



Université de Montréal

**Réduction d'expansion volumique au cours de la gestation:  
conséquence sur la circulation utéro-placentaire**

par

Emilie Bigonnesse

Département de physiologie moléculaire et intégrative

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Juillet, 2014

© Emilie Bigonnesse, 2014

## Résumé

La grossesse est caractérisée par une augmentation du volume circulant maternel et du débit sanguin afin de subvenir aux besoins croissants du fœtus. En diminuant l'expansion volumique maternelle, nous avons développé un modèle de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) chez la rate dans lequel on observe une diminution du diamètre des artères utérines arquées ainsi qu'une diminution de la réponse à l'angiotensine II. Nous avons émis l'hypothèse que comparativement aux rates normales, les vaisseaux utérins des rates RCIU présentent une dysfonction des mécanismes de relaxation dépendant de l'endothélium lors de la réponse à des agents vasoactifs. Notre objectif était de caractériser l'influence de l'endothélium sur la régulation de la réactivité des artères utérines radiales dans notre modèle RCIU. À l'aide d'un myographe pressurisé, des courbes de concentration-réponse à des agents vasoactifs (Phényléphrine (Pe), Carbachol (Cbc) et Nitroprussiate de sodium (SNP)) ont été effectuées, en présence ou en absence d'inhibiteurs des voies principales de la relaxation dépendante de l'endothélium (monoxyde d'azote (NO), prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et facteurs hyperpolarisants dépendant de l'endothélium (EDHF)). Nous avons ainsi démontré que les artères utérines radiales des rates RCIU ont un diamètre plus petit que celles des rates contrôles. Une utilisation plus grande du NO dans la réponse dilatatrice au Cbc a été observée chez les rates RCIU. De plus, l'inhibition de la voie de l'EDHF par l'ajout de KCl aux inhibiteurs de la voie du NO (L-NAME) et des PGI<sub>2</sub> (Ibuprofène) bloque presque complètement la relaxation au Cbc chez les deux groupes.

En conclusion, dans les artères utérines radiales des deux groupes, il y a une participation importante de l'EDHF lors de la dilatation au Cbc. De plus, dans notre modèle RCIU, la voie du NO est activée, probablement afin de compenser la diminution du diamètre des artères et la réduction de la perfusion utérine.

**Mots-clés** : réactivité vasculaire, relaxation dépendante de l'endothélium, NO, EDHF, restriction de croissance intra-utérine.

## **Abstract**

Pregnancy is characterized by an increase of circulating maternal volume and blood flow to respond to the growing needs of the fetus. By decreasing maternal volume expansion, we have developed a model of intrauterine growth restriction (IUGR) in pregnant rat in which there is a reduction in the diameter of the uterine arteries and decreased response to angiotensin II. We hypothesize that, there is a dysfunction of endothelial dependant relaxation mechanisms in response to vasoactive agents in radial uterine arteries from IUGR rats compared to those from normal pregnant rats. Our aim was to characterize the influence of the endothelium on the regulation of uterine radial artery reactivity in a model of decreased uteroplacental perfusion. Concentration-response curves to vasoactive agents (Phenylephrin (Pe), Carbachol (Cbc) et Sodium Nitroprusside (SNP)) were done on radial uterine vessels in pressurized flow chamber in presence of inhibitors of endothelium dependant relaxation pathways (nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and endothelium dependant hypolarizing factors (EDHF)). Firstly we demonstrated that the radial uterine arteries of IUGR rats had a smaller diameter compared to control ones. We also demonstrated a greater use of NO in relaxation response to Cbc in IUGR rats. Finally, the inhibition of EDHF by addition of KCl to other inhibitors (L-NAME and Ibuprofen (Ibu)) almost completely blocked the relaxation in both groups.

In conclusion, our results demonstrate that there is significant involvement of EDHF in endothelium-dependent dilation in the radial uterine arteries in both groups. Moreover, in our model of IUGR, characterized by a reduction in maternal circulating volume, the NO pathway is activated, probably to compensate for the uterine arteries diameter reduction and decreased uterine perfusion.

**Keywords** : Vascular reactivity, endothelium dependant relaxation, NO, EDHF, IUGR.

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	10
<b>1. La grossesse</b> .....	11
1.1 Les modifications cardiovasculaires .....	11
1.2 La rate comme modèle animal .....	12
<b>2. Les conditions pathologiques au cours de la gestation</b> .....	12
2.1 La pré-éclampsie .....	13
2.2 La restriction de croissance intra-utérine .....	13
<b>3. Modèles animaux de RCIU</b> .....	15
3.1 Modèle animal de RCIU utilisé au laboratoire .....	15
<b>4. Histologie vasculaire</b> .....	16
<b>5. Circulation utérine</b> .....	17
5.1 Circulation utérine chez la femme .....	17
5.2 Circulation utérine chez la rate .....	18
5.3 Modifications vasculaires utérines au cours de la gestation .....	19
<b>6. Muscle lisse vasculaire</b> .....	22
6.1 Activité électrique du muscle lisse vasculaire .....	22
6.2 La contraction du muscle lisse vasculaire .....	23
6.3 La relaxation du muscle lisse vasculaire .....	25
6.4 Le tonus myogène .....	28
<b>7. Hypothèse et objectifs</b> .....	28
<b>Manuscrit</b> .....	32
<b>Discussion</b> .....	55
<b>Conclusion</b> .....	57

## Liste des figures

**Figure 1** : Principaux facteurs associés au développement d'une RCIU

**Figure 2** : Structure d'un vaisseau

**Figure 3.1** : Circulation utérine chez la femme

**Figure 3.2** : Circulation utérine chez la rate

**Figure 4** : Invasion de la circulation maternelle par le trophoblaste au cours de la gestation

**Figure 5** : Mécanismes de contraction vasculaire

**Figure 6** : Mécanismes impliqués dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium

## Liste des abréviations

<b>AC</b>	: Adénylate cyclase
<b>Ach</b>	: Acétylcholine
<b>AMPc</b>	: Adénosine monophosphate cyclique
<b>ANG II</b>	: Angiotensine II
<b>BK</b>	: Bradykynine
<b>BK<sub>Ca</sub><sup>2+</sup></b>	: Canal potassique à large conductance activé par le calcium
<b>Cbc</b>	: Carbachol
<b>COX</b>	: Cyclooxygénase
<b>DAG</b>	: Diacylglycérol
<b>EDHF</b>	: Facteurs hyperpolarisants dépendant de l'endothélium
<b>EDRF</b>	: Facteurs relaxants dépendant de l'endothélium
<b>eNOS</b>	: Oxyde nitrique synthase endothéliale
<b>ER</b>	: Réticulum endoplasmique
<b>GCs</b>	: Guanylate cyclase
<b>GMPc</b>	: Guanosine monophosphate cyclique
<b>hCG</b>	: Hormone gonadotrope chorionique humaine
<b>HIF</b>	: Facteur induit par l'hypoxie
<b>hPL</b>	: Hormone lactogène placentaire humaine
<b>Ibu</b>	: Ibuprofène
<b>K<sub>Ca</sub>3.1</b>	: Canal potassique activé par le calcium à conductance intermédiaire
<b>IP<sub>3</sub></b>	: Inositol 1,4, 5-trisphosphate
<b>K<sub>IR</sub></b>	: Canal potassique rectifiant entrant
<b>L-NAME</b>	: NG- Nitro-L-arginine Methyl Ester
<b>L-NNA</b>	: Nitroarginine
<b>LTCC</b>	: Canal calcique de type L
<b>MLC</b>	: Chaîne légère de myosine
<b>MLCK</b>	: Kinase de la chaîne légère de myosine

<b>MLV</b>	: Muscle lisse vasculaire
<b>NO</b>	: Oxyde nitrique
<b>PDE5</b>	: Phosphodiesterase de type 5
<b>PGI<sub>2</sub></b>	: Prostacycline
<b>PIP<sub>2</sub></b>	: Phosphoinostol diphosphate
<b>PLC</b>	: Phospholipase C
<b>PMCA</b>	: Pompe à calcium (Ca <sup>2+</sup> ATPase) de la membrane plasmique
<b>RCIU</b>	: Restriction de croissance intra-utérine
<b>RS</b>	: Réticulum sarcoplasmique
<b>SHR</b>	: Rat spontanément hypertendu
<b>K<sub>Ca</sub>2.3</b>	: Canal potassique activé par le calcium à faible conductance
<b>SNP</b>	: Nitroprussiate de sodium
<b>SOC</b>	: Canal calcique de type SOC (Store Operated Channel)
<b>SRAA</b>	: Système Rénine Angiotensine Aldostérone
<b>VEGF</b>	: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

*À ma famille, Michel, Madeleine, Phil et Matt,  
j'espère toujours vous rendre fiers de moi.*

# Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de recherche Michèle Brochu pour son accueil chaleureux au laboratoire, son soutien et surtout sa compréhension face à toutes les situations que j'ai pu vivre durant ces deux dernières années.

Je tiens à remercier mes collègues de travail, Cynthia, Ève et Yasmine qui ont mis de la vie dans mes journées au laboratoire et qui m'ont supportée et bien conseillée tout au long de mon cheminement. Un merci particulier à mon acolyte "essentiel" Benoit Sicotte grâce à qui j'ai pu développer des habiletés et de l'autonomie face à mon projet. Il m'a permis de développer mon esprit critique et il a su, malgré tout, bien me conseiller et me diriger jusqu'à la fin.

Je veux remercier particulièrement Louise et André qui se sont toujours bien occupé de moi aux moments où j'en avais vraiment besoin. Grâce à eux j'ai pu terminer ma maîtrise dans un endroit tranquille avec tout le soutien nécessaire.

Finalement, merci à Matt, mon amoureux, qui m'a supportée et encouragée du début à la fin. Il a su me démontrer sa fierté et son encouragement, entre autres, en assistant à mes conférences et en corrigeant mes textes et figures. Grâce à lui, je suis restée déterminée et positive malgré toutes les épreuves que nous avons traversées au cours des deux dernières années.

Merci aussi à mes meilleurs amis "Jo pis Claude" et à Claude senior et Jojo qui ont su nous redonner le sourire. Merci d'avoir été là au bon moment et quand on avait besoin de déconnecter pour un week-end.

## **Introduction**

La grossesse est caractérisée par une multitude de changements physiologiques du système cardiovasculaire. Effectivement, la gestation entraîne une augmentation du volume circulant maternel associée à une redistribution du débit cardiaque et à un remodelage vasculaire utérin ayant pour but de favoriser un développement adéquat du fœtus. Cependant, des facteurs environnementaux, génétiques et/ou physiologiques peuvent conduire à un environnement intra-utérin inadéquat pour le fœtus. Il a été démontré qu'une diminution de l'expansion volumique maternelle entraîne une restriction de croissance intrautérine (RCIU). Nos travaux s'intéressent à l'effet de cette expansion volumique sur les vaisseaux utérins en utilisant un modèle animal de RCIU élaboré au laboratoire.

Ce mémoire proposera, en premier lieu, une revue de la littérature sur les modifications vasculaires observées chez la femme et la rate au cours de la gestation, les pathologies associées à la gestation et les modèles de RCIU utilisés. Par la suite, nous aborderons la structure des vaisseaux, la circulation utérine chez la femme et la rate. Finalement, nous présenterons les caractéristiques du muscle lisse vasculaire, et les mécanismes de contraction et de relaxation vasculaires. Par la suite, nos travaux seront présentés sous forme d'article. Finalement, les résultats observés et les perspectives seront discutés plus en détail.

## **1. La grossesse**

Cette période est caractérisée par plusieurs modifications physiques et physiologiques chez la mère qui disparaîtront suite à l'accouchement. Celle-ci doit s'adapter aux besoins du fœtus en développement; son organisme doit être capable de supporter le poids du fœtus grandissant et également de lui apporter tous les nutriments et l'apport en oxygène dont il a besoin. Dans certaines situations, les mécanismes d'adaptation ne se mettent pas en place adéquatement ce qui peut engendrer par exemple, une diminution du volume circulant maternel, une diminution du remodelage vasculaire utérin ou encore une hausse de la pression artérielle. Ces conditions peuvent entraîner un environnement intra-utérin défavorable et des effets négatifs sur la croissance du fœtus. C'est pourquoi depuis plusieurs années, des recherches sont effectuées dans le but de spécifier les causes et les conséquences de ces adaptations maternelles anormales afin de pouvoir les prévenir et/ou de prendre en charge les nouveau-nés issus de ces grossesses.

### **1.1 Les modifications cardiovasculaires**

Au cours de la grossesse, la femme subit de nombreux changements cardiovasculaires qui lui permettront de s'adapter aux besoins grandissant du fœtus. En effet, durant la grossesse, toutes les composantes du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) sont augmentées, on observe une augmentation de la rétention de minéraux tels que le sodium, le potassium et le calcium par les reins, favorisant l'augmentation du volume d'eau extracellulaire de 6 à 8 L (pour revue (25, 73)). Cette augmentation peut atteindre jusqu'à 40% du volume plasmatique initial à partir de la 30<sup>e</sup> semaine de gestation (10, 36, 122). Dès la 10<sup>e</sup> semaine, le débit cardiaque passe de 4,5L/min à 6L/min et sera maintenu tel quel jusqu'à terme (22, 31) dû principalement à l'augmentation du volume d'éjection systolique. D'autre part, une grande partie du flot sanguin est réorienté vers l'utérus, celui-ci passe de 100mL/min en état non-gravide à 1200mL/min à terme (116, 117). Malgré cette augmentation de volume et de débit sanguin, la pression artérielle diminue au cours de la gestation et revient à niveau pré-gestationnel après l'accouchement (35, 82).

Puisque le débit sanguin augmente, cette baisse de pression artérielle pourrait être due une diminution de la résistance périphérique vasculaire (35). D'ailleurs dans la littérature, il est démontré que les oestrogènes stimulent la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de prostacycline (PGI<sub>2</sub>), des substances responsables de la vasorelaxation (59, 91, 96). De plus, la relaxine favorise également la régulation de la compliance artérielle au niveau utérin (123).

## **2. Conditions pathologiques au cours de la gestation**

L'augmentation du volume circulant et du débit sanguin utérin permet un apport sanguin suffisant pour le bon développement foetal. Les adaptations subies par la mère sont nécessaires au bon fonctionnement métabolique de celle-ci. Par contre, certaines anomalies durant la mise en place des mécanismes adaptatifs peuvent se produire telles qu'une diminution du volume circulant, une augmentation de la résistance périphérique ou un mauvais remodelage vasculaire utérin. Ces troubles peuvent engendrer un apport en oxygène et en nutriments insuffisant pouvant être néfaste pour la croissance du foetus, mais aussi une augmentation de la pression artérielle pouvant mettre à risque la vie du foetus et celle de la mère (49, 66, 88, 108).

