestation. Les données disponibles ont été obtenues dans des conditions d'hypertrophie pathologique et sont contradictoires. En effet, différentes études ont montré une

augmentation [210], une diminution [211] ou aucun changement [212, 213]. Néanmoins, la diminution des courants I_{K1} va dans le même sens que celle des courants I_{to} et est en faveur de la prolongation de l'intervalle QTc.

L'étude du remodelage électrique nous a permis d'établir un lien entre la prolongation de la repolarisation du cœur et la diminution des courants I_{to} et I_{K1} dans les cardiomyocytes.

Régulation de la repolarisation cardiaque

Chez les athlètes, la prolongation du QTc est peu fréquente, sa probabilité étant d'environ 0.4% [214]. Cela indique que la prolongation du QTc lors de l'hypertrophie physiologique ne dépend pas seulement du remodelage morphologique mais plutôt des mécanismes régulateurs des propriétés électriques comme les voies hormonales.

Différentes études ont démontré l'influence significative du RM sur la diminution de la durée de l'intervalle QT chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque [215, 216]. Cependant, ce rôle n'a pas été évalué lors de l'hypertrophie physiologique. Ayant déjà déterminé l'implication du RM dans le remodelage de la morphologie et de la contractilité, nous avons alors évalué le rôle des RM dans la repolarisation cardiaque.

Nos résultats d'ECG montrent que l'activité du RM est nécessaire à l'adaptation de la repolarisation lors de la gestation : son inhibition empêche le prolongement de l'intervalle QTc. Afin de comprendre cet effet du RM sur la repolarisation, nous avons mesuré l'impact de son inhibition sur les courants I_{to} et I_{K1} qui sont diminués lors de la gestation. L'inhibition des RM a affecté les courants I_{to} en empêchant leur diminution mais n'a pas affecté les courants I_{K1} . Ce résultat nous indique que les courants I_{to} et I_{K1} ne sont pas régulés par les mêmes mécanismes lors de la gestation. De plus, cela révèle que la diminution des courants I_{to} a plus d'influence sur la prolongation de la repolarisation lors de la gestation que celle des courants I_{K1} . L'étude d'Eghbali et al. a démontré que les œstrogènes administrés à des souris ovariectomisées induisent une diminution de l'expression de Kv4.3, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine [21], ils suggèrent alors que lors de la gestation l'augmentation des œstrogènes serait responsable de la diminution des courants I_{to} et I_{K1} . Le RM étant aussi un facteur de transcription, il pourrait modifier l'expression de Kv4.3 pour induire la diminution des courants I_{to} . Par ailleurs, comme nous

l'avons démontré dans le second article, le RM favorise l'augmentation de la concentration de NADH. Il en découle que les systèmes réducteurs utilisant le NADH comme co-facteur tels que les oxydo-réductases peuvent être affectés et par conséquent le potentiel rédox. Or, il a été démontré chez le rat diabétique que les courants I_{to} peuvent être régulés par le potentiel rédox via les thioréductases qui nécessitent le NADH [217]. Ainsi, la modulation de NADH par le RM pourrait servir de mécanisme de régulation des courants I_{to} .

Notre étude sur le rôle des RM dans le remodelage cardiaque induit par la grossesse a révélé qu'ils interviennent dans la régulation des adaptations morphologiques et fonctionnelles. Nos résultats indiquent que leur activité est nécessaire à l'adaptation de la structure des cardiomyocytes, de la relation métabolisme/fonction contractile et des propriétés repolarisation du cœur. La voie médiée par le RM apparaît comme une voie nécessaire à ces adaptations mais ne semble pas être la seule voie responsable.

LIMITES

Remodelage morphologique

Les études échocardiographiques ont été effectuées sous anesthésie avec l'isoflurane. L'isoflurane a tendance à diminuer la fonction cardiaque tant chez l'humain que les animaux [218-220]. De ce fait, les valeurs des paramètres fonctionnels déterminés à partir des volumes diastoliques et systoliques, tels que la fraction d'éjection, n'ont pas été incluses.

La sonde dont nous disposions était une sonde de 7 MHz qui est relativement grande par rapport à la taille d'un rat. Bien que cette dernière nous ait permis d'obtenir certains résultats significatifs, l'utilisation d'une sonde de 15 MHz qui est plus adéquate pour les rats, nous aurait permis d'augmenter la précision des mesures des paramètres morphologiques. La valeur de la fraction de raccourcissement chez les rates hypertendues laisse supposer que les dimensions sont modifiées, ce que nous n'avons pas pu démontrer.

Remodelage fonctionnel

Les études de contractilité ont été effectuées en présence de lactate et de pyruvate dans le même milieu. Il aurait été nécessaire de les séparer afin de discriminer leurs effets. De plus, afin de déterminer l'effet du lactate ou du pyruvate exogène, il serait aussi nécessaire d'inhiber la LDH pour empêcher l'interconversion du lactate et du pyruvate dans le cytoplasme.

Pour l'étude sur la repolarisation, le contexte métabolique n'a pas été pris en considération et le glucose était le seul substrat énergétique dans le milieu. Il serait pertinent de déterminer si l'effet du RM sur l'intervalle QTc et I_{to} passe par un effet sur l'adaptation du métabolisme des cardiomyocytes comme nous l'avons observé pour la contractilité.

PERSPECTIVES

Nos travaux ont été effectués avec des rates en fin de gestation, les changements induits par la gestation étant plus importants à cette période. Cependant, il serait nécessaire d'effectuer l'étude à des moments plus précoces de la gestation pour déterminer à quel moment le remodelage morphologique et fonctionnel est initié et observer ses différentes phases.

Remodelage morphologique

L'ajout de sarcomères que nous avons observé dans le remodelage morphologique lors de la gestation normale implique des changements dans la synthèse des protéines constitutives des sarcomères, la myosine et l'actine. Peu d'études ont caractérisé les marqueurs moléculaires de l'hypertrophie cardiaque induite par la gestation. Une étude effectuée chez la souris gestante a démontré que les gènes des chaînes lourdes de l' α -myosine et de la β -myosine cardiaques n'étaient pas modifiés lors de la grossesse [21]. La situation est différente chez les rates gestantes puisqu'une augmentation de l'expression de la chaîne lourde de la β -myosine a déjà été observée [126]. Ainsi, le profil moléculaire semble varier selon les espèces. L'étude mentionnée ne s'est pas intéressée aux changements de l'actine mais il est fort probable que l'expression de l'actine soit aussi augmentée. Nos futures expériences devraient déterminer les modifications de l'actine et de la myosine lors de la gestation normale pour caractériser le profil moléculaire de la gestation chez la rate.

Régulation de la morphologie

La cascade de signalisation par laquelle le RM contribue à ce remodelage est encore inconnue. Une des voies envisageables est celle de la cardiotrophine (CT-1). La CT-1, protéine exprimée dans le myocarde, est capable d'induire *in vitro* l'hypertrophie des cardiomyocytes néonataux de rat en générant l'ajout de sarcomères en série [221], caractéristique du remodelage induit par une surcharge volumique. La CT-1 est exprimée chez différentes espèces, la souris [222], le rat [221] et l'humain [223]. Le lien entre la CT-1 et le remodelage induit par la grossesse n'a pas été évalué, pourtant la grossesse

représente une condition intéressante pour clarifier le rôle physiologique que peut avoir cette protéine.

Les mécanismes qui régulent l'activité de la CT-1 ne sont pas encore élucidés. Cependant, une des voies de régulation hormonale proposée est celle des minéralocorticoïdes. En effet, l'aldostérone a induit une augmentation de l'ARNm et de la protéine de CT-1 dans les cellules HL-1, une lignée cellulaire provenant du cœur de souris [224]. Cet effet a été inhibé par la spironolactone, un inhibiteur du RM. De plus, l'aldostérone induit une hypertrophie cellulaire caractérisée par une augmentation de l' α -actine [224] et la β -myosine [225]. L'inhibition de la CT-1 et de son récepteur a empêché cet effet hypertrophique. De plus, une étude *in vivo* chez la souris a aussi démontré son potentiel hypertrophique [222]. Dans un modèle de souris portant une mutation nulle pour le gène de CT-1, l'injection d'aldostérone n'a pas modifié l'expression de la CT-1 dans le myocarde. Ainsi, la CT-1 apparaît comme un acteur possible de la voie de signalisation du RM régulant le remodelage morphologique des cardiomyocytes pendant la grossesse. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en déterminant l'expression de la CT-1 et de son récepteur dans les cardiomyocytes des rates en gestation normale et traitées au canrénoate.

Il est important de souligner que le remodelage du myocarde implique un réarrangement des cellules mais aussi de la matrice extracellulaire. L'étude de Fejes-Toth [226] réalisée avec une lignée de cardiomyocytes de rat (H9C2) exprimant le RM a permis d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée par le RM et ayant un rôle dans le remodelage cardiaque. Parmi eux, se trouvent des gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire, notamment le système PAI-1/UPAR.

L'«urokinase-type plasminogen activator» (UPA) est impliquée dans la conversion du plasminogène en plasmine et cette dernière est une protéase extracellulaire capable de dégrader la matrice extracellulaire. L'UPAR est le récepteur cellulaire de l'UPA [227]. L'UPA possède un inhibiteur endogène appelé «plasminogen activator inhibitor 1» (PAI-1). Le rôle d'UPA/UPAR et PAI-1 dans le remodelage cardiaque a été démontré chez la souris dans les processus de formation de la cicatrice et de rupture cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde [228]. En effet, le traitement avec le PAI-1 a protégé de la rupture cardiaque et permis la guérison de la zone infarctée [228]. L'étude de Fejes-Toth [226] permet de supposer que l'activation du RM assurerait une régulation du système

UPA/UPAR et PAI-1 en induisant une augmentation de l'expression de PAI-1 et une diminution de celle d'UPAR. Ces résultats suggèrent que le RM peut contribuer à la régulation du remodelage des cellules cardiaques en contrôlant la dégradation de la matrice extracellulaire. Afin de confirmer cette hypothèse, l'expression de ces facteurs devrait être déterminée dans les cellules de rates gestantes traitées et celles de rates en gestation normale.

Relation métabolisme/contractilité

Lors de la gestation, le phénotype métabolique des cardiomyocytes est en faveur de l'utilisation du lactate pour la contraction. Par analogie avec l'exercice d'endurance pour lequel le transport du lactate est accentué dans le cœur pour augmenter l'ATP disponible [188, 189], la gestation pourrait induire des changements de l'expression des MCT.