### **2.1 La pré-éclampsie**

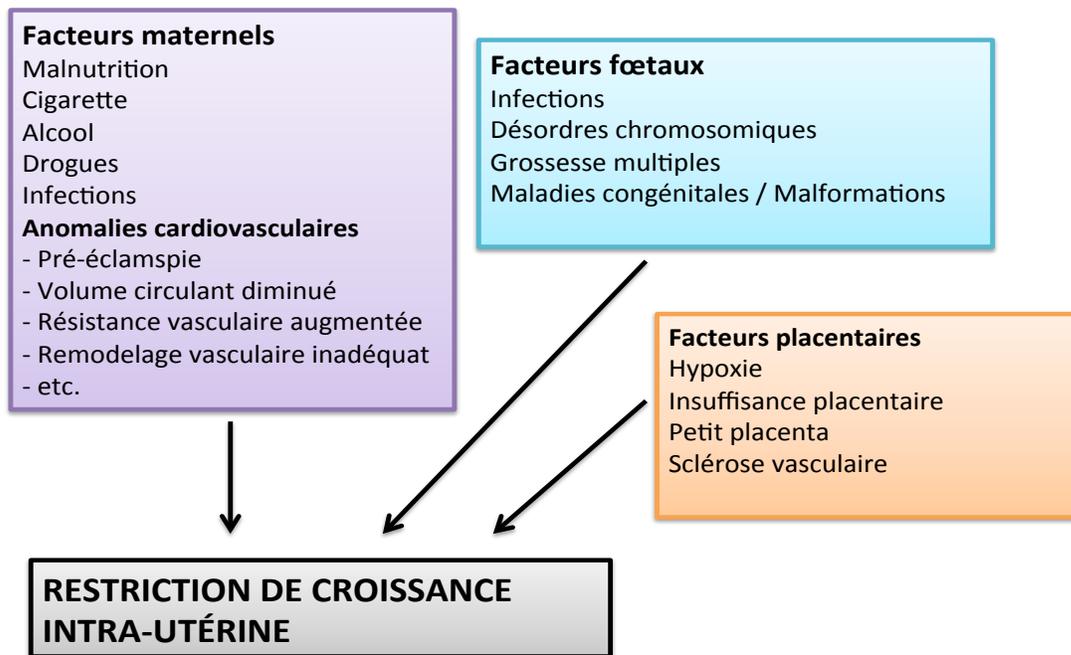
La pré-éclampsie touche près de 5% des grossesses dans le monde (3) et est toujours l'une des principales cause de mortalité maternelle dans les pays en voie de développement. Elle est caractérisée par une mauvaise adaptation vasculaire de la mère associée, entre autres, à une augmentation de la résistance vasculaire systémique et à une dysfonction endothéliale (106). D'un point de vue clinique, la pré-éclampsie est définie par une protéinurie et une hypertension à partir de la 20<sup>e</sup> semaine de gestation (1, 106). Les origines exactes de son développement sont encore inconnues. Par contre, plusieurs situations physiologiques y ont été associés telles qu'une dysfonction endothéliale caractérisée par une baisse de la production de NO et de PGI<sub>2</sub> (pour revue (13)), ou un remodelage vasculaire utérin inadéquat causé par une diminution des

forces de cisaillement (pour revue (88)). La pré-éclampsie est également associée à une réduction de la synthèse des oestrogènes (estriol, d'estrone et d'estradiol-17 $\beta$ ) ainsi qu'à une augmentation de la synthèse de métabolites tels que 4-hydroxyestrone et 16- $\alpha$ -hydroxyestrone (61). De plus, des recherches démontrent une relation entre le développement de la pré-éclampsie et la diminution du débit sanguin utéro-placentaire causé par une augmentation de la résistance vasculaire utérine (66, 93).

## **2.2 La restriction de croissance intra-utérine**

La restriction de croissance intra-utérine (RCIU) est une complication gestationnelle définie par la naissance de bébés ayant un poids de moins de 2500g à la naissance (81). Au sein de la population canadienne, la RCIU touche entre 5 à 10% des naissances (18). Par ailleurs, dans les cas les plus sévères, elle peut être une cause de mortalité *in utero*. Plusieurs facteurs pouvant être impliqués dans le développement de la RCIU ont été identifiés (Figure 1).

Parmi eux, on retrouve, entre autres, une diminution de la circulation utéro-placentaire (67), une déficience du remodelage vasculaire (74), une réduction de l'expansion volumique maternelle (98) et une augmentation de la résistance vasculaire systémique ou utérine (85). De plus, les mauvaises habitudes de vie telles que la consommation de cigarettes et d'alcool (47, 95, 107) et certaines maladies virales (cytomégalovirus, herpes simplex, etc.) (72) peuvent également contribuer au développement d'une RCIU.



**Figure 1:** Principaux facteurs associés au développement d'une RCIU.

### 3. Modèles animaux de RCIU

#### 3.1 La rate comme modèle animal

La rate est un bon modèle pour étudier les changements cardiovasculaires au cours de la grossesse. On observe quelques similarités au point de vue hormonal telles qu'une augmentation graduelle des oestrogènes jusqu'à terme et une augmentation de la progestérone en début de grossesse (46, 70). On retrouve, comme chez l'humain, une rétention sodique, une augmentation du volume circulant et du SRAA ainsi qu'une diminution de la pression artérielle (10). Ces changements surviennent surtout à la dernière semaine (3<sup>e</sup>) de gestation chez la rate ce qui correspond au 2<sup>e</sup> trimestre chez la femme. La diminution de la pression artérielle est également accompagnée d'une baisse de la résistance vasculaire engendrée par

une réduction de la sensibilité aux agents vasoconstricteurs (76). Alors qu'on observe une baisse de réponse aux agents vasoconstricteurs tels que l'ANG II, la PE ou la vasopressine dans les vaisseaux systémiques comme l'aorte (14) et les artères mésentériques (76, 110), on observe une augmentation de la réactivité dans les artères utérines arquées (27, 111). Ces résultats nous permettent de suggérer que les vaisseaux utérins et systémiques ont une adaptation différente à la gestation. Finalement, la courte période de gestation du rat et sa petite taille facilitent beaucoup son hébergement et son coût d'entretien.

Plusieurs modèles animaux ont été développés au cours des années afin de mieux comprendre les mécanismes qui induisent la RCIU. Ils peuvent être caractérisés chez le rat par une diminution de perfusion utérine suite à la ligature des artères utérines vers la fin de la gestation (jour 19) (90) ou par une ligature de l'aorte au niveau de la jonction de l'artère iliaque, à la fin de la 2e semaine de gestation, qui diminue d'environ 40% le débit utérin (49). Par ailleurs, l'administration d'une diète faible en sodium (0,03%) induit une diminution d'expansion volumique maternel qui est associée à une réduction de la perfusion placentaire et à la naissance de rejetons RCIU (99). De plus, une situation d'hypertension spontanée chez la rate (SHR) (40) et un faible apport en protéine (9%) tout au long de la grossesse (17, 125) induisent aussi une RCIU. Plusieurs modèles sont également utilisés afin de spécifier les effets d'un désordre endocrinien tel que le diabète ou encore une surexposition aux glucocorticoïdes via une exposition à la dexaméthasone (100µg/kg/jour) durant la dernière semaine de grossesse (39, 108).

### **3.2 Modèle animal de RCIU utilisé**

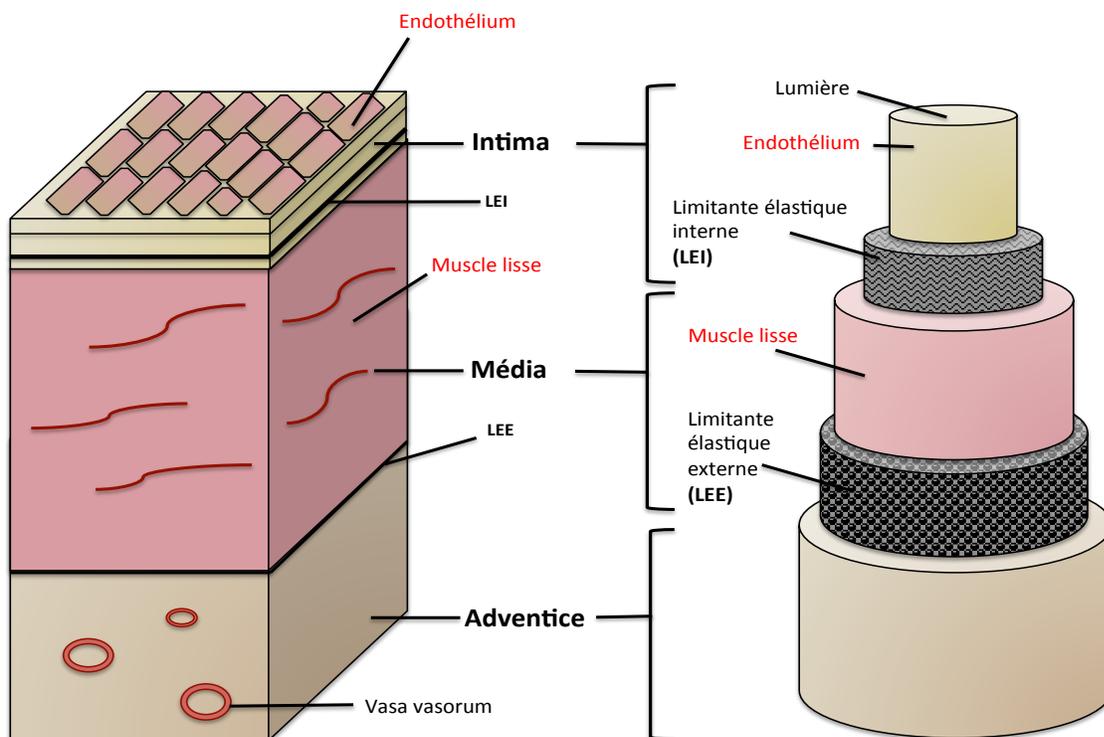
Un modèle de RCIU a été développé dans le laboratoire. En donnant une diète faible en sodium (0.03%) au cours de la dernière semaine de gestation chez la rate Sprague-Dawley, l'expansion volumique maternelle normalement observée lors de la grossesse est réduite. Cela entraîne une diminution de la perfusion utéro-placentaire et la naissance de rejetons présentant une RCIU (11, 99). Comparativement aux rates ayant une gestation normale, on observe une

diminution du diamètre des artères utérines arquées ainsi qu'une augmentation du tonus myogène de ces vaisseaux (112).

Ce modèle de RCIU possède plusieurs avantages qui facilitent nos recherches. En effet, l'administration d'une diète permet d'éviter toute chirurgie *in vivo* et diminue le risque de décès des animaux. De plus, le protocole est simple et de courte durée (1 semaine) il ne requiert donc pas de qualification particulière ce qui permet à chaque membre du laboratoire de participer.

#### 4. Histologie vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur: l'intima, la média et l'adventice (figure 2). La complexité de ces tuniques diffère selon le type de vaisseaux et le rôle de chacun, par exemple, les couches élastiques et musculaires sont beaucoup moins importantes dans les veines que dans les artères (62).



**Figure 2:** Structure d'un vaisseau.

L'intima est composée de tissus conjonctifs et d'une monocouche de cellules endothéliales qui est en contact direct avec le sang et les différentes substances qu'il contient (hormones, nutriments, ions etc.). La média varie énormément selon le type de vaisseaux, surtout dans les artères. Les artères élastiques, telles que l'aorte, les carotides et les artères pulmonaires, sont des vaisseaux qui subissent une grande variation de pression; c'est pourquoi la média de ces vaisseaux est constituée de lames élastiques concentriques entrecroisées de cellules musculaires lisses. Ces unités lamellaires facilitent l'expansion en réponse aux variations du débit sanguin (62). Les artères musculaires (radiales, coronaires, cérébrales, etc.) tant qu'à elles, possèdent une limitante élastique interne et externe qui séparent les trois tuniques (figure 2). La média de ces vaisseaux est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses concentriques entre lesquelles se faufilent quelques lames élastiques (62). Dans les artérioles, la média contient beaucoup moins de cellules musculaires lisses et il n'y a pas de lames élastiques. Finalement, l'adventice est principalement constituée de collagène et contient quelques fibres élastiques, des fibroblastes et des *vasa vasorum*. Sa taille varie selon le type de vaisseau, mais son organisation reste relativement la même (62).

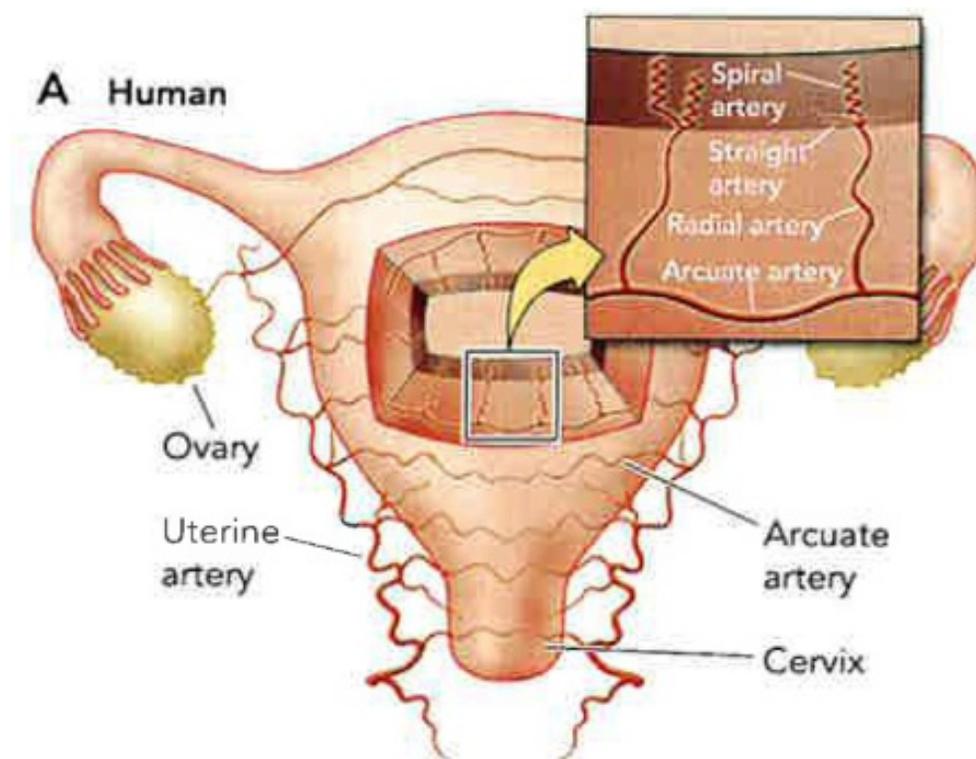
## **5. La circulation utérine**

L'utérus est un organe musculaire et extensible du système reproducteur; il est principalement constitué de tissu musculaire lisse (myomètre) et il est tapissé intérieurement par une muqueuse (endomètre). C'est un organe très vascularisé dont les vaisseaux se modifient au cours de la gestation, afin de s'adapter au besoin du fœtus en développement. Tel que cité ci-dessus, en fin de grossesse, le débit sanguin utérin peut être augmenté de plus de 10 fois.

### **5.1 La circulation utérine chez la femme**

Chez la femme, l'apport sanguin utérin est assuré par les artères utérines qui prennent leur origine au niveau antérieur de l'artère iliaque interne (20). Tel qu'illustré à la figure 3, le lit

vasculaire utérin chez la femme est presque complètement à l'intérieur du myomètre. En effet, les artères utérines se subdivisent en artères de plus faible calibre qui irriguent le muscle lisse, les artères arquées et les artères radiales. Finalement, les artères radiales se divisent au niveau de la muqueuse en artères spiralées qui se modifient tout au long du cycle endométrial (4, 62). La prolifération rapide de l'endomètre nécessite un remodelage des artères spiralées mais aussi la formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse). Les artères situées dans l'endomètre fonctionnel subissent un remodelage dépendant des hormones oestrogènes et progestérone qui sont sécrétées de façon cyclique (phase menstruelle, proliférative et sécrétoire) (94). C'est principalement durant la phase sécrétoire que le remodelage des artères se produit. Si une implantation embryonnaire a lieu, le processus continue, sous l'effet de la migration du trophoblaste, afin de former les artères utéro-placentaires (119).