Nos résultats indiquent que le RM est impliqué dans l'adaptation du métabolisme du lactate et dans l'utilisation du lactate par les cardiomyocytes. Pour ces deux adaptations, nos résultats convergent vers la possibilité que le RM agisse au niveau du transport du lactate. Etant donné que le RM est un facteur de transcription, nous supposons qu'une des voies pour réguler ces adaptations fonctionnelles serait la modification de l'expression des MCT.

Les futures expériences devraient déterminer l'expression de l'ARNm et des protéines de MCT4 au niveau du placentaire [117] au niveau placentaire côté maternel et MCT1, 2 et 4 [87] au niveau des cardiomyocytes, chez des rates gestantes et des rates traitées au canrénoate.

Remodelage électrique

Dans notre étude, lors de la gestation, le courant I_{to} est diminué mais ses propriétés d'activation et d'inactivation ne sont pas modifiées. Le courant I_{K1} est aussi diminué lors de la gestation. Nous supposons que la gestation affecte l'expression de leur sous-unité principale respective Kv4.3 et Kir2.1. Nous envisageons d'utiliser l'immunobuvardage de type western sur des préparations membranaires de rates gestantes afin d'étayer cette hypothèse.

Nos résultats ont aussi montré que le RM est impliqué dans la repolarisation et l'adaptation du courant I_{to} à la gestation. Ainsi, le RM pourrait réguler la diminution des courants I_{to} en modifiant l'expression de Kv4.3. Nous pourrions vérifier cela en effectuant des immunobuvardages de type Western dans les cellules des rates gestantes traitées au canrénoate *vs* des rates en gestation normale.

CONCLUSION

L'hypertrophie cardiaque induite par la grossesse est une hypertrophie physiologique dont les caractéristiques et les mécanismes restent encore à élucider. Le manque de connaissance dans les changements induits lors de la grossesse normale est encore une entrave à l'élaboration de meilleurs traitements pour les maladies cardiovasculaires développées lors de la grossesse.

Ainsi, l'originalité de nos travaux réside dans la caractérisation, à l'échelle cellulaire, des changements morphologiques et fonctionnels associés au remodelage cardiaque induit par la gestation chez la rate. Notre étude de la morphologie a mis en évidence une hypertrophie excentrique des cardiomyocytes qui se met en place en respectant la proportionnalité des dimensions cellulaires. Sur le plan fonctionnel, notre étude a révélé l'existence d'un lien fort entre les adaptations du métabolisme du lactate et du pyruvate et la contractilité cellulaire. Par ailleurs, le remodelage électrique se caractérise par une prolongation de la repolarisation cœur qui est concordante avec la diminution des courants potassiques I_{K1} et I_{to} dans les cardiomyocytes.

Notre étude est la première à associer les récepteurs aux minéralocorticoïdes à la régulation du remodelage physiologique induit par la grossesse. En effet, ils ont un rôle essentiel dans la mise en place de l'hypertrophie cellulaire. Leur régulation de la fonction contractile des cardiomyocytes s'effectue via les adaptations métaboliques de la grossesse. De plus, ils interviennent dans le remodelage électrique du cœur en contribuant à la prolongation de la repolarisation du cœur. Cet effet a pour cible les courants I_{to} .

La caractérisation du remodelage cardiaque lors de la gestation normale a permis d'identifier les singularités de l'hypertension gestationnelle et leurs conséquences. Les altérations de l'adaptation morphologique du cœur se manifestent par un défaut de l'expansion volumique résultant de dimensions cellulaires disproportionnées. L'incapacité de produire les changements métaboliques mène à des altérations du fonctionnement contractile. Ces altérations à l'échelle cellulaire ont généré la mise en place de mécanismes de compensation si bien qu'au niveau du cœur entier le fonctionnement est préservé. Ces résultats illustrent les avantages que présentent les études à l'échelle cellulaire car tandis

que les caractéristiques d'inadaptation ont été identifiées à l'échelle des cardiomyocytes, le cœur était asymptomatique. Ces altérations peuvent évoluer vers des complications. Leur caractérisation pourrait par conséquent permettre d'envisager des solutions thérapeutiques plus précoces pour traiter les maladies cardiovasculaires pendant la grossesse

Références

- [1] Tortora GJ, Grabowski SR. Système cardiovasculaire: Le coeur. Principes d'anatomie et de physiologie. Bruxelles: De Boeck Université; 2002; p. 672-708.
- [2] Katz AM. Structure of the heart and cardiac muscle. In. Physiology of the heart. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 3-39.
- [3] Gallery ED, Hunyor SN, Gyory AZ. Plasma volume contraction: a significant factor in both pregnancy-associated hypertension (pre-eclampsia) and chronic hypertension in pregnancy. *Q J Med* 1979;48:593-602.
- [4] Masilamani S, Castro L, Baylis C. Pregnant rats are refractory to the natriuretic actions of atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1994;267:R1611-R1616.
- [5] Landesman R, Miller MM. Blood volume changes during the immediate postpartum period. *Obstet Gynecol* 1963;21:40-8.
- [6] Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Dis* 1987;9:296-302.
- [7] Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:608-13.
- [8] Brochu M, Gauvin JP, St Louis J. Increase of aldosterone secretion in adrenal cortex suspensions derived from pregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;212:147-52.
- [9] Brochu M, Picard S, Jodoin S, St Louis J. Effects of dihydropyridines on aldosterone secretion in adrenal capsule preparations from pregnant rats. *Am J Physiol* 1997;272:E18-E24.
- [10] Brown MA, Nicholson E, Gallery ED. Sodium-renin-aldosterone relations in normal and hypertensive pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95:1237-46.
- [11] Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F et al. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension* 2007;49:604-11.