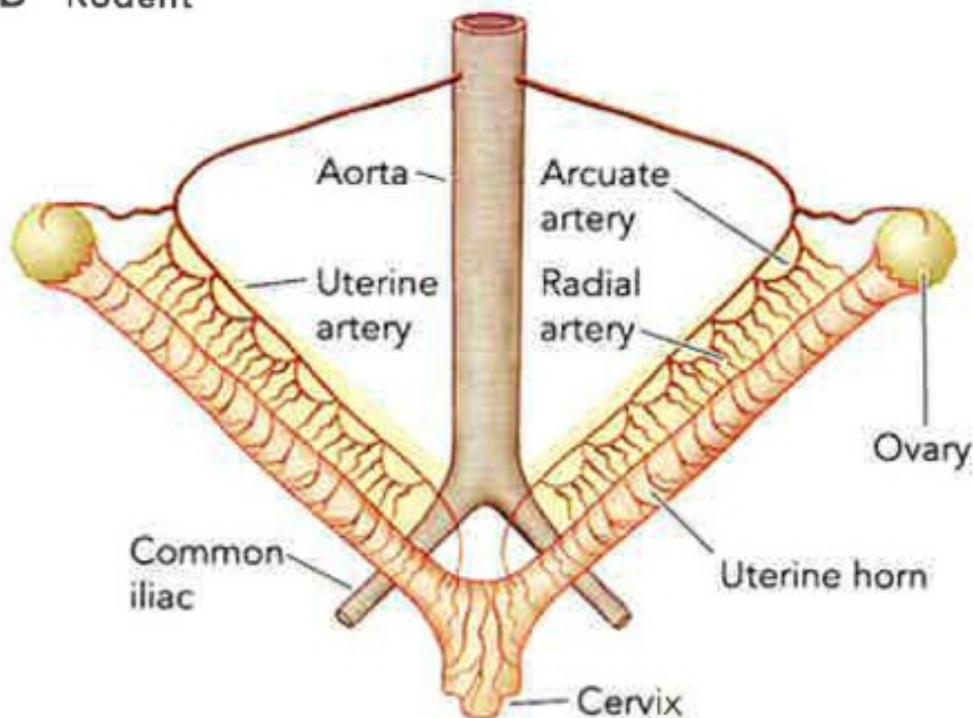
**Figure 3.1:** Circulation utérine chez la femme.

Osol, G. and M. Mandala (2009)

## 5.2 La circulation utérine chez la rate

L'utérus de la rate est structurellement différent de celui de la femme. Tel qu'illustré à la figure 3.1, l'utérus de la rate est divisée en deux cornes distinctes possédant chacune leur ovaire et leur vascularisation. Contrairement à l'utérus de la femme, les artères utérines de la rate prennent leur origine au niveau de l'aorte et le lit vasculaire utérin est presque complètement à l'extérieur du myomètre, ce qui facilite la dissection des artères arquées et radiales.

### B Rodent



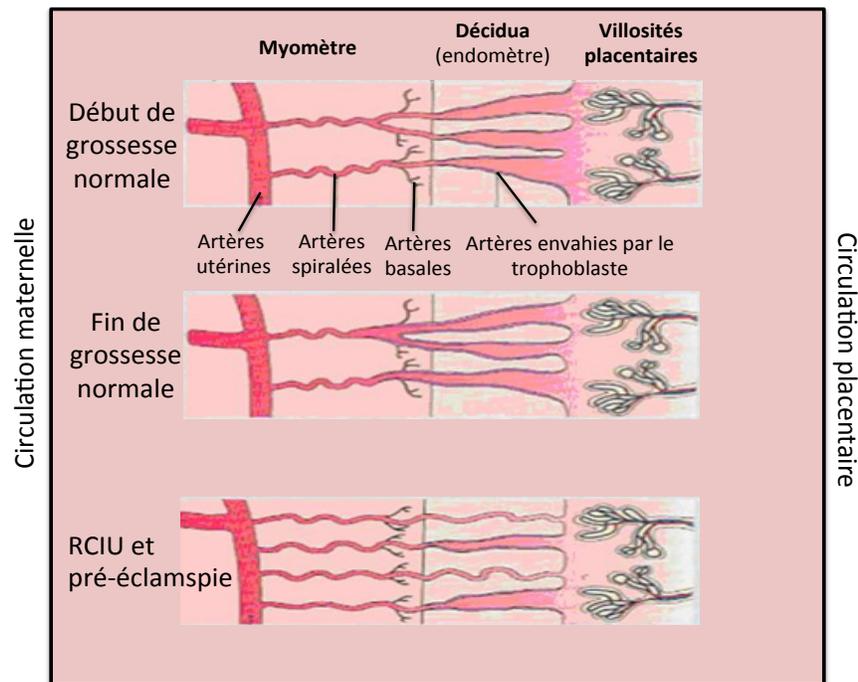
**Figure 3.2 :** Circulation utérine chez la rate.

Osol, G. and M. Mandala (2009)

### **5.3 Modifications vasculaires utérines au cours de la gestation**

Au cours de la gestation chez les mammifères, les vaisseaux sanguins utérins subissent un remodelage important permettant de maintenir un apport sanguin adéquat au bon développement du fœtus (pour revue (75)). On distingue deux principaux types de remodelage des vaisseaux utérins; le premier se déroule dans les artères spiralées qui sont en contact direct avec le placenta et le second se produit dans les artères de plus gros calibre.

Le remodelage des artères spiralées est associé à l'implantation embryonnaire. Chez l'humain, au cours de la deuxième semaine de gestation, la croissance rapide de l'embryon oblige la formation d'un réseau sanguin plus efficace aux échanges materno-fœtaux. C'est alors que le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste commencent à produire des excroissances (vilosités chorales) qui envahissent les sinusoides maternels et entraînent la désintégration de leur paroi; ceci permettra la création de lacunes trophoblastiques (62, 68). Suite à cette implantation, les cellules trophoblastiques de type endovasculaire migrent à l'intérieur des artères spiralées et prennent la place de l'endothélium et de la paroi musculo-élastique entraînant ainsi une diminution de leur forme spiralée et de leur résistance (28, 68).



**Figure 4:** Invasion de la circulation maternelle par le trophoblaste au cours de la gestation. (Adaptée de Rodie, V. A., et al. 2004).

Le remodelage des vaisseaux de plus gros calibre tels que les artères utérines, arquées et radiales, s'opère de façon différente que celui retrouvé dans les artères spiralées. En effet, les modifications principales sont l'augmentation du diamètre et de la longueur des vaisseaux. Chez la femme, au début de la gestation, le diamètre de l'artère utérine double et la vitesse du débit sanguin augmente considérablement (89). Ces changements se retrouvent aussi chez les rongeurs (34, 120) et les brebis (6, 97). Les vaisseaux subissent également une élongation qui normalement devrait entraîner une augmentation de la résistance, mais qui est contrecarrée par l'augmentation du diamètre.

Le remodelage des artères utérines est sous le contrôle de plusieurs mécanismes dont, entre autres, la faible concentration d'oxygène et la production de NO. En effet, en faible concentration d'oxygène, il y a stabilisation du facteur de transcription inductible par l'hypoxie (HIF) qui entraîne la transcription de plusieurs gènes dont ceux de la voie signalisation du monoxyde d'azote (NO) et du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (55, 92). Il a été observé que lors de la gestation, les souris dont le gène de la eNOS est supprimé présentent une diminution du débit sanguin et de l'élongation des artères spiralées utérines, provoquant ainsi une mauvaise oxygénation placentaire telle qu'observée lors de la pré-éclampsie (66). De plus, lorsque des rates sont traitées au L-NAME du 10<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour de gestation, on constate une diminution du diamètre de l'artère utérine principale (87). Les forces de cisaillement (71, 109) et les oestrogènes (59) sont également des stimulateurs de la production endothéliale de NO. En effet, au cours de la gestation, la combinaison des forces de cisaillement à l'augmentation des oestrogènes et des facteurs de croissance (PIGF et VEGF) favorise le remodelage des vaisseaux, entre autres, par la production de NO (pour revue (75)). De plus, les oestrogènes favorisent la vasodilatation utérine induite par le VEGF en stimulant la synthèse de NO (115). L'invasion trophoblastique des artères spiralée permet aussi une diminution de la résistance vasculaire. On observe, d'ailleurs, une déficience structurale ainsi qu'un dépôt de tissus fibreux dans ces artères lors d'une situation de RCIU ou de pré-éclampsie (16). De plus, la RCIU est souvent associée à une diminution de la perfusion utéro-placentaire. Cette réduction de perfusion peut être causée, entre autres, par une mauvaise placentation, un épaissement de la paroi vasculaire, la présence d'athérome et la dégénérescence des tissus fibreux au niveau des artères utérines spiralées (15, 30, 48). Lorsque ces mécanismes ne sont pas mis en place et qu'il y a un défaut d'implantation placentaire, une diminution de perfusion utéro-placentaire peut survenir affectant le développement et la croissance fœtale. Il semble que ce soit parmi les causes responsables de la pré-éclampsie et de la RCIU (20, 26, 42, 74).

## 6. Muscle lisse vasculaire

Le muscle lisse vasculaire (MLV) est composé de cellules fusiformes et allongées, elles ont un noyau central et sont composées en majeure partie de myofilaments. Leur cytoplasme renferme plusieurs types de protéines contractiles telles que l'actine et la myosine de type II ainsi que des filaments intermédiaires de desmine et de vimentine (2). On retrouve le muscle lisse dans les tuniques des organes creux tels que le tube digestif, les vaisseaux sanguins, les voies respiratoires et les voies urinaires. Celui-ci est contrôlé par le système nerveux autonome sous l'effet de l'acétylcholine et de la noradrénaline et il est responsable des contractions involontaires comme la vasomotricité et le péristaltisme.

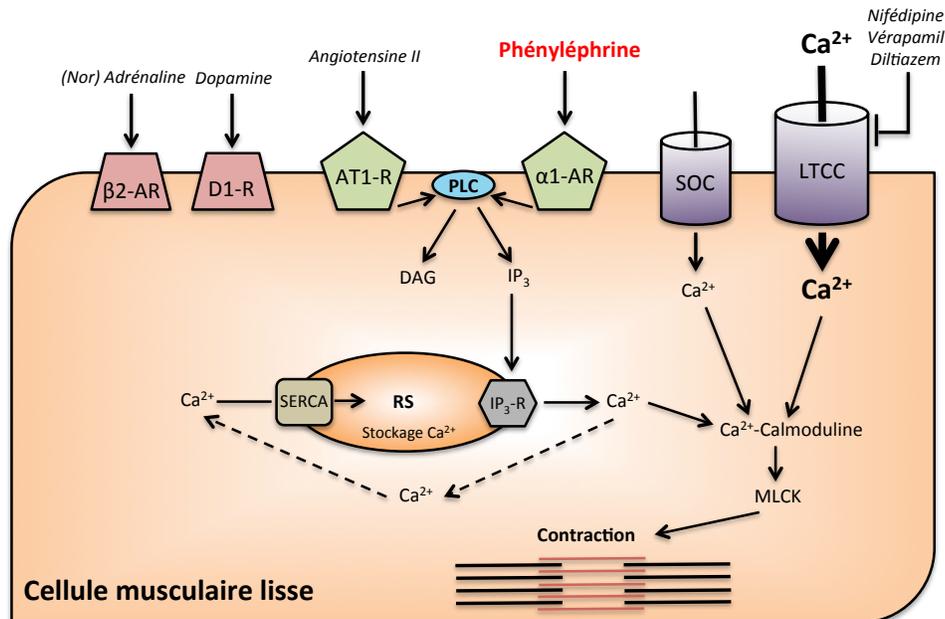
### 6.1 L'activité électrique du muscle lisse vasculaire

L'activité électrique joue un rôle important dans la réactivité vasculaire. La cellule musculaire lisse possède un potentiel de repos qui est établi à environ  $-50\text{mV}$  (43). Une contraction du MLV est entraînée par une augmentation du potentiel membranaire (dépolariation) et sa relaxation est entraînée par une baisse du potentiel membranaire (hyperpolarisation) (43). La dépolariation se caractérise par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire causée par l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire via les canaux calcique voltage-dépendants et par la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique (RS) (43). L'hyperpolarisation, quant à elle, se caractérise par la diminution de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, qui peut être emmagasiné de nouveau dans le RS par la pompe  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  du réticulum sarcoplasmique (SERCA) ou expulsé à l'extérieur de la cellule par les pompes à calcium ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) de la membrane plasmique (PMCA) (41).

Les cellules musculaires lisses sont reliées électriquement entre elles par des jonctions communicantes (*jonction gap*). Lorsqu'une modification du potentiel membranaire se produit dans une cellule, ces jonctions permettent de propager les variations de charge rapidement (dépolariation ou hyperpolarisation) vers les autres cellules entraînant ainsi une réponse contractile ou dilatatrice du muscle lisse (44, 62, 102).

## 6.2 La contraction du muscle lisse vasculaire

La contraction des cellules musculaires lisses est régulée par la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'activation des récepteurs membranaires tels que les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques et les récepteurs de l'angiotensine II activent une cascade de signalisation, à l'aide de seconds messagers, menant à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  emmagasiné dans le RS stimule l'ouverture des canaux calciques membranaires SOC et l'augmentation du voltage membranaire provoque l'ouverture des canaux LTCC permettant ainsi l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la cellule (Figure 5) (51, 65, 118). Plusieurs agents pharmacologiques, tel que la phényléphrine, (PE, un agoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques) induisent la contraction musculaire lisse. En effet, la liaison de la PE aux  $\alpha_1$ -adrénocepteurs active la phospholipase C (PLC) par une protéine Gq. La PLC hydrolyse ensuite le phosphoinositol diphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4, 5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Ce dernier se lie aux récepteurs de l' $\text{IP}_3$ , localisés sur le RS et favorise la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace intracellulaire conduisant à la vasoconstriction (51, 69, 118). En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la calmoduline ce qui entraîne la formation d'un complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline (Ca-M) qui active la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK), qui, à son tour, induit la phosphorylation des chaînes légères de myosine et permet le démasquage du site de fixation de l'actine (2). La fixation et le glissement du myofilament d'actine sur les têtes de myosine entraînent alors la contraction de la cellule musculaire.