- [12] Lindheimer MD, Barron WM, Davison JM. Osmoregulation of thirst and vasopressin release in pregnancy. *Am J Physiol* 1989;257:F159-F169.
- [13] Baylis C. Glomerular filtration and volume regulation in gravid animal models. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1994;8:235-64.
- [14] Clapp JF, III, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 1997;80:1469-73.
- [15] Carbillion L, Uzan M, Uzan S. Pregnancy, vascular tone, and maternal hemodynamics: a crucial adaptation. *Obstet Gynecol Surv* 2000;55:574-81.
- [16] Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol* 1989;256:H1060-H1065.
- [17] Novak J, Reckelhoff J, Bumgarner L, Cockrell K, Kassab S, Granger JP. Reduced sensitivity of the renal circulation to angiotensin II in pregnant rats. *Hypertension* 1997;30:580-4.
- [18] Kassab S, Miller MT, Hester R, Novak J, Granger JP. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension* 1998;31:315-20.
- [19] Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D et al. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998;54:2056-63.
- [20] Gilson GJ, Mosher MD, Conrad KP. Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol* 1992;263:H1911-H1918.
- [21] Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96:1208-16.
- [22] Rubler S, Damani PM, Pinto ER. Cardiac size and performance during pregnancy estimated with echocardiography. *Am J Cardiol* 1977;40:534-40.
- [23] Bonica JJ, McDonald JS. Principles and Practice of Obstetric Analgesia and Anesthesia. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1995, p. 47.

- [24] Mone SM, Sanders SP, Colan SD. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation* 1996;94:667-72.
- [25] Pelliccia A, Dipaolo FM. Cardiac remodeling in women athletes and implications for cardiovascular screening. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1436-9.
- [26] Hoogsteen J, Hoogeveen A, Schaffers H, Wijn PF, van Hemel NM, van der Wall EE. Myocardial adaptation in different endurance sports: an echocardiographic study. *Int J Cardiovasc Imaging* 2004;20:19-26.
- [27] Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:849-56.
- [28] Katz AM. Heart failure. In: *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 546-78.
- [29] Simmons LA, Gillin AG, Jeremy RW. Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1627-H1633.
- [30] Katz AM. The contractile proteins. In: *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 103-26.
- [31] Morita H, Seidman J, Seidman CE. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:518-26.
- [32] Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975;56:56-64.
- [33] Guyton AC, Hall JE. Débit cardiaque, retour veineux et leur régulation. In: *Précis de physiologie médicale*. Padoue: Piccin; 2003; p. 230-43.
- [34] Massicotte G, St-Louis J, Schiffrin EL. Heart rate reflex responses during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats following angiotensin II and vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;186:294-8.
- [35] Katz AM. The heart as a muscular pump. In: *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 317-36.

- [36] Katz AM. Excitation-contraction coupling: extracellular and intracellular calcium cycles. In. *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 162-99.
- [37] Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-53.
- [38] Khurana I. Cardiovascular system. In. *Textbook of medical physiology*: Elsevier; 2006; p. 241-396.
- [39] Katz AM. Cardiac ion channels. In. *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 370-90.
- [40] Katz AM. The cardiac action potential. In. *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 391-423.
- [41] Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J* 1994;21:30-41.
- [42] Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflugers Arch* 2000;439:588-99.
- [43] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205.
- [44] Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999;42:339-60.
- [45] Cooper GM. Cytoskeleton and cell movement. In. *The cell, a molecular approach*: Sinauer; 2002.
- [46] Lechmanova M, Parizek A, Halaska M, Slavicek J, Kittnar O. Changes of the electrical heart field and hemodynamic parameters in the 34th to 40th weeks of pregnancy and after delivery. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266:145-51.
- [47] Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;54:157-62.

- [48] Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JG. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 1993;88:93-102.
- [49] Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;75:473-82.
- [50] Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;491 (Pt 1):31-50.
- [51] Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;73:139-57.
- [52] Kenyon JL, Gibbons WR. Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;73:117-38.
- [53] Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol* 1996;270:H2157-H2168.
- [54] Ravesloot JH, Rombouts E. 2,4-dinitrophenol acutely inhibits rabbit atrial Ca^{2+} - sensitive Cl^- current (I(TO2)). *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:766-73.
- [55] Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Comparative mechanisms of 4-aminopyridine-resistant Ito in human and rabbit atrial myocytes. *Am J Physiol* 1995;269:H463-H472.
- [56] Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:379-85.
- [57] Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;97:973-1011.
- [58] Benitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C et al. Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* 1993;469:111-38.

- [59] Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:851-72.
- [60] Gaborit N, Le BS, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;582:675-93.
- [61] Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999;113:661-78.
- [62] Guo W, Jung WE, Marionneau C, Aimond F, Xu H, Yamada KA et al. Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I_{to,f} and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ Res* 2005;97:1342-50.
- [63] Capuano V, Ruchon Y, Antoine S, Sant MC, Renaud JF. Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac K⁺ channels in the rat. *Mol Cell Biochem* 2002;237:1-10.
- [64] Nabauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:386-94.
- [65] Mays DJ, Foose JM, Philipson LH, Tamkun MM. Localization of the Kv1.5 K⁺ channel protein in explanted cardiac tissue. *J Clin Invest* 1995;96:282-92.
- [66] Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 1991;5:331-7.
- [67] Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;80:572-9.
- [68] Momtaz A, Coulombe A, Richer P, Mercadier JJ, Coraboeuf E. Action potential and plateau ionic currents in moderately and severely DOCA-salt hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:2511-22.