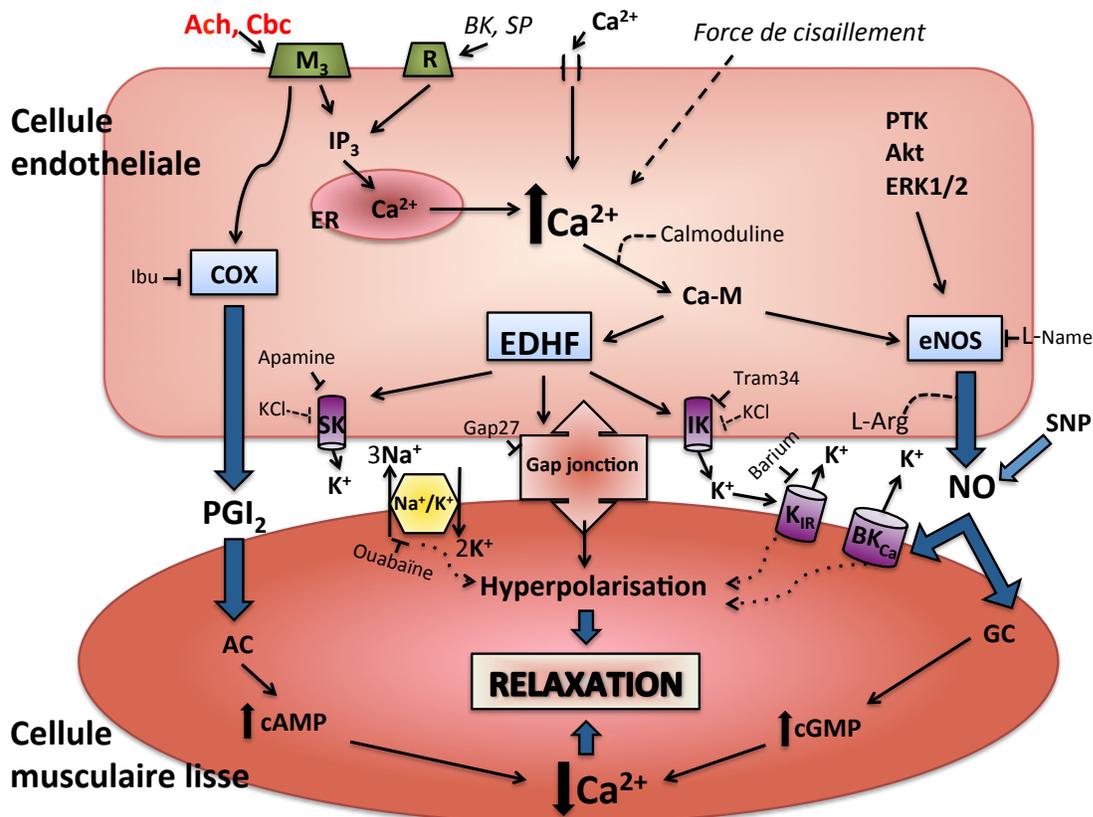


**Figure 5:** Mécanismes de contraction vasculaire.

$\beta_2$ -AR : récepteur  $\beta_2$ -adrénergique; D1-R: récepteur dopaminergique; AT1-R : récepteur de type 1 de l'angiotensine II;  $\alpha_1$ -AR : récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique; PLC: Phospholipase C; SOC : canal calcique de type SOC (Store Operated Channel); LTCC : canal calcique de type L; DAG: diacylglycérol; IP<sub>3</sub>: inositol 1,4, 5-trisphosphate; SR : Réticulum sarcoplasmique; SERCA : Pompe Ca<sup>2+</sup>/ATPase du réticulum sarcoplasmique; IP<sub>3</sub>-R : récepteur de l'IP<sub>3</sub> et MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine.

### **6.3 La relaxation du muscle lisse vasculaire**

L'endothélium des vaisseaux de résistance est confronté à différents stimuli: les forces de cisaillement, les hormones ainsi que d'autres molécules circulantes (neuropeptide, ions etc.). Lorsque stimulé, les cellules endothéliales sécrètent des produits vasoactifs dont les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF). Les trois principaux facteurs identifiés sont: le NO, la prostacycline et l'EDHF (facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium) (114) qui agissent sur le MLV (figure 6). Ces facteurs entraînent une diminution de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (114) ou une augmentation des ions  $K^+$  au niveau intercellulaire favorisant un phénomène d'hyperpolarisation de la membrane des cellules de muscle lisse ce qui entraîne la relaxation (pour revue (54)).



**Figure 6:** Mécanismes de dilatation du muscle lisse dépendante de l'endothélium.

Ach: acétylcholine; M<sub>3</sub>: récepteur muscarinique; R: récepteur membranaire; BK: bradykinine; SP: substance P; IP<sub>3</sub>: inositol triphosphaste; ER: réticulum endoplasmique; PTK: protéine tyrosine kinase; Akt: ; ERK: «extracellular regulated kinase»; COX: cyclooxygénase; Ibu: ibuprofène; EDHF: facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium; CA-M: complexe calcium-calmoduline; eNOS: NO synthase endothéliale; L-NAME: NG- Nitro-L-arginine Methyl Ester inhibiteur de la eNOS; SK (K<sub>Ca</sub>2.3): canal potassique activé par le calcium de faible conductance; Apamine: toxine neurotoxique du venin d'abeille qui bloque les canaux K<sub>Ca</sub>2.3; IK (K<sub>Ca</sub>3.1): canal potassique activé par le calcium de conductance intermédiaire; Tram-34: 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole inhibiteur sélectif du canal K<sub>Ca</sub>3.1; Gap-27: peptide derivé de la connexine 43 qui bloque sélectivement la jonction gap; PGI<sub>2</sub>: prostacycline; NO: monoxyde d'azote; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>: pompe à sodium; K<sub>IR</sub>: canal potassique rectifiant entrant; BK<sub>Ca</sub><sup>2+</sup>: canal potassique à large conductance activé par le calcium; AC:

adénylate cyclase; cAMP: adénosine monophosphate cyclique; GC: guanylate cyclase; cGMP: guanosine monophosphate cyclique; Ouabaïne: 3-[(6-Deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)oxy]--1,5,11 $\alpha$ ,14,19-pentahydroxycard-20(22)-enolide inhibiteur de la pompe à sodium; Barium: inhibiteur des canaux  $K_{IR}$ .

L'EDHF est considéré comme un ensemble de facteurs (conductance électrique,  $H_2S$ ,  $H_2O_2$ , endocannabinoïdes, etc.) dont certains sont responsables, entre autres, de l'hyperpolarisation de la cellule endothéliale et de la cellule musculaire lisse. Deux principaux canaux potassiques endothéliaux sont impliqués dans ce processus. En effet, les canaux potassiques activés par le calcium à faible conductance ( $K_{Ca2.3}$ ) et à conductance intermédiaire ( $K_{Ca3.1}$ ) (45), permettent l'expulsion des ions  $K^+$  de la cellule endothéliale vers l'espace intercellulaire créant ainsi une accumulation localisée d'ions  $K^+$  qu'on nomme nuage potassique. Ce processus provoque une diminution de charges positives dans la cellule ce qui entraîne l'hyperpolarisation de la cellule endothéliale (19, 54). L'accumulation localisée d'ions  $K^+$  stimule l'activité, entre autres, de la pompe à sodium  $Na^+/K^+$ , et des canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{IR}$ ) des cellules musculaires lisses, entraînant également l'hyperpolarisation de celles-ci et menant à leur relaxation (54). De plus, les cellules endothéliales forment à plusieurs endroits des invaginations dans les cellules musculaires lisses sous-jacentes. Au bout de ces invaginations, on retrouve les jonctions étanches, celles-ci forment une ouverture permettant la liaison directe entre le cytosol des deux cellules. L'hyperpolarisation des cellules endothéliales peut donc être propagée rapidement aux cellules musculaires lisses avoisinantes en utilisant ces jonctions étanches comme passage direct (pour revue (29, 44, 54)).

La relaxation causée par la diminution du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans le MLV peut-être induite par la synthèse de  $PGI_2$  (80) et de NO dans la cellule endothéliale. En effet, l'activation des récepteurs  $M_3$  par l'Ach ou d'autres cholinomimétiques, tels que le carbachol (Cbc), stimule, entre autres, la production de  $PGI_2$  par la COX. La  $PGI_2$  active ensuite l'AC de la cellule musculaire lisse qui produit l'AMPc, entraînant une diminution du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (114). De son côté, la synthèse de NO par la eNOS est induite par des kinases telles que PTK, Akt et

ERK1/2, les forces de cisaillements et l'activation d'une protéine Gq par la liaison d'agonistes (Ach, Cbc, BK, SP) à leur récepteur spécifique (9, 109, 114). L'activation d'une protéine Gq induit un relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le ER ce qui augmente la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Les forces de cisaillement régulent également le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule endothéliale par, entre autres, les canaux TRPV4 dont l'activation permet l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol (77). Par ailleurs, chez la rate, l'expression et l'activité de ces canaux sont augmentées au cours de la gestation dans les artères utérines radiales (103). L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire entraîne la formation d'un complexe Ca-M qui stimule la eNOS à produire du NO à partir de la L-arginine. Quant aux kinases, elles stimulent directement la production de NO par la eNOS. Le NO diffuse jusqu'aux cellules musculaires lisses sous-jacentes et stimule la GC soluble à produire la GMPc, qui entraîne lui aussi la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les cellules musculaires lisses menant à la relaxation du MLV (pour revue (79, 114)). Malgré que la voie du NO ait une grande influence sur la dilatation dépendante de l'endothélium dans les artères de gros calibre, la voie de l'EDHF joue un rôle plus important dans les vaisseaux de plus petits calibres (12, 105).

#### **6.4 Le tonus myogène**

Le tonus myogène est la capacité d'un vaisseau de pouvoir diminuer son diamètre, grâce à une contraction musculaire lisse, en réponse à une augmentation de la pression intraluminale. C'est un phénomène indépendant de la régulation hormonale et dont l'importance augmente avec la diminution du diamètre des vaisseaux. Dans les artères de faible calibre et les artérioles, il peut même provoquer une fermeture complète du vaisseau. Il permet, entre autres, de réguler le débit sanguin dans des zones localisées et il apporte une protection aux capillaires contre une pression intraluminale trop élevée. Ce processus implique une variation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique engendrée par une entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule via les canaux TRPs (*transient receptor potential*) et les canaux calciques dépendants du voltage et par la libération des réserves intracellulaires. Cette augmentation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  va permettre une dépolarisation de la CML entraînant une contraction vasculaire (50).

Le tonus myogène est régulé, entre autres, par des mécanismes endothéliaux tels que l'activité de la eNOS et de COX; une diminution de leur expression ou de leur activité permet de favoriser la contraction vasculaire. En effet, chez la femme enceinte, une inhibition de la synthèse du NO par le L-NAME augmente la contraction dépendante de la pression intraluminale dans les artères myométriales (37). Certains canaux potassiques, tels que le canal BK<sub>ca</sub>, jouent un rôle important dans la rétroinhibition du tonus myogène, ceux-ci sont activés par une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et favorisent la sortie d'ions K<sup>+</sup> entraînant ainsi une hyperpolarisation qui vient inhiber la contraction (83). D'ailleurs, chez la brebis gestante, on observe une augmentation de l'activité des canaux BK<sub>ca</sub> médiée par la sécrétion des hormones sexuelles (17β-estradiol et progestérone) dans les artères utérines de résistance (58).

## 7. Hypothèse et objectifs

Un défaut d'invasion trophoblastique des artères spiralées (16) ou encore un remodelage vasculaire inadéquat engendré par une baisse de production de NO relié à une diminution des forces de cisaillement (109) sont associés à une diminution de perfusion placentaire. Il est connu qu'une diminution de l'expansion volumique au cours de la grossesse conduit à une RCIU probablement par diminution de perfusion utéro-placentaire (66, 88). Notre modèle de RCIU présente une diminution de l'expansion volumique maternelle. Nos travaux précédents démontrent une diminution du diamètre et une augmentation du tonus myogène des artères utérines arquées (112). Ce modèle est donc un outil qui nous permet de déterminer les impacts du volume sanguin maternel diminué sur les fonctions vasculaires utérines.

Nous émettons l'hypothèse que comparativement aux vaisseaux des rates normales, les vaisseaux utérins de rates RCIU présentent une dysfonction des mécanismes de relaxation dépendant de l'endothélium lors de la réponse à des agents vasoactifs.

L'objectif de notre étude est de caractériser l'influence de l'endothélium sur la régulation de la réactivité des artères utérines radiales dans un modèle de réduction d'expansion volumique maternelle. Pour ce faire, nous allons étudier *in vitro* la réactivité des artères utérines radiales en présence d'inhibiteurs des voies de relaxation.

## **Manuscrit**

J'ai fait toutes les expériences qui ont conduit à cet article. J'ai contribué de façon significative sa rédaction, j'ai fait la première version et les corrections suite aux commentaires et discussions avec les co-auteurs.

Reduction of volume expansion during rat pregnancy: effect on vascular reactivity of uterine radial arteries.

Emilie Bigonnesse, Benoit Sicotte and Michèle Brochu

Department of Molecular and Integrative Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Radial uterine vascular reactivity in IUGR pregnant rat model.

Corresponding author:

Dr. Michèle Brochu

Département de physiologie moléculaire et intégrative

Université de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Telephone: 514-343-6111, Extension 38523

Fax: 514-343-2111

## **ABSTRACT**

During pregnancy, increased maternal plasma volume and remodeling of uterine arteries occur to allow sufficient blood flow to the growing fetus. Insufficient development of the utero-placental circulation may contribute to the development of gestational problems, such as intrauterine growth restriction (IUGR). We developed a rat model of IUGR by administering a low-sodium diet during the last week of gestation. This diet induces a reduction of maternal blood volume expansion leading to decreased uteroplacental perfusion. The objective of this study is to characterize the influence of the endothelium on the regulation of uterine radial artery reactivity in this model. We hypothesize that there is a dysfunction of endothelial dependant relaxation mechanisms in response to vasoactives agents in radial uterine arteries from IUGR rats compared to those from normal pregnant rats. Concentration-response curve to phenylephrine (PE), carbachol (Cbc) and sodium nitroprussiate (SNP) were done on radial uterine arteries cannulated in vessels chamber in presence of inhibitors of eNOS (L-NAME), COX (Ibuprofene, Ibu), EDHF (KCl) and  $K_{ca2.3}$  and  $K_{ca3.1}$  channels (Apamine, Apa / TRAM-34). Our results show that 1) the diameter of uterine radial arteries was significantly decreased in the IUGR group 2) sensitivity and contractile response to low concentrations of PE was increased in presence of all relaxation inhibitors only in IUGR group. 3) relaxation response to Cbc was increased in IUGR rats compared to the controls 4) inhibition of eNOS decreased the maximum relaxation to Cbc in the IUGR group only 5) inhibition of EDHF by KCl or by  $K_{ca2.3}$  and  $K_{ca3.1}$  inhibitors completely blocked the relaxation to Cbc in both groups. In conclusion, these results suggest that in this model of IUGR, NO pathway (production by the endothelium and / or the sensitivity of vascular smooth muscle) is activated in radial uterine arteries, probably to compensate for the reduction in blood uteroplacental perfusion.

## **KEYWORDS**

Utero-placental circulation, intrauterine growth restriction, low-sodium diet, Nitric oxide, Endothelial Derived Hyperpolarizing Factors.

## INTRODUCTION

During pregnancy, increased maternal plasma volume and remodeling of uterine arteries occur to allow sufficient blood flow to the fetus. In human, 3.5% of the cardiac output is distributed to the uterine vascular bed in early pregnancy and increases to 12% to near term (38). During early pregnancy, the human uterine artery diameter doubled and flow velocity, measured by Doppler, increases (7). This has also been observed in rodents (8, 39) and sheep (22, 29). In gravid rats, the plasma volume increases by approximately 50 % (3). At the opposite of systemic arteries that are resistant to vasoactive agents in normotensive and hypertensive pregnant rat (21), uterine arcuate arteries of near term pregnant rats have an increased maximal response to angiotensin II (ANG II) and Phenylephrine (PE) compared to non-pregnant (20, 33). We have also demonstrated an increase in the diameter of these arteries during pregnancy (20, 33). Rat uterine radial arteries are also larger and longer during pregnancy (12). Insufficient development of the utero-placental circulation (10) or inhibition of maternal plasmatic volume expansion may contribute to the development of gestational problems, such as an intrauterine growth restriction (IUGR) (27, 30). In the laboratory, we developed a rat model of IUGR; a low-sodium diet given during the last week of gestation (15<sup>th</sup> day to term) induced a reduction of maternal blood volume expansion leading to decreased arcuate arteries remodeling and birth of IUGR rats (5, 30). Furthermore, decreased response to angiotensin II was observed in these arteries (34).