- [69] Thuringer D, Coulombe A, Deroubaix E, Coraboeuf E, Mercadier JJ. Depressed transient outward current density in ventricular myocytes from cardiomyopathic Syrian hamsters of different ages. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:387-401.
- [70] Gomez R, Nunez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpon E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 + minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;146:146-61.
- [71] Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984;347:641-57.
- [72] Delmar M, Ibarra J, Davidenko J, Lorente P, Jalife J. Dynamics of the background outward current of single guinea pig ventricular myocytes. Ionic mechanisms of hysteresis in cardiac cells. *Circ Res* 1991;69:1316-26.
- [73] Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Molecular biology of K(+) channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med* 2001;110:50-9.
- [74] Ishihara K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel IRK1. The role of weak blocking molecules. *J Gen Physiol* 1997;109:229-43.
- [75] Chorvatova A, Hussain M. Effects of caffeine on potassium currents in isolated rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 2003;446:422-8.
- [76] Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:379-85.
- [77] Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G. Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1999;42:391-401.
- [78] Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K⁺ channel down-regulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):229-45.
- [79] Volk T, Nguyen TH, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H. Regional alterations of repolarizing K⁺ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol* 2001;530:443-55.

- [80] Guyton AC, Hall JE. Métabolisme des hydrates de carbone en formation d'adénosine triphosphate. In. Précis de physiologie médicale. Padoue: Piccin; 2003; p. 821-8.
- [81] van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 1992;72:881-940.
- [82] RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-9.
- [83] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005;85:1093-129.
- [84] Schwartz GG, Greyson C, Wisneski JA, Garcia J. Inhibition of fatty acid metabolism alters myocardial high-energy phosphates in vivo. *Am J Physiol* 1994;267:H224-H231.
- [85] Voet D, Voet JG. Glycolyse. In. Biochimie. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998; p. 443-70.
- [86] Mallet RT. Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:136-48.
- [87] Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006;31:31-9.
- [88] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Glycolysis and gluconeogenesis. In. *Biochemistry*. New York: W.H Freeman and Co.; 2002.
- [89] Katz AM. Energetics and energy production. In. *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; p. 40-79.
- [90] Goldhaber J I. Metabolism in normal and ischemic myocardium. Chap.7. *The myocardium*. London: Academic Press; 1997.
- [91] Voet D, Voet JG. Autres voies du métabolisme des glucides. In. *Biochimie*. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998; p. 606.

- [92] Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996;35:243-82.
- [93] Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, Glatz JF. Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res* 1997;38:745-58.
- [94] Luiken JJ, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 1999;34 Suppl:S169-S175.
- [95] Stremmel W, Pohl L, Ring A, Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 2001;36:981-9.
- [96] Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y et al. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem* 2003;278:16039-44.
- [97] Voet D, Voet JG. Métabolisme des lipides. In. *Biochimie*. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998; p. 662-726.
- [98] Ussher JR, Lopaschuk GD. Clinical implications of energetic problems in cardiovascular disease. *Heart Metab* 2006;32:9-17.
- [99] Villar J, Cogswell M, Kestler E, Castillo P, Menendez R, Repke JT. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1344-52.
- [100] Lopez-Luna P, Munoz T, Herrera E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci* 1986;39:1389-93.
- [101] Kalhan S, Parimi P. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 2000;24:94-106.
- [102] Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1554-62.
- [103] Gude NM, Stevenson JL, Rogers S, Best JD, Kalionis B, Huisman MA et al. GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. *Placenta* 2003;24:566-70.

- [104] Ericsson A, Hamark B, Powell TL, Jansson T. Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* 2005;20:521-30.
- [105] Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Cauzac M, Charron MJ, Girard J et al. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4097-101.
- [106] Hauguel-de MS, Challier JC, Kacemi A, Cauzac M, Malek A, Girard J. The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2689-94.
- [107] Lasuncion MA, Lorenzo J, Palacin M, Herrera E. Maternal factors modulating nutrient transfer to fetus. *Biol Neonate* 1987;51:86-93.
- [108] Holness MJ, Changani KK, Sugden MC. Progressive suppression of muscle glucose utilization during pregnancy. *Biochem J* 1991;280 (Pt 2):549-52.
- [109] Herrera E, Knopp RH, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J Clin Invest* 1969;48:2260-72.
- [110] Felig P, Lynch V. Starvation in human pregnancy: hypoglycemia, hypoinsulinemia, and hyperketonemia. *Science* 1970;170:990-2.
- [111] Assel B, Rossi K, Kalhan S. Glucose metabolism during fasting through human pregnancy: comparison of tracer method with respiratory calorimetry. *Am J Physiol* 1993;265:E351-E356.
- [112] Zorzano A, Herrera E. Effects of anesthetics and starvation on in vivo gluconeogenesis in virgin and pregnant rats. *Metabolism* 1984;33:553-8.
- [113] Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1667-72.
- [114] Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1008-14.