Arcuate and radial arteries are uterine resistance arteries that are less than 400 $\mu$ m of diameter and control flow and pressure. The endothelium of these vessels is mainly subjected to shear stress, which is physiological upregulator of nitric oxide synthase (eNOS) that produces nitric oxide (NO) (28) who play the major part of endothelium-dependent relaxation. Increased intracellular  $Ca^{2+}$  and activation of kinases, such as ERK1/2, Akt and PKT by shear stress (17, 36) induces production of NO by the endothelium that stimulates production of cGMP by the vascular smooth muscle and lead to vasodilatation (13). A second mechanism of vascular relaxation is the synthesis of prostacyclin ( $PGI_2$ ) by cyclooxygenase (COX) in the endothelial cells that stimulates cAMP production and induces smooth muscle vasodilatation (36). Finally, a third pathway is the endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) which is

responsible, among others, the hyperpolarization of endothelial and smooth muscle cells by  $K^+$  release into the intercellular space through endothelial calcium-activated potassium channels of small ( $K_{Ca2.3}$ ) and intermediate ( $K_{Ca3.1}$ ) conductance and / or directly by gap junctions. (1, 14, 19). Although NO is predominant in arteries of large caliber, its influence decreases at the expense of EDHF in vessels of smaller diameters (31).

The aim of this study is to better characterize the mechanisms involved in uterine arteries vasoaction during decreased uteroplacental perfusion in the IUGR model. We hypothesize that endothelial dysfunction in response to vasoactives agents is present in radial uterine arteries from IUGR rats compared to those from normal pregnant rats. The first objective is to compare the response to vasoactive agents of the uterine radial arteries from IUGR and control pregnant rats in a pressurized artery myograph. The second objective is to characterize the mechanism implicated in the endothelium dependent relaxation by adding inhibitors of eNOS, COX and EDHF in the vascular bath.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Animals.* The experimental procedures were reviewed and approved by the local Animal Care Committee accredited by the Canadian Council on Animal Care. A total of 110 virgin female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant) weighing 225-250g were used. Female rats were mated with fertile males overnight. The presence of spermatozoa found in morning vaginal smears was considered to be day 1 of pregnancy. Every animal was fed and watered *ad libitum*, and housed under controlled light (12h light-dark cycle; 6AM to 6PM) and temperature (22 °C). Dams were randomly assigned one of the two diets for the last week (7 days) of pregnancy. The control group was fed a normal diet containing 0.20% sodium and 0.40% potassium (basal diet 5755; PMI Feed, Ren's Feed and Supplies, Oakville, ON, Canada) and tap water. The experimental group received a diet containing 0.03% sodium and 0.85% potassium (low-sodium diet 5881; PMI Feed) and demineralized water. As previously shown (4, 30), mothers on low-sodium diet give birth to smaller pups ( $5.7 \pm 0.1g$  for controls vs.  $4.7 \pm 0.2g$  for IUGR). On day 22 (term: 23 days) of pregnancy, rats were anesthetized with

isoflurane (4%) and decapitated. The uterine horns with attached vasculature were withdrawn and placed in cold HEPES-bicarbonate solution (concentration in mmol/L: NaCl 130, KCl 3.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, Glucose 6 and EDTA 0.03). Arteries of both horns were isolated from connective tissues and fat. The radial arteries that supply a placenta were collected for the reactivity experiment.

*Reactivity of uterine arteries.* Radial uterine arteries (150 - 250 µm) perfusing a placenta were cleaned of connective tissues and cannulated in a vessels chamber (Living System Instrumentation, Burlington, USA) containing HEPES-bicarbonate solution. Pressure servo control unit connected to an extremity of the chamber was used to maintain transmural pressure at 50 mmHg, (11, 33) in cannulated vessels. Vascular diameter was observed by a video system and recorded on a paper chart recorder. The vessels were equilibrated for 30 minutes in HEPES-bicarbonate solution and the reactivity was measured following the addition of KCl (60 mM) to observe the responsiveness of endothelium. Arteries that contract at least 10% of the basal diameter were kept for experiment, while others were discarded. After returning to baseline and 30 min of equilibration, concentration-response curve to phenylephrine (30 nM - 3 µM, PE) was obtained. The contraction was calculated in percentage: % of contraction =  $(d_{\text{basal}} - d_{[\text{PE}]}) / d_{\text{basal}}$  where  $d_{\text{basal}}$  correspond to the diameter at the baseline and  $d_{[\text{PE}]}$  to the one after each dose of PE. Immediately after the last dose of PE (3 µM), relaxation curve in response to carbachol (10 nM - 100 µM, Cbc) was done and diameter measured at each dose ( $d_{[\text{Cbc}]}$ ). At the end of experiment, HEPES-bicarbonate solution was replaced by one without calcium containing ethylene glycol tetraacetic acid (2 mM, EGTA), to obtain the maximum arterial diameter  $d_{\text{max}}$ . The relaxation was calculated in percentage: % of relaxation =  $(d_{[\text{Cbc}]} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]} / [d_{\text{max}} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}}]])$ .

To determine the role of NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF in the endothelium-dependent relaxation pathways, concentration-response curves in response to PE and Cbc were done in presence of Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 100 µM), Ibuprofen (Ibu 10 µM) and KCl (25 mM). Endothelium-independent relaxation was evaluated by using sodium nitroprusside (NO donor and direct opener of calcium-activated potassium [ $K_{\text{Ca}}$ ] channels 100 pM - 100 µM, SNP),

which allows the direct action of NO on smooth muscle bypassing activity of eNOS (24, 40). The role of small and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels in endothelium-dependant relaxation was tested with Apamin (specific SK [K<sub>Ca</sub> 2.1-2.3] channels inhibitor, 100nM, APA,) and Tram-34 (selective IK [K<sub>Ca</sub> 3.1] channel blocker, 10μM). Doses have been established according to literature (9, 19) and validated in our hands.

*Drugs and chemicals.* PE, Cbc and L-NAME were purchased from Sigma (St. Louis, MO). SNP was obtained from Fisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ). Apamine and Tram 34 were purchased from Tocris (Bristol, UK). Components of the Hepes-bicarbonate solution were obtained from Tyco (Phillipsburg, NJ), EM science (Gibbstown, NJ), Fisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ) and Sigma (St-Louis, MO).

*Statistical analysis.* Each dose-response curve was analysed by GraphPad Prism software version 4.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Maximal diameter of both groups was compared by Student's T-test. Different dose-response curves of the same protocol were compared by two-way ANOVA and Bonferroni post test. Statistical significance was assumed with a value of  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

*Effects of decreased volume expansion on uterine radial arteries diameter.*

To determine the effect of decreased volume expansion on uterine arteries remodeling, we compared the radial artery diameter of both groups following the addition of EGTA, a calcium chelating agent, that induces a maximal vasodilatation. Compared to control group, the IUGR group presented a decreased diameter ( $222 \pm 5\mu\text{m}$  vs.  $195 \pm 6\mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ ).

*Effects of decreased volume expansion on contractile response in uterine radial arteries.*

To compare contractile response of radial arteries, concentration-response curves to PE (30 nM - 3  $\mu$ M) were done in presence or absence of endothelial-dependent relaxation inhibitors. There was no significant difference in contraction between each concentration-response curve in control group (Fig.1A). In IUGR group (figure 1B), low concentration (0,1 $\mu$ M) of PE did not induce contractile response as in control one. This was reversed by addition of KCl in the presence of other inhibitors. Indeed, contractile responses to 0,1 $\mu$ M PE were similar between the two groups ( $36.5 \pm 8.0\%$  vs.  $38.7 \pm 4.7\%$ , control vs. IUGR group). These results show that the uterine radial arteries of IUGR pregnant rats are more sensitive to low dose of contractile agent such PE in presence of endothelium relaxation inhibitors. This suggests that endothelial relaxation pathways activity have an inhibitory effect on the contractile response to vasoactive agents, which could help offset the reduced diameter of IUGR uterine radial arteries.

*Effects of decreased volume expansion on dilator response in uterine radial arteries.*

In view of the previous results, the effects of decreased volume expansion on endothelial-dependent dilation in response to Cbc were studied in the presence or absence of endothelial dependent dilation inhibitors. As shown in figure 2A, inhibition of eNOS by L-NAME and COX by Ibu had no effect on the relaxation response in control group. However, inhibition of EDHF by KCl almost completely inhibited relaxation. Compared to controls, maximum relaxation to Cbc of radial uterine arteries was higher in IUGR rats ( $61.2 \pm 5.0\%$  vs.  $81.0 \pm 3.9\%$ ,  $P < 0.05$ , control vs. IUGR group) (Fig. 2B). Furthermore, in IUGR group, the addition of L-NAME or / and Ibu decreased maximum dilation. As in control group, dilation was completely inhibited by the addition of KCl to the other inhibitors. To specify the role of smooth muscle in the relaxation response, concentration-response curves to SNP were performed. As shown in figure 3, relaxation to SNP was higher in radial uterine arteries of IUGR rats than control ones. Taken together, these results suggest that NO could play a role in vascular reactivity of uterine arteries of IUGR rats but not of control ones.

### *Role of $K_{Ca2.3}$ and $K_{Ca3.1}$ channels in the endothelial-dependent hyperpolarization*

The inhibition of relaxation in presence of KCl suggests a role of calcium-activated potassium channels in endothelial hyperpolarization. To determine the role of  $K_{Ca2.3}$  and  $K_{Ca3.1}$  channels, contractile response to PE and relaxation response to Cbc were tested in presence of  $K_{Ca2.3}$  and  $K_{Ca3.1}$  specific inhibitors; Apamin 100nM and Tram-34 10 $\mu$ M, respectively, along with L-NAME and Ibu. The contractile response to PE (Fig. 4A) was not different between the two groups in the presence of inhibitors. Addition of all inhibitors completely inhibited the relaxation by Cbc (Fig. 4B) in both groups as observed with KCl in figure 2.

## **DISCUSSION**

The objective of this study was to determine the effects of decreased plasma volume observed in a rat IUGR model on the diameter and the vascular reactivity of uterine radial arteries. Our results show that 1) the diameter of uterine radial arteries was significantly decreased in the IUGR group 2) sensitivity and contractile response to low concentrations of PE was increased in presence of all relaxation inhibitors only in IUGR group. 3) Relaxation response to Cbc was increased in IUGR rats compared to the controls 4) inhibition of eNOS decreased the maximum relaxation to Cbc in the IUGR group only 5) inhibition of EDHF by KCl or by  $K_{Ca2.3}$  and  $K_{Ca3.1}$  inhibitors completely blocked the relaxation to Cbc in both groups.

The decreased diameter of radial arteries in this model of IUGR animals is consistent with the results previously obtained using arcuate arteries (5, 34). This suggests that vascular remodeling is inhibited in the IUGR model. During pregnancy, maternal blood volume expansion is associated with vascular remodeling (12, 39). This phenomenon allows extension and elongation of uterine arteries (12) which leads to increased uteroplacental perfusion. In our model, this volume expansion is decreased which could explain the smaller diameter of the uterine arteries. Moreover, mechanisms of adaptation in vascular reactivity should compensate this decreased diameter.

Inhibition of the three main pathways of endothelium-dependent relaxation does not increase the maximum contraction to PE in either group. However, the response to low concentrations of PE is reduced in IUGR animals vessels and restored in presence of inhibitors of NO, COX and EDHF. This result suggests that endothelium-dependent relaxation has an effect on contractile response to physiological dose of PE in uterine radial arteries in this IUGR model but not in control pregnant group. In contrast, one study suggests that contraction is increased when endothelium-dependent relaxation is inhibited in late-pregnant rat uterine arcuate arteries. Indeed, this study demonstrate that use of nitroarginine (L-NNA) shifts the PE concentration-response curve to the left, which means that the treatment to L-NNA increases sensitivity to PE (23). The difference between these results and ours could be due to the types of vessels used, as in this study we used the radial uterine arteries that are third order arteries in the uterine vascular bed. They are smaller and closer to placenta.

On the other hand, maximal relaxation to Cbc is greater in radial uterine arteries of IUGR rats compared to the controls. Inhibition of the NO pathway by L-NAME induced significant decrease in maximum relaxation only in the IUGR group, suggesting that this pathway plays a role in endothelium-dependent relaxation specifically in this group. We previously demonstrated that hematocrit was greater in pregnant IUGR rats (5) suggesting increased blood viscosity as compared to controls. It has been shown that blood viscosity and higher hematocrit can promote wall shear stress, particularly in larger arteries (6). Furthermore, shear stress is an important stimulator of the expression of eNOS and NO production (15, 28). NO has an important role in vascular changes during pregnancy, it contributes to uterine arteries remodeling and allows increasing uterine blood perfusion (18, 26). It plays, also, a major role in endothelial control of uterine and placental vascular tone (23). However, It has been shown that the nitric oxide synthase activity decreases during the last week of pregnancy (days 15 to 21) (32), which could explain that L-NAME did not affect the relaxation response to Cbc in control group. An overactivity of nitric oxide synthase in IUGR group, in late gestation, could compensate the decreased diameter of uterine radial arteries.

To analyze the endothelium-independent activity of NO and its activity on smooth muscle cells without the influence of eNOS, we used SNP (16, 25, 37). Relaxation in response to SNP

is higher in vessels from IUGR animals than from controls, confirming the increased NO sensitivity in the uterine radial arteries smooth muscle cells of IUGR pregnant rats.

In both groups, the addition of Ibu to L-NAME to inhibit COX pathway did not affect the relaxation response to Cbc observed when L-NAME is used alone. However, addition of 25 mM KCl to L-NAME and Ibu almost completely inhibits maximum relaxation to Cbc in both groups. Thus, EDHF appears to be the most important mechanism of relaxation in uterine radial arteries in pregnant rats. Indeed, it was shown that there is an inverse relation between the implication of eNOS and EDHF in the endothelium-dependent relaxation in the rat mesenteric circulation, importance of EDHF increases while that of eNOS decreases as the size of the vessels decreases (31). In mice, eNOS activity is decreased in the endothelium mesenteric artery compared to the aorta (24). In rat, endothelium-dependent relaxation is mainly mediated by NO in large mesenteric arteries and by EDHF in small mesenteric arteries (35).

To confirm the role of EDHF-mediated relaxation, Apa and Tram-34 were used to inhibit the activity of  $K_{ca2.3}$  and  $K_{ca3.1}$  channels, respectively. When both channels are blocked, the endothelium-dependent relaxation was completely inhibited. These results are consistent with other study in which inhibition of  $K_{ca2.3}$  channel by apamine and  $K_{ca3.1}$  channel by several inhibitors (TRAM-34/39, chTX and CLT) significantly reduces endothelial hyperpolarization mediated by EDHF leading to decreased vasorelaxation, in rat carotid artery (9). This suggests that the majority of the endothelial activity produced by hyperpolarization ( $K^+$  ion) comes from the small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels; therefore  $K_{ca2.3}$  and  $K_{ca3.1}$  channels have an important role to play in the endothelium-dependent dilatation (1, 2).

In conclusion, all these results suggest that in a model of IUGR where the reduced volume expansion during pregnancy lead to decrease uteroplacental perfusion, NO pathway (production by the endothelium and / or the sensitivity of vascular smooth muscle) is activated in radial uterine arteries, probably to compensate for the reduction in blood perfusion in the placenta.

## REFERENCES

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 183: S1-S22, 2000.
2. **Andersson DA, Zygmunt PM, Movahed P, Andersson TL, and Hogestatt ED.** Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/K(+) ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 129: 1490-1496, 2000.
3. **Barron WM.** Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 9: 296-302, 1987.
4. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 283: E124-131, 2002.
5. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, and Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *The Journal of physiology* 562: 937-950, 2005.
6. **Bird IM, Zhang L, and Magness RR.** Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 284: R245-258, 2003.
7. **Clark SL, Cotton DB, Lee W, Bishop C, Hill T, Southwick J, Pivarnik J, Spillman T, DeVore GR, Phelan J, and et al.** Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 161: 1439-1442, 1989.