- [115] Piquard F, Schaefer A, Dellenbach P, Haberey P. Lactate movements in the term human placenta in situ. *Biol Neonate* 1990;58:61-8.
- [116] Alonso de la Torre SR, Serrano MA, Alvarado F, Medina JM. Carrier-mediated L-lactate transport in brush-border membrane vesicles from rat placenta during late gestation. *Biochem J* 1991;278 (Pt 2):535-41.
- [117] Settle P, Mynett K, Speake P, Champion E, Doughty IM, Sibley CP et al. Polarized lactate transporter activity and expression in the syncytiotrophoblast of the term human placenta. *Placenta* 2004;25:496-504.
- [118] Allard MF, Schonekess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 1994;267:H742-H750.
- [119] Heather LC, Cole MA, Lygate CA, Evans RD, Stuckey DJ, Murray AJ et al. Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart. *Cardiovasc Res* 2006;72:430-7.
- [120] Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Papageorgiou I, Terrand J, Lerch R. Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. *Cardiovasc Res* 2001;52:407-16.
- [121] Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996;94:2837-42.
- [122] el Alaoui-Talibi Z, Landormy S, Loireau A, Moravec J. Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat hearts. *Am J Physiol* 1992;262:H1068-H1074.
- [123] Regitz V, Bossaller C, Strasser R, Muller M, Shug AL, Fleck E. Metabolic alterations in end-stage and less severe heart failure--myocardial carnitine decrease. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:611-7.
- [124] Masumura Y, Kobayashi A, Yamazaki N. Myocardial free carnitine and fatty acylcarnitine levels in patients with chronic heart failure. *Jpn Circ J* 1990;54:1471-6.

- [125] Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C et al. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1055-H1063.
- [126] Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V et al. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:952-9.
- [127] Pippal JB, Fuller PJ. Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 2008;41:405-13.
- [128] Funder JW, Feldman D, Edelman IS. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem* 1972;3:209-18.
- [129] Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 2002;26:8-20.
- [130] Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987;14:859-66.
- [131] Barnett CA, Pritchett EL. Detection of corticosteroid type I binding sites in heart. *Mol Cell Endocrinol* 1988;56:191-8.
- [132] Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992;71:503-10.
- [133] Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994;135:834-40.
- [134] Jensen E, Wood C, Keller-Wood M. The normal increase in adrenal secretion during pregnancy contributes to maternal volume expansion and fetal homeostasis. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:362-71.
- [135] Nolten WE, Lindheimer MD, Oparil S, Ehrlich EN. Desoxycorticosterone in normal pregnancy. I. Sequential studies of the secretory patterns of desoxycorticosterone, aldosterone, and cortisol. *Am J Obstet Gynecol* 1978;132:414-20.

- [136] Beausejour A, Auger K, St Louis J, Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H375-H383.
- [137] Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2001;264:182-5.
- [138] Walker BR, Williamson PM, Brown MA, Honour JW, Edwards CR, Whitworth JA. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and its inhibitors in hypertensive pregnancy. *Hypertension* 1995;25:626-30.
- [139] Escher G, Cristiano M, Causevic M, Baumann M, Frey FJ, Surbek D et al. High aldosterone-to-renin variants of CYP11B2 and pregnancy outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1870-5.
- [140] Shojaati K, Causevic M, Kadereit B, Dick B, Imobersteg J, Schneider H et al. Evidence for compromised aldosterone synthase enzyme activity in preeclampsia. *Kidney Int* 2004;66:2322-8.
- [141] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
- [142] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
- [143] Walker BR, Williamson PM, Brown MA, Honour JW, Edwards CR, Whitworth JA. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and its inhibitors in hypertensive pregnancy. *Hypertension* 1995;25:626-30.
- [144] Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988;2:986-9.
- [145] Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988;242:583-5.

- [146] Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 2006;47:656-64.
- [147] Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93:69-76.
- [148] Funder JW. RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:121-5.
- [149] Bassien-Capsa V, Fouron JC, Comte B, Chorvatova A. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc Res* 2006;69:423-31.
- [150] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-62.
- [151] Perrier E, Kerfant BG, Lalevee N, Bideaux P, Rossier MF, Richard S et al. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:776-83.
- [152] Beaufils M. Pregnancy-related hypertension. *Rev Med Interne* 2002;23:927-38.
- [153] Beckmann CRB, Ling FW, Barzansky BM, Herbert WNP, Laube DW, Smith RP. Hypertension in pregnancy. In: *Obstetrics and Gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010; p. 175-81.
- [154] Novelli GP, Valensise H, Vasapollo B, Larciprete G, Altomare F, Di PG et al. Left ventricular concentric geometry as a risk factor in gestational hypertension. *Hypertension* 2003;41:469-75.
- [155] Silver HM, Lambert-Messerlian GM, Star JA, Hogan J, Canick JA. Comparison of maternal serum total activin A and inhibin A in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestationally hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1131-7.
- [156] Novelli GP, Valensise H, Vasapollo B, Larciprete G, Di PG, Altomare F et al. Are gestational and essential hypertension similar? Left ventricular geometry and diastolic function. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:225-37.

- [157] Carlstrom M, Wentzel P, Skott O, Persson AE, Eriksson UJ. Angiogenesis inhibition causes hypertension and placental dysfunction in a rat model of preeclampsia. *J Hypertens* 2009;27:829-37.
- [158] Fedorova OV, Simbirtsev AS, Kolodkin NI, Kotov AY, Agalakova NI, Kashkin VA et al. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension. *J Hypertens* 2008;26:2414-25.
- [159] Auger K, Beausejour A, Brochu M, St Louis J. Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1848-H1856.
- [160] Hagedorn KA, Cooke CL, Falck JR, Mitchell BF, Davidge ST. Regulation of vascular tone during pregnancy: a novel role for the pregnane X receptor. *Hypertension* 2007;49:328-33.
- [161] St-Louis J, Brochu M. [The cardiovascular paradox of pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 2007;23:944-9.
- [162] Karim A. Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev* 1978;8:151-88.
- [163] Mark PJ, Augustus S, Lewis JL, Hewitt DP, Waddell BJ. Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: impact on placental corticosterone levels and regulation by progesterone. *Biol Reprod* 2009;80:1209-15.
- [164] Brochu M, Lehoux JG, Picard S. Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 1997;138:2354-8.
- [165] Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail* 2002;8:S264-S268.
- [166] Stevens A, Lowe J. Histologie: restez en ligne! In. *Histologie humaine*. Bruxelles: de Boeck Université; 1997; p. 1-8.
- [167] Bonnin A, Broussouloux C, Convard J, Legmann P, Seguin G, Bléry M. Bases physiques de l'échographie. In. *Echographie*. Paris: Masson; 2004; p. 1-25.
- [168] St-Louis J, Massicotte G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1985;37:1351-7.

- [169] Molleman A. Basic theoretical principles. In. Patch clamping *An introductory guide to patch clamp electrophysiology*. Chichester: Wiley & sons Ltd; 2003; p. 5-42.
- [170] Belles B, Malecot CO, Hescheler J, Trautwein W. "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflugers Arch* 1988;411:353-60.
- [171] Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 1991;37:15-26.
- [172] Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1737-46.
- [173] Borghi C, Esposti DD, Immordino V, Cassani A, Boschi S, Bovicelli L et al. Relationship of systemic hemodynamics, left ventricular structure and function, and plasma natriuretic peptide concentrations during pregnancy complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:140-7.
- [174] Mesa A, Jessurun C, Hernandez A, Adam K, Brown D, Vaughn WK et al. Left ventricular diastolic function in normal human pregnancy. *Circulation* 1999;99:511-7.
- [175] Onodera T, Tamura T, Said S, McCune SA, Gerdes AM. Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension. *Hypertension* 1998;32:753-7.
- [176] Wang X, Li F, Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: I. Regional hemodynamics and myocyte remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:307-17.
- [177] Stewart JA, Jr., Massey EP, Fix C, Zhu J, Goldsmith EC, Carver W. Temporal alterations in cardiac fibroblast function following induction of pressure overload. *Cell Tissue Res* 2010;340:117-26.
- [178] Guidry C, Grinnell F. Contraction of hydrated collagen gels by fibroblasts: evidence for two mechanisms by which collagen fibrils are stabilized. *Coll Relat Res* 1987;6:515-29.

- [179] Burgess ML, Terracio L, Hirozane T, Borg TK. Differential integrin expression by cardiac fibroblasts from hypertensive and exercise-trained rat hearts. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:78-87.
- [180] Burgess ML, Carver WE, Terracio L, Wilson SP, Wilson MA, Borg TK. Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts. Effects of angiotensin II. *Circ Res* 1994;74:291-8.
- [181] Page E, McCallister LP. Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am J Cardiol* 1973;31:172-81.
- [182] Vazquez BM, Grosso O, Bellido CA, Iavicoli OR, Berenzstein CS, Vega HR et al. Left ventricular geometry in pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:226-30.
- [183] Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasuncion MA, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lipid Res* 1996;37:299-308.
- [184] Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 1992;41:1651-9.
- [185] Chiasson JL, el Achkar GG, Ducros F, Bourque J, Maheux P. Glucose turnover and gluconeogenesis during pregnancy in women with and without insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 1997;20:140-51.
- [186] Soria A, Chicco A, Mocchiutti N, Gutman RA, Lombardo YB, Martin-Hidalgo A et al. A sucrose-rich diet affects triglyceride metabolism differently in pregnant and nonpregnant rats and has negative effects on fetal growth. *J Nutr* 1996;126:2481-6.
- [187] Evans RK, Schwartz DD, Gladden LB. Effect of myocardial volume overload and heart failure on lactate transport into isolated cardiac myocytes. *J Appl Physiol* 2003;94:1169-76.
- [188] Poole RC, Halestrap AP, Price SJ, Levi AJ. The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J* 1989;264:409-18.