8. **Dowell RT and Kauer CD.** Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 19: 613-625, 1997.
9. **Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, and Kohler R.** Selective blockade of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated small- and intermediate-conductance K<sup>+</sup>-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 138: 594-601, 2003.
10. **Gagnon R.** Placental insufficiency and its consequences. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 110 Suppl 1: S99-107, 2003.
11. **Ganapathy V.** Drugs of abuse and human placenta. *Life sciences* 88: 926-930, 2011.
12. **Griendling KK, Fuller EO, and Cox RH.** Pregnancy-induced changes in sheep uterine and carotid arteries. *The American journal of physiology* 248: H658-665, 1985.
13. **Guenther AE, Conley AJ, Van Orden DE, Farley DB, and Ford SP.** Structural and mechanical changes of uterine arteries during pregnancy in the pig. *Journal of animal science* 66: 3144-3152, 1988.
14. **Harris D, Martin PE, Evans WH, Kendall DA, Griffith TM, and Randall MD.** Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K<sup>(+)</sup>-relaxation. *European journal of pharmacology* 402: 119-128, 2000.
15. **Jobe SO, Ramadoss J, Koch JM, Jiang Y, Zheng J, and Magness RR.** Estradiol-17beta and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. *Hypertension* 55: 1005-1011, 2010.

16. **Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, and Granger JP.** Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 31: 1065-1069, 1998.
17. **Krause BJ, Hanson MA, and Casanello P.** Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 32: 797-805, 2011.
18. **Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Mu J, Bainbridge SA, and Adamson SL.** Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension* 60: 231-238, 2012.
19. **Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, and Clark KE.** Uterine blood flow--a determinant of fetal growth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 110 Suppl 1: S55-61, 2003.
20. **Longo S, Borghesi A, Tziella C, and Stronati M.** IUGR and infections. *Early human development* 90 Suppl 1: S42-44, 2014.
21. **Massicotte G, St-Louis J, Parent A, and Schiffrin EL.** Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65: 2466-2471, 1987.
22. **Monk D and Moore GE.** Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 9: 371-378, 2004.
23. **Ni Y, Meyer M, and Osol G.** Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *American journal of obstetrics and gynecology* 176: 856-864, 1997.
24. **Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, and Shimokawa H.** Mechanisms for Enhanced Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Microvessels in Mice. *Circulation Journal* 76: 1768-1779, 2012.

25. **Okawa T, Syal AS, Vedernikov YP, Saade GR, Chwalisz K, and Garfield RE.** The effects of nitric oxide on the contractility of isolated uterine and aortic rings from pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 179: 721-726, 1998.
26. **Osol G, Barron C, Gokina N, and Mandala M.** Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling. *Journal of vascular research* 46: 478-486, 2009.
27. **Osol G and Moore LG.** Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Microcirculation*, 2013.
28. **Poston L, McCarthy AL, and Ritter JM.** Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacology & therapeutics* 65: 215-239, 1995.
29. **Rosso P, Donoso E, Braun S, Espinoza R, Fernandez C, and Salas SP.** Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecologic and obstetric investigation* 35: 162-165, 1993.
30. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 180: 608-613, 1999.
31. **Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, and Takeshita A.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 28: 703-711, 1996.
32. **Sladek SM and Roberts JM.** Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreases a day before the onset of parturition. *American journal of obstetrics and gynecology* 175: 1661-1667, 1996.

33. **St-Louis J, Pare H, Sicotte B, and Brochu M.** Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *The American journal of physiology* 273: H1148-1153, 1997.
34. **St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A, and Brochu M.** Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 131: 331-339, 2006.
35. **Stankevicius E, Dalsgaard T, Kroigaard C, Beck L, Boedtkjer E, Misfeldt MW, Nielsen G, Schjorring O, Hughes A, and Simonsen U.** Opening of small and intermediate calcium-activated potassium channels induces relaxation mainly mediated by nitric-oxide release in large arteries and endothelium-derived hyperpolarizing factor in small arteries from rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339: 842-850, 2011.
36. **Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, and Simonsen U.** [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina* 39: 333-341, 2003.
37. **Storment JM, Meyer M, and Osol G.** Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. *American journal of obstetrics and gynecology* 183: 449-453, 2000.
38. **Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, and Brandes JM.** Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 162: 121-125, 1990.
39. **van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, De Mey JG, and van Eys GJ.** Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biology of reproduction* 72: 1161-1168, 2005.

40. **Yamakage M, Hirshman CA, and Croxton TL.** Sodium nitroprusside stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  -activated  $\text{K}^{+}$  channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 270: L338-345, 1996.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1:** Contractile response curves to PE in uterine radial arteries of control (A) and IUGR (B) pregnant rats and the effects of preincubation with L-NAME 100 $\mu$ M, Ibu 10  $\mu$ M and KCl 25 mM. Relative contraction (%) is defined by  $(d_{\text{basal}} - d_{[\text{PE}]}) / d_{\text{basal}}$  where  $d_{\text{basal}}$  corresponds to the diameter at the baseline and  $d_{[\text{PE}]}$  to the one after each dose of PE. Each point is the mean value of 10 experiments, except for KCl [n=5], while the line represents the best fit of all the individual experimental points. \* p<0.05 in presence of inhibitors vs. without inhibitors.

**Figure 2:** Relaxation response curves to Cbc in uterine radial arteries of control (A) and IUGR (B) pregnant rats and the effects of L-NAME 100 $\mu$ M, Ibu 10 $\mu$ M and KCl 25 mM. Relative relaxation (%) is defined by  $(d_{[\text{Cbc}]} - d_{[\text{PEmax}]}) / [d_{\text{max}} - d_{[\text{PEmax}]}]$  where  $d_{[\text{Cbc}]}$  is the diameter measured at each concentration of Cbc,  $d_{[\text{PEmax}]}$  the diameter at maximal contraction to PE and  $d_{\text{max}}$ , the maximal relaxation in presence of EGTA. Each point is the mean value of 10 experiments, except for KCl [n=6]. † p<0.05 control vs. IUGR; \* p<0.05 in presence of inhibitors vs. without inhibitors for the same group.

**Figure 3:** Relaxation response curves to SNP in uterine radial arteries of control and IUGR pregnant rats. Relative relaxation (%) is defined by  $(d_{[\text{SNP}]} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]}) / [d_{\text{max}} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]}]$  where  $d_{[\text{SNP}]}$  is the diameter measured at each concentration of SNP,  $d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]}$  the diameter at maximal concentration to PE and  $d_{\text{max}}$ , the maximal relaxation in presence of EGTA. Each point is the mean value of 10 experiments. \* p<0.05 controls vs. IUGR.

**Figure 4:** Concentration-response curves to PE (A) and Cbc (B) in uterine radial arteries of control and IUGR pregnant rats in the presence of L-NAME 100 $\mu$ M, Ibu 10  $\mu$ M, Apa 100nM and Tram-34 10 $\mu$ M. Relative contraction (%) is defined by  $(d_{\text{basal}} - d_{[\text{PE}]}) / d_{\text{basal}}$  where  $d_{\text{basal}}$  corresponds to the diameter at the baseline and  $d_{[\text{PE}]}$  to the one after each dose of PE. The line represents the best fit of all the individual experimental points. Relative relaxation (%) is defined by  $(d_{[\text{Cbc}]} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]}) / [d_{\text{max}} - d_{[\text{PE } 3\mu\text{M}]}]$  where  $d_{[\text{Cbc}]}$  is the diameter measured at each

concentration of  $C_{bc}$ ,  $d_{[PE\ 3\mu M]}$  the diameter at maximal concentration of PE and  $d_{max}$ , the maximal relaxation in presence of EGTA. Each point is the mean value of 10 experiments.

## FIGURES

Figure 1.

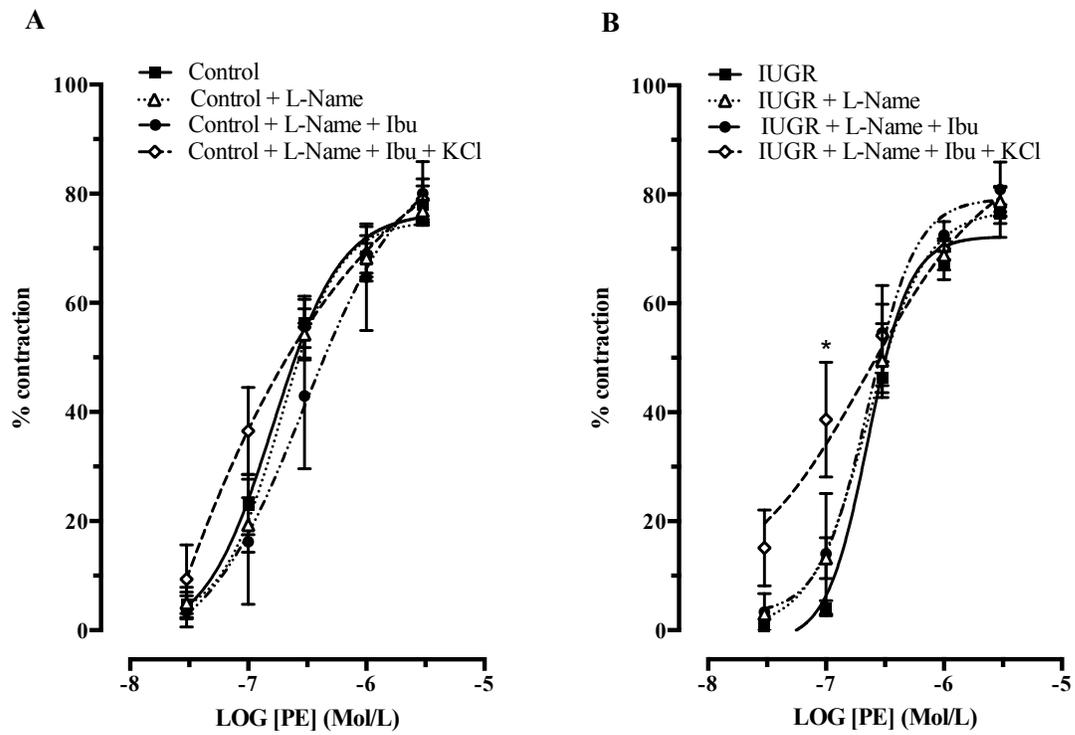


Figure 2.

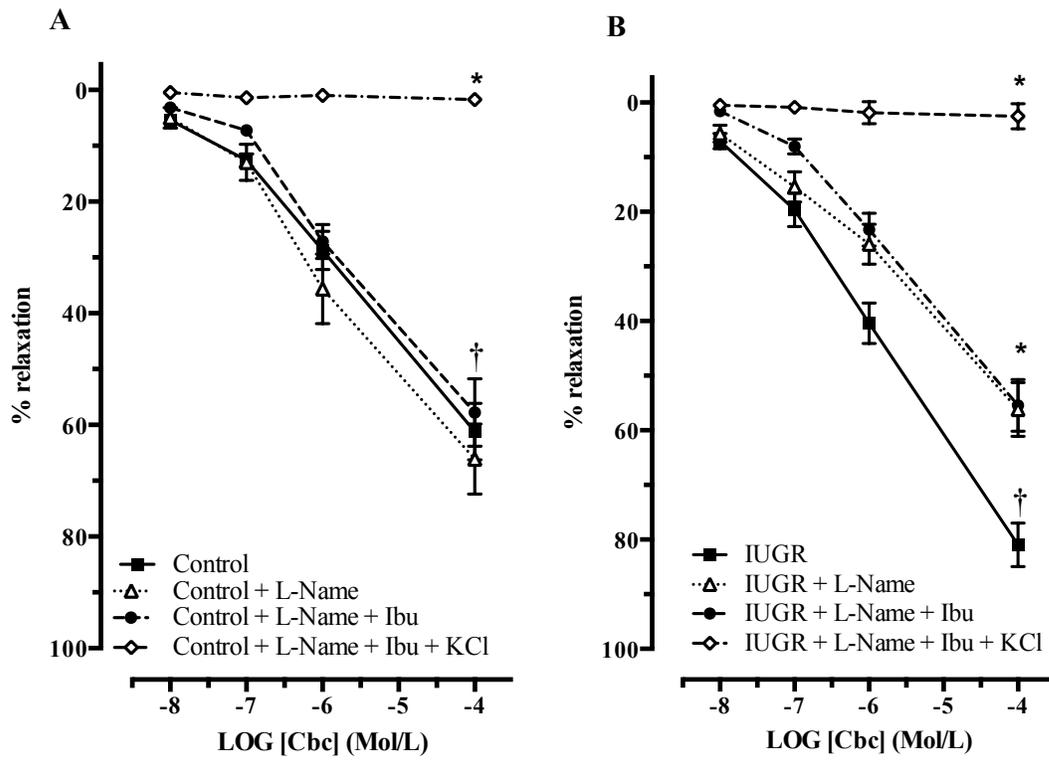


Figure 3.

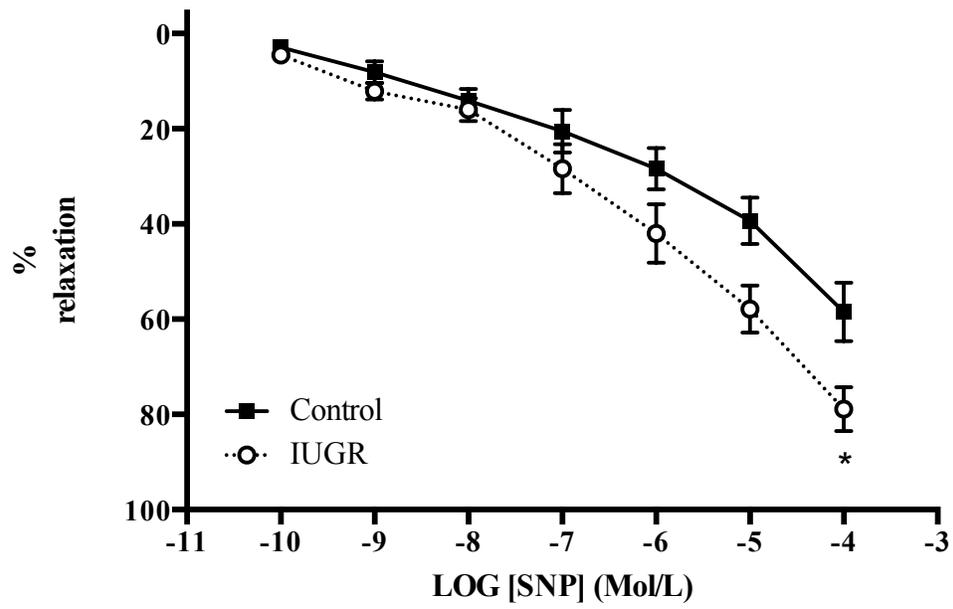
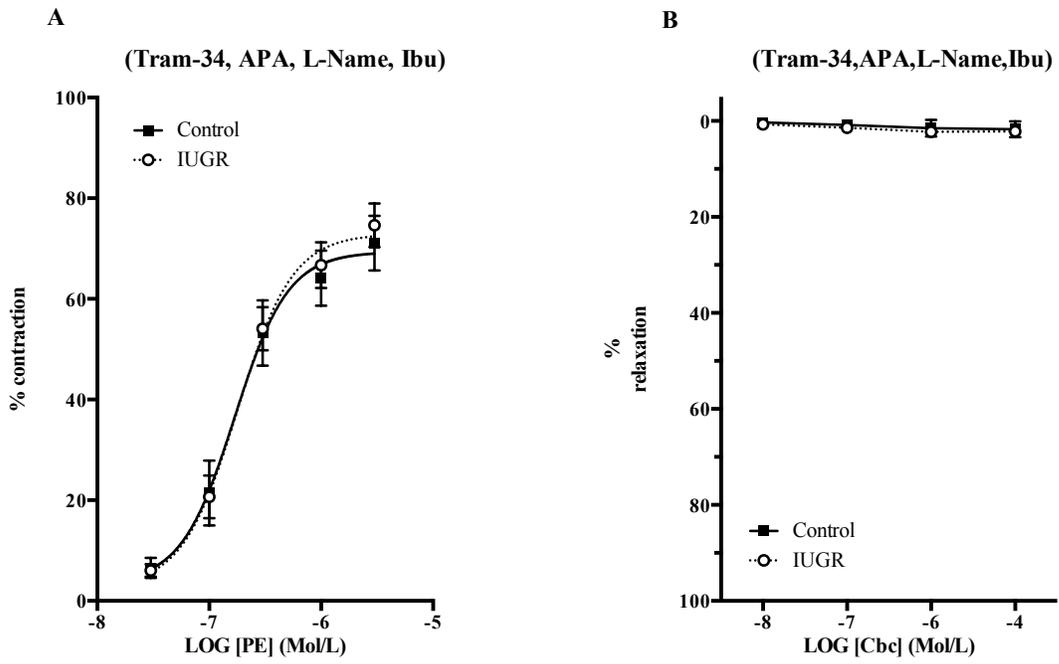


Figure 4.





## Discussion

Bien que certaines causes de la restriction de croissance intra-utérine soient bien identifiées telles que la malnutrition, la génétique, et autres, il existe des causes idiopathiques dont on tente toujours d'identifier l'origine, par exemple, la réduction de l'expansion du volume circulant maternel associée à la RCIU (98, 100). Au laboratoire, nous avons développé un modèle animal pour étudier ce phénomène en ciblant les effets sur le diamètre et la réactivité des artères utérines radiales dont le remodelage est essentiel à l'apport sanguin au fœtus.

Nous avons démontré que le diamètre des artères radiales utérines provenant des rates gestantes du modèle RCIU était plus petit que celui des vaisseaux des rates contrôles. Précédemment, une observation similaire a été faite dans des artères utérines arquées (11, 112) suggérant que, dans ce modèle, il y a une diminution du remodelage vasculaire utérin. Au cours de la grossesse normale, on observe une élongation et un élargissement des vaisseaux permettant ainsi d'assurer un apport sanguin suffisant au fœtus (27). Dans le modèle de RCIU où l'expansion volumique est diminuée, le diamètre des artères utérines est plus petit que celui des rates gestantes contrôles, mais plus grand que celui d'une rate non gestante (112). Cela suggère qu'en plus des hormones qui sont, en partie, responsables de l'augmentation du diamètre des artères utérines, la contribution de l'expansion volumique est tout aussi essentielle. Cependant, les mécanismes impliqués dans le remodelage restent à déterminer.

Puisque les vaisseaux avaient un diamètre réduit, nous avons voulu déterminer s'il y avait présence d'une dysfonction endothéliale. Pour ce faire, nous avons comparé la réponse des artères utérines radiales à des agents vasoactifs en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques des trois principales voies de dilatation dépendante de l'endothélium; la voie de  $PGI_2$ , du NO et de l'EDHF. L'ordre dans lequel les inhibiteurs ont été ajoutés dans le milieu était toujours le même soit: le L-NAME (inhibiteur de la eNOS), l'Ibuprofène (inhibiteur de COX) et KCl ou Tram-34/Apamine (inhibiteur de l'EDHF). De cette façon, chacune des courbes était représentative et comparable.

Nous n'avons observé aucune différence dans la contraction maximale à la PE chez les deux groupes en présence ou non de ces inhibiteurs. Cependant, nous avons remarqué une diminution de la réponse contractile aux faibles doses de PE chez le groupe RCIU. Par ailleurs, lors de l'ajout du KCl aux deux autres inhibiteurs, on observe un rétablissement de la réponse aux faibles concentrations de PE. Ces résultats suggèrent qu'en réponse à des concentrations physiologiques de PE, la relaxation dépendante de l'endothélium est stimulée dans les artères utérines radiales du modèle RCIU. Puisque cet effet est observé uniquement lorsque le KCl est ajouté aux 2 autres inhibiteurs, la voie de l'EDHF semble prédominante. Nos résultats sont différents de ceux obtenus dans d'autres types de vaisseaux. En utilisant des artères utérines arquées de rate normale en fin de gestation (19-20 jours), l'ajout de L-NNA (inhibiteur de la eNOS) dans les bains à organe isolé augmente la sensibilité de la réponse contractile à la PE tel qu'illustré par un déplacement vers la gauche de la courbe concentration-réponse (84, 244). Dans l'aorte thoracique de rates gestantes, la réactivité à la PE augmente significativement, suite à l'inhibition de la voie du NO par le L-NAME (63) ou par le L-NNA (8). Dans le lit vasculaire mésentérique de la rate en fin de gestation, la résistance de la réponse contractile à la PE est abolie suite à l'inhibition de la synthèse de NO par le L-NNA (8). Ces résultats suggèrent donc que les vaisseaux systémiques et utérins répondent différemment aux agents vasomoteurs au cours de la gestation. En effet, les artères utérines de 3e ordre, les artères radiales, sont plus petites, plus près des points d'insertion placentaire et contribuent probablement de façon plus importante à la régulation de la perfusion placentaire.

Contrairement à la réponse maximale au vasoconstricteur qui ne présentait aucune différence entre les vaisseaux des deux groupes de rates, nous avons observé une augmentation de la relaxation maximale au Cbc dans les artères radiales utérines des rates RCIU. De plus, dans ce groupe, l'inhibition de la voie du NO par le L-NAME induit une diminution significative de la dilatation maximale, tout en n'abolissant pas cette réponse. Ce qui suggère que le NO joue un rôle dans la relaxation dépendante de l'endothélium des artères utérines radiales des rates RCIU, par contre, ce mécanisme n'est pas le seul impliqué. En effet, pour ces expériences, nous avons ciblées les trois voies principales de relaxation dépendante de l'endothélium afin de pouvoir observer leurs effets combinés sur la dilatation au Cbc. Ce résultat peut alors être

expliqué par l'implication d'une ou des deux autres voies de relaxation en combinaison avec le NO. Précédemment au laboratoire, nous avons constaté que l'hématocrite des rates gestantes RCIU était plus élevé que celui des rates contrôles (11), suggérant une plus grande viscosité sanguine. Les forces de cisaillement exercées sur l'endothélium des artères de gros calibre sont proportionnelles à la viscosité sanguine (60) qui stimulent l'expression de eNOS et la synthèse endothéliale de NO (9, 121). Ainsi, nos résultats en présence de L-NAME suggèrent que l'importance accrue du NO dans la réactivité des artères utérines des RCIU peut être causée par une augmentation des forces de cisaillement. Le NO tient un rôle important dans l'adaptation de la circulation utéro-placentaire au cours de la gestation. Il a été démontré qu'un traitement au L-NNA sur des artères utérines arquées de rates non gestantes n'a aucun effet significatif sur la réponse contractile à la PE, par contre, le même traitement sur des rates gestantes augmente la sensibilité de la réponse. Ce qui indique qu'au cours de la gestation il y a une augmentation de la production endothéliale de NO dans les artères utérines arquées, qui contribue à la diminution du tonus myogène et la sensibilité aux agents vasoconstricteurs favorisant l'augmentation de la perfusion utérine (84).

La hausse de l'activité de la voie du NO lors de la réponse au Cbc dans les vaisseaux du groupe RCIU peut suggérer une augmentation de la fonction endothéliale. En effet, la fonction endothéliale se caractérise, entre autres, par le contrôle du tonus myogène grâce à la sécrétion de substances vasoactives telles que le NO, la PGI<sub>2</sub>, l'endothéline et l'angiotensine II. Afin de spécifier et de situer le mécanisme responsable de l'activité accrue du NO, nous avons utilisé le SNP. Cette substance permet de déterminer l'effet du NO sans activation de la NO synthase endothéliale en agissant directement sur le muscle lisse par l'activation de la GCs et la production de GMPc (23, 52, 53). Ce qui nous a permis de déterminer s'il s'agissait d'une plus grande production de NO par les cellules endothéliales ou d'une sensibilité accrue au NO des cellules musculaires lisses. Nous avons observé une augmentation de la réponse dilatatrice au SNP dans les vaisseaux des rates RCIU par rapport aux témoins. Cela signifie que la hausse de l'activité de la voie du NO dans les vaisseaux des rates RCIU n'est pas due à une surproduction endothéliale mais bien à une augmentation de la sensibilité du muscle lisse au NO. Ce qui suggère qu'un ou plusieurs mécanismes reliés au NO dans la cellule musculaire lisse pourraient être suractivés ou sur exprimés chez les rates RCIU. Plusieurs mécanismes peuvent

être impliqués dans cette réponse, entre autres, une augmentation de l'expression ou de l'activité de la GCs qui est situé sur la membrane de la cellule musculaire lisse et qui produit de la GMPc, suite à une stimulation par le NO (7, 114, 124) ou encore une hausse de l'activité ou de l'expression des canaux BK<sub>ca</sub> qui peuvent être activés directement par le NO (indépendamment de la voie GCs/GMPc) et qui pourraient jouer un rôle important dans la relaxation dépendante du NO (78). De plus, une diminution de l'activité de dégradation de la GMPc par la phosphodiesterase de type 5 (PDE5) augmenterait également la réponse dilatatrice musculaire lisse (21, 32) puisque GMPc joue un rôle important dans de la relaxation du MLV et que sa production est régulée, entre autres, par la stimulation de la GCs par le NO. Afin de mieux préciser les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'augmentation de la réponse au NO, l'expression protéique ou l'activité de la GCs et des canaux BK<sub>ca</sub> pourrait être mesurées. De plus, l'observation de la dilatation au 8-Bromo-cGMP (un agoniste non-hydrolysable du GMPc) permettrait d'analyser la relaxation musculaire lisse reliée à l'activité du GMPc et sa dégradation par la PDE5.

Les résultats de la relaxation au Cbc obtenus lors de l'inhibition de la COX par l'ibuprofène et de la eNOS par le L-NAME en combinaison ne démontrent aucune différence significative comparativement à ceux obtenus lors de l'inhibition de la eNOS seule; ceci suggère que la diminution de la relaxation maximale observée est attribuée seulement à la voie du NO et, donc, que la voie des PGI<sub>2</sub> n'est pas impliquée dans la relaxation au Cbc chez les deux groupes. Par contre, l'addition du KCl aux deux autres inhibiteurs bloque complètement la réponse dilatatrice au Cbc dans les vaisseaux des deux groupes. On en déduit que l'EDHF est le plus important des mécanismes de relaxation dépendant de l'endothélium dans les artères utérines radiales de rate gestante. Ceci est en accord avec différents travaux qui démontrent l'existence d'une relation inverse entre le diamètre des vaisseaux et l'activité de l'EDHF et du NO. En effet, dans le lit vasculaire mésentérique, plus le diamètre du vaisseau est petit plus l'EDHF contribue à la réponse dilatatrice au détriment du NO (105). Un résultat similaire démontrant une relation inverse entre l'activité de l'EDHF et le diamètre des vaisseaux a été également observé dans les artères de résistance de l'oreille de lapin (12). Chez la souris, l'activité de la eNOS est diminuée dans l'endothélium des artères mésentériques comparativement à l'endothélium de l'aorte (86). Par ailleurs, dans les artères mésentériques

supérieures, on observe une diminution de la relaxation suite à l'ajout de ADMA, un inhibiteur de la synthèse de NO, ce qui suggère que la réponse dilatatrice est principalement médiée par le NO dans ces vaisseaux. De plus, dans les petites artères mésentériques, la relaxation est majoritairement réduite par l'inhibition des canaux  $K_{Ca2.3}$  ou  $K_{Ca3.1}$  grâce à l'addition d'apamine ou de Tram-34/ChTX, ce qui démontre une réponse médiée principalement par l'EDHF (113).

L'utilisation du KCl 25mM permet d'observer l'effet des ions  $K^+$  en général sur la relaxation au Cbc. Plusieurs mécanismes endothéliaux et musculaires impliqués dans l'EDHF sont en lien avec les variations de concentration d'ions  $K^+$ , c'est pourquoi nous avons voulu confirmer et spécifier le rôle des canaux endothéliaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$  dans cette voie de relaxation. Pour ce faire, nous avons utilisé l'apamine et le Tram-34 afin d'inhiber les canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$ , respectivement. Suite à l'ajout de ces deux substances aux L-NAME et à l'Ibu, nous observons une inhibition complète de la réponse dilatatrice au Cbc telle qu'observée lors de l'ajout de KCl. Ce résultat concorde avec d'autres études dans lesquelles il est démontré que les canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$  sont d'importants médiateurs de la relaxation dépendante de l'endothélium. En effet, chez le rat, ces canaux sont en grande partie responsables de l'hyperpolarisation de l'endothélium dans la carotide (38), l'artère hépatique (5) et les artérioles (104). De plus, chez la brebis, le canal  $K_{Ca2.3}$  fait partie des mécanismes d'adaptation du tonus myogène dans les artères utérines durant la gestation (126). Toutes ces études suggèrent que la majorité de l'activité endothéliale hyperpolarisante provient des canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$ , ces canaux sont donc d'importants régulateurs de la relaxation dépendante de l'endothélium. Toutefois, afin de préciser le rôle respectif de chacun dans la génération d'une hyperpolarisation endothéliale, des courbes concentration-réponse au Cbc devraient être faites en présence d'un seul inhibiteur spécifique à chaque canal à la fois et en utilisant les mêmes concentrations que précédemment, soit 100nM d'apamine et 10 $\mu$ M de Tram-34. Par ailleurs, les ions  $K^+$  sont associés à plusieurs autres mécanismes qui favorisent également la relaxation du muscle lisse par hyperpolarisation tels que la pompe  $Na^2+/K^+$  ATPase, les canaux  $K_{IR}$  (33, 45, 54, 64) situés sur la membrane des cellules musculaires lisses qui entraînent l'hyperpolarisation de celle-ci et les jonctions myoendothéliales (56, 57) qui facilitent le passage direct du potentiel membranaire entre les cellules endothéliales et musculaires lisses. Afin de mieux caractériser

l'implication de ces mécanismes dans la relaxation au Cbc, il faudrait refaire les courbes concentration-réponse en présence d'un inhibiteur spécifique à chacun pour lequel nous aurons préalablement établi la meilleure concentration à utiliser. Nous avons déjà identifié certains inhibiteurs qui pourraient être utilisés; soit la ouabaïne pour la pompe  $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$  ATPase, le barium pour les canaux  $\text{K}_{\text{IR}}$  et le Gap 27 pour les jonctions myoendothéliales.

D'autres substances telles que les hormones semblent jouer un rôle important dans l'adaptation des vaisseaux utérins durant la gestation. En effet, la relaxine favorise la compliance des artères utérines chez la rate gestante (123). Par ailleurs, les oestrogènes possèdent un effet vasorelaxant sur les artères utérines de rate (101). Chez l'humain, les oestrogènes exercent également une activité vasodilatatrice et jouent un rôle dans la régulation le tonus myogène de façon spécifique au tissu (artères utérines ou placentaires) (24). L'analyse de la production et de l'effet de ces hormones dans notre modèle animal de diminution d'expansion volumique nous permettrait d'identifier de nouveaux mécanismes, autres qu'endothéliaux, qui pourraient aussi être impliqués dans les modifications adaptatives vasculaires utérines observées.