- [189] Wang X, Levi AJ, Halestrap AP. Kinetics of the sarcolemmal lactate carrier in single heart cells using BCECF to measure pHi. *Am J Physiol* 1994;267:H1759-H1769.
- [190] Buttrick PM, Schaible TF, Malhotra A, Mattioli S, Scheuer J. Effects of pregnancy on cardiac function and myosin enzymology in the rat. *Am J Physiol* 1987;252:H846-H850.
- [191] Losito VA, Tsushima RG, Diaz RJ, Wilson GJ, Backx PH. Preferential regulation of rabbit cardiac L-type Ca²⁺ current by glycolytic derived ATP via a direct allosteric pathway. *J Physiol* 1998;511 (Pt 1):67-78.
- [192] Papatsonis DN, Lok CA, Bos JM, Geijn HP, Dekker GA. Calcium channel blockers in the management of preterm labor and hypertension in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:122-40.
- [193] Jannet D, Carbonne B, Sebban E, Milliez J. Nifedipine versus metoprolol in the treatment of hypertension during pregnancy: a randomized comparative trial. *Obstet Gynecol* 1994;84:354-9.
- [194] Carbonne B, Jannet D, Touboul C, Khelifati Y, Milliez J. Nifedipine treatment of hypertension during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1993;81:908-14.
- [195] Constantine G, Beevers DG, Reynolds AL, Luesley DM. Nifedipine as a second line antihypertensive drug in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:1136-42.
- [196] Jayawardana J, Lekamge N. A comparison of nifedipine with methyldopa in pregnancy induced hypertension. *Ceylon Med J* 1994;39:87-90.
- [197] Scholz H. Pharmacological aspects of calcium channel blockers. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;10 Suppl 3:869-72.
- [198] Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 2003;108:1831-8.
- [199] Driver PM, Kilby MD, Bujalska I, Walker EA, Hewison M, Stewart PM. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes and corticosteroid hormone receptors in primary cultures of human trophoblast and placental bed biopsies. *Mol Hum Reprod* 2001;7:357-63.

- [200] Hirasawa G, Takeyama J, Sasano H, Fukushima K, Suzuki T, Muramatu Y et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1306-9.
- [201] Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006;281:9030-7.
- [202] Kay HH, Zhu S, Tsoi S. Hypoxia and lactate production in trophoblast cells. *Placenta* 2007;28:854-60.
- [203] Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH et al. Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation* 1994;90:2534-9.
- [204] Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996;78:262-73.
- [205] Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS et al. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;79:659-68.
- [206] Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, Isbrandt D, Pongs O. Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors Channels* 1999;6:387-400.
- [207] Dixon JE, McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 1994;75:252-60.
- [208] Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR. Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *J Physiol* 1997;500 (Pt 1):51-64.
- [209] Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS et al. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res* 2002;90:586-93.
- [210] Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;256:H1450-H1461.

- [211] Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;11:611-22.
- [212] Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res* 1994;28:1180-7.
- [213] Ryder KO, Bryant SM, Hart G. Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc Res* 1993;27:1278-87.
- [214] Basavarajaiah S, Wilson M, Whyte G, Shah A, Behr E, Sharma S. Prevalence and significance of an isolated long QT interval in elite athletes. *Eur Heart J* 2007;28:2944-9.
- [215] Akbulut M, Ozbay Y, Ilkay E, Karaca I, Arslan N. Effects of spironolactone and metoprolol on QT dispersion in heart failure. *Jpn Heart J* 2003;44:681-92.
- [216] Yee KM, Pringle SD, Struthers AD. Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1800-7.
- [217] Li X, Li S, Xu Z, Lou MF, Anding P, Liu D et al. Redox control of K⁺ channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:339-49.
- [218] Murray DJ, Forbes RB, Mahoney LT. Comparative hemodynamic depression of halothane versus isoflurane in neonates and infants: an echocardiographic study. *Anesth Analg* 1992;74:329-37.
- [219] Sousa MG, Carareto R, De-Nardi AB, Brito FL, Nunes N, Camacho AA. Effects of isoflurane on Tei-index of myocardial performance in healthy dogs. *Can Vet J* 2007;48:277-82.
- [220] Skeehan TM, Schuler HG, Riley JL. Comparison of the alteration of cardiac function by sevoflurane, isoflurane, and halothane in the isolated working rat heart. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995;9:706-12.
- [221] Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC et al. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy.

Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem* 1996;271:9535-45.

- [222] Jin H, Yang R, Keller GA, Ryan A, Ko A, Finkle D et al. In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine* 1996;8:920-6.
- [223] Asai S, Saito Y, Kuwahara K, Mizuno Y, Yoshimura M, Higashikubo C et al. The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:320-3.
- [224] Lopez-Andres N, Inigo C, Gallego I, Diez J, Fortuno MA. Aldosterone induces cardiotrophin-1 expression in HL-1 adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2008;149:4970-8.
- [225] Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJ, O'Connell TD et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail* 2004;10:511-8.
- [226] Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A. Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling? *Endocrinology* 2007;148:1502-10.
- [227] Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;72:1-22.
- [228] Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999;5:1135-42.

Annexe I

Permission de Cardiovascular Research pour l'article 1

Date : Mar 19 janvier 2010, 9h 46min 57s

Cc :

Objet : RE: Permission for thesis

Dear Bassien Capsa Valérie,

Thank you for your recent email requesting permission to reuse all or part of your article in a new in a publication, a thesis or as part of your teaching.

As part of your copyright agreement with Oxford University Press you have retained the right, after publication, to use all or part of the article and abstract, in the preparation of derivative works, extension of the article into book-length or in other works, provided that a full acknowledgement is made to the original publication in the journal. As a result, you should not require direct permission from Oxford University Press to reuse you article.

However, if you are required by your new publisher or employer to obtain full written permission prior to reuse, please let us know and we will draw up a letter as soon as possible.

For full details of our publication and rights policy please see the attached link to our website:

http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/publication_rights.html

If you have any other questions or queries, please feel free to contact us.

Yours sincerely

Mubashar Khattak
Permissions Assistant
Oxford University Press
Great Clarendon Street
Oxford
OX2 6DP