## **Conclusion**

Nos travaux ont permis de démontrer que l'EDHF est impliqué dans la dilatation dépendante de l'endothélium des artères utérines radiales au cours de la gestation. De plus, à l'aide du modèle RCIU, caractérisé par une réduction du volume circulant maternel, nous avons observé qu'il y a une augmentation de l'action du NO sur le muscle lisse. Ces mécanismes sont probablement mis en place afin de compenser la diminution du diamètre des artères utérines qui entraîne une réduction de la perfusion placentaire. Par ailleurs, les résultats obtenus suite à la relaxation au SNP nous permettent d'affirmer que la réponse musculaire lisse au NO est augmentée chez les RCIU.

La poursuite de ces travaux permettrait de déterminer des cibles potentielles dans l'élaboration d'un traitement préventif lors d'expansion volumique diminuée au cours de la grossesse. À long terme, ceci pourrait contribuer à réduire le risque de conséquences néfastes pour la croissance du fœtus et, ainsi, préserver la santé et la qualité de vie de la progéniture.

## Bibliographie

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 183: S1-S22, 2000.
2. **A.L. K.** *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique.*, 2006.
3. **Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, and Say L.** Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 170: 1-7, 2013.
4. **Abberton KM, Taylor NH, Healy DL, and Rogers PA.** Vascular smooth muscle cell proliferation in arterioles of the human endometrium. *Human reproduction* 14: 1072-1079, 1999.
5. **Andersson DA, Zygmunt PM, Movahed P, Andersson TL, and Hogestatt ED.** Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/K(+) ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 129: 1490-1496, 2000.
6. **Annibale DJ, Rosenfeld CR, Stull JT, and Kamm KE.** Protein content and myosin light chain phosphorylation in uterine arteries during pregnancy. *The American journal of physiology* 259: C484-489, 1990.
7. **Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, and Weir EK.** Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by

cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7583-7587, 1994.

8. **Ballejo G, Barbosa TA, Coelho EB, Antoniali C, and Salgado MC.** Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life sciences* 70: 3131-3142, 2002.

9. **Barauna VG, Mantuan PR, Magalhaes FC, Campos LC, and Krieger JE.** AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177.). *Biochemical and biophysical research communications* 441: 713-719, 2013.

10. **Barron WM.** Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 9: 296-302, 1987.

11. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, and Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *The Journal of physiology* 562: 937-950, 2005.

12. **Berman RS, Martin PE, Evans WH, and Griffith TM.** Relative contributions of NO and gap junctional communication to endothelium-dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary with vessel size. *Microvascular research* 63: 115-128, 2002.

13. **Bird IM, Zhang L, and Magness RR.** Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 284: R245-258, 2003.

14. **Bobadilla LR, Perez-Alvarez V, Bracho Valdes I, and Lopez-Sanchez P.** Effect of pregnancy on the roles of nitric oxide and prostaglandins in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat isolated thoracic and abdominal aorta. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 32: 202-209, 2005.
15. **Brosens I, Dixon HG, and Robertson WB.** Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *British journal of obstetrics and gynaecology* 84: 656-663, 1977.
16. **Brosens JJ, Pijnenborg R, and Brosens IA.** The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *American journal of obstetrics and gynecology* 187: 1416-1423, 2002.
17. **Buffat C, Boubred F, Mondon F, Chelbi ST, Feuerstein JM, Lelievre-Pegorier M, Vaiman D, and Simeoni U.** Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes. *Endocrinology* 148: 5549-5557, 2007.
18. **Canada S.** Tableau 102-4005 : Faible poids à la naissance (moins de 2 500 grammes), selon le sexe, Canada, provinces et territoires, annuel-2005 [Online]. 2008.
19. **Chen G, Suzuki H, and Weston AH.** Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165-1174, 1988.
20. **Chervenak AKaFA.** *Text book of perinatal medecine* 2006.
21. **Chrysant SG.** Effectiveness and safety of phosphodiesterase 5 inhibitors in patients with cardiovascular disease and hypertension. *Current hypertension reports* 15: 475-483, 2013.

22. **Clark SL, Cotton DB, Lee W, Bishop C, Hill T, Southwick J, Pivarnik J, Spillman T, DeVore GR, Phelan J, and et al.** Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 161: 1439-1442, 1989.
23. **Clements RT, Sodha NR, Feng J, Boodhwani M, Liu Y, Mieno S, Khabbaz KR, Bianchi C, and Sellke FW.** Impaired coronary microvascular dilation correlates with enhanced vascular smooth muscle MLC phosphorylation in diabetes. *Microcirculation* 16: 193-206, 2009.
24. **Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M, and Taggart MJ.** Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17beta-estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Molecular human reproduction* 20: 433-441, 2014.
25. **Costantine MM.** Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Frontiers in pharmacology* 5: 65, 2014.
26. **Cotechini T, Komisarenko M, Sperou A, Macdonald-Goodfellow S, Adams MA, and Graham CH.** Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia. *The Journal of experimental medicine* 211: 165-179, 2014.
27. **D'Angelo G and Osol G.** Regional variation in resistance artery diameter responses to alpha-adrenergic stimulation during pregnancy. *The American journal of physiology* 264: H78-85, 1993.
28. **Dash P KR.** *Reproductive Biology*, 2009.

29. **de Wit C and Griffith TM.** Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 459: 897-914, 2010.
30. **De Wolf F, Brosens I, and Renaer M.** Fetal growth retardation and the maternal arterial supply of the human placenta in the absence of sustained hypertension. *British journal of obstetrics and gynaecology* 87: 678-685, 1980.
31. **Desai DK, Moodley J, and Naidoo DP.** Echocardiographic assessment of cardiovascular hemodynamics in normal pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 104: 20-29, 2004.
32. **Dishy V, Sofowora G, Harris PA, Kandcer M, Zhan F, Wood AJ, and Stein CM.** The effect of sildenafil on nitric oxide-mediated vasodilation in healthy men. *Clinical pharmacology and therapeutics* 70: 270-279, 2001.
33. **Dora KA and Garland CJ.** Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K<sup>+</sup> in the rat isolated mesenteric artery. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280: H2424-2429, 2001.
34. **Dowell RT and Kauer CD.** Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 19: 613-625, 1997.
35. **Duvekot JJ and Peeters LL.** Maternal cardiovascular hemodynamic adaptation to pregnancy. *Obstetrical & gynecological survey* 49: S1-14, 1994.
36. **Duvekot JJ and Peeters LL.** Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstetrical & gynecological survey* 49: 830-839, 1994.

37. **Eckman DM, Gupta R, Rosenfeld CR, Morgan TM, Charles SM, Mertz H, and Moore LG.** Pregnancy increases myometrial artery myogenic tone via NOS- or COX-independent mechanisms. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 303: R368-375, 2012.
38. **Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, and Kohler R.** Selective blockade of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated small- and intermediate-conductance K<sup>+</sup>-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 138: 594-601, 2003.
39. **Eriksson UJ and Jansson L.** Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. *Pediatric research* 18: 735-738, 1984.
40. **Fernandez Celadilla L, Carbajo Rueda M, and Munoz Rodriguez M.** Intrauterine growth restriction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* 23: 275-283, 2004.
41. **Floyd R and Wray S.** Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell calcium* 42: 467-476, 2007.
42. **Gagnon R.** Placental insufficiency and its consequences. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 110 Suppl 1: S99-107, 2003.
43. **Ganong WF.** *Physiologie médicale* , 2012.
44. **Garfield RE, Ali M, Yallampalli C, and Izumi H.** Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility. *Seminars in perinatology* 19: 41-51, 1995.
45. **Garland CJ, Hiley CR, and Dora KA.** EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* 164: 839-852, 2011.

46. **Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, and Milne CM.** Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *The Journal of endocrinology* 113: 435-444, 1987.
47. **Geelhoed JJ, El Marroun H, Verburg BO, van Osch-Gevers L, Hofman A, Huizink AC, Moll HA, Verhulst FC, Helbing WA, Steegers EA, and Jaddoe VW.** Maternal smoking during pregnancy, fetal arterial resistance adaptations and cardiovascular function in childhood. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 118: 755-762, 2011.
48. **Gerretsen G, Huisjes HJ, and Elema JD.** Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *British journal of obstetrics and gynaecology* 88: 876-881, 1981.
49. **Giardina JB, Cockrell KL, Granger JP, and Khalil RA.** Low-Salt Diet Enhances Vascular Reactivity and Ca<sup>2+</sup> Entry in Pregnant Rats With Normal and Reduced Uterine Perfusion Pressure. *Hypertension* 39: 368-374, 2002.
50. **Gokina NI, Kuzina OY, Fuller R, and Osol G.** Local uteroplacental influences are responsible for the induction of uterine artery myogenic tone during rat pregnancy. *Reproductive sciences* 16: 1072-1081, 2009.
51. **Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC, and Haller H.** L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12: 593-601, 1998.

52. **Goulopoulou S, Hannan JL, Matsumoto T, Ergul A, and Webb RC.** Augmented dilation to nitric oxide in uterine arteries from rats with type 2 diabetes: implications for vascular adaptations to pregnancy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 306: H610-618, 2014.
53. **Gunduz F, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** High intravascular pressure attenuates vascular dilation responses of small mesenteric arteries in the rat. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 72: 482-486, 2008.
54. **Haddy FJ, Vanhoutte PM, and Feletou M.** Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 290: R546-552, 2006.
55. **Harris AL.** Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* 2: 38-47, 2002.
56. **Harris D, Martin PE, Evans WH, Kendall DA, Griffith TM, and Randall MD.** Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K(+)-relaxation. *European journal of pharmacology* 402: 119-128, 2000.
57. **Hill CE, Hickey H, and Sandow SL.** Role of gap junctions in acetylcholine-induced vasodilation of proximal and distal arteries of the rat mesentery. *Journal of the autonomic nervous system* 81: 122-127, 2000.
58. **Hu XQ, Xiao D, Zhu R, Huang X, Yang S, Wilson S, and Zhang L.** Pregnancy upregulates large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel activity and attenuates myogenic tone in uterine arteries. *Hypertension* 58: 1132-1139, 2011.

59. **Huang A, Sun D, Kaley G, and Koller A.** Estrogen preserves regulation of shear stress by nitric oxide in arterioles of female hypertensive rats. *Hypertension* 31: 309-314, 1998.
60. **Huo Y and Kassab GS.** Effect of compliance and hematocrit on wall shear stress in a model of the entire coronary arterial tree. *J Appl Physiol (1985)* 107: 500-505, 2009.
61. **Jobe SO, Tyler CT, and Magness RR.** Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. *Hypertension* 61: 480-487, 2013.
62. **John-W Heath P-RW, Barbara Young.** *Histologie fonctionnelle* 2001.
63. **Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, and Granger JP.** Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 31: 1065-1069, 1998.
64. **Knot HJ, Zimmermann PA, and Nelson MT.** Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *The Journal of physiology* 492 ( Pt 2): 419-430, 1996.
65. **Kudryavtseva O, Herum KM, Dam VS, Straarup MS, Kamaev D, Briggs Boedtkjer DM, Matchkov VV, and Aalkjaer C.** Downregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel in rat mesenteric arteries leads to loss of smooth muscle contractile phenotype and inward hypertrophic remodeling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 306: H1287-1301, 2014.
66. **Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Mu J, Bainbridge SA, and Adamson SL.** Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension* 60: 231-238, 2012.

67. **Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, and Clark KE.** Uterine blood flow--a determinant of fetal growth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 110 Suppl 1: S55-61, 2003.
68. **Larsen W.** *Embryologie humaine* 2011.
69. **Lee CH, Poburko D, Sahota P, Sandhu J, Ruehlmann DO, and van Breemen C.** The mechanism of phenylephrine-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. *The Journal of physiology* 534: 641-650, 2001.
70. **Leiberman JR, Wiznitzer A, Glezerman M, Feldman B, Levy J, and Sharoni Y.** Estrogen and progesterone receptors in the uterine artery of rats during and after pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 51: 35-40, 1993.
71. **Li Y, Zheng J, Bird IM, and Magness RR.** Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 12: 21-39, 2005.
72. **Longo S, Borghesi A, Tziella C, and Stronati M.** IUGR and infections. *Early human development* 90 Suppl 1: S42-44, 2014.
73. **Lukaski HC, Siders WA, Nielsen EJ, and Hall CB.** Total body water in pregnancy: assessment by using bioelectrical impedance. *The American journal of clinical nutrition* 59: 578-585, 1994.

74. **Lyall F, Robson SC, and Bulmer JN.** Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension* 62: 1046-1054, 2013.
75. **Mandala M and Osol G.** Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 110: 12-18, 2012.
76. **Massicotte G, St-Louis J, Parent A, and Schiffrin EL.** Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65: 2466-2471, 1987.
77. **Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, Suzuki M, and Zhang DX.** TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H466-476, 2010.
78. **Mistry DK and Garland CJ.** Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 124: 1131-1140, 1998.
79. **Moncada S and Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine* 329: 2002-2012, 1993.
80. **Moncada S and Vane JR.** Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacological reviews* 30: 293-331, 1978.

81. **Monk D and Moore GE.** Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 9: 371-378, 2004.
82. **Moutquin JM, Bilodeau R, Raynault P, Amyot G, Blair JF, Labelle L, Rainville C, and Gagnon L.** [Prospective study of arterial pressure during pregnancy. Prediction of hypertensive complications]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 11: 833-837, 1982.
83. **Nelson MT and Quayle JM.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 268: C799-822, 1995.
84. **Ni Y, Meyer M, and Osol G.** Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *American journal of obstetrics and gynecology* 176: 856-864, 1997.
85. **Nugent JL, Wareing M, Palin V, Sibley CP, Baker PN, Ray DW, Farrow SN, and Jones RL.** Chronic glucocorticoid exposure potentiates placental chorionic plate artery constriction: implications for aberrant fetoplacental vascular resistance in fetal growth restriction. *Endocrinology* 154: 876-887, 2013.
86. **Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, and Shimokawa H.** Mechanisms for Enhanced Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Microvessels in Mice. *Circulation Journal* 76: 1768-1779, 2012.
87. **Osol G, Barron C, Gokina N, and Mandala M.** Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling. *Journal of vascular research* 46: 478-486, 2009.

88. **Osol G and Moore LG.** Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Microcirculation*, 2013.
89. **Palmer SK, Zamudio S, Coffin C, Parker S, Stamm E, and Moore LG.** Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 80: 1000-1006, 1992.
90. **Plank C, Nusken KD, Menendez-Castro C, Hartner A, Ostreicher I, Amann K, Baumann P, Peters H, Rascher W, and Dotsch J.** Intrauterine growth restriction following ligation of the uterine arteries leads to more severe glomerulosclerosis after mesangioproliferative glomerulonephritis in the offspring. *American journal of nephrology* 32: 287-295, 2010.
91. **Rahimian R, Chan L, Goel A, Poburko D, and van Breemen C.** Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 322: 373-379, 2004.
92. **Ream M, Ray AM, Chandra R, and Chikaraishi DM.** Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 295: R583-595, 2008.
93. **Reho JJ, Toot JD, Peck J, Novak J, Yun YH, and Ramirez RJ.** Increased Myogenic Reactivity of Uterine Arteries from Pregnant Rats with Reduced Uterine Perfusion Pressure. *Pregnancy hypertension* 2: 106-114, 2012.
94. **Rogers PA and Abberton KM.** Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. *Microscopy research and technique* 60: 412-419, 2003.

95. **Ronco AM, Arguello G, Munoz L, Gras N, and Llanos M.** Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 18: 233-241, 2005.
96. **Rosenfeld CR.** Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 281: R1025-1040, 2001.
97. **Rosenfeld CR, Morriss FH, Jr., Makowski EL, Meschia G, and Battaglia FC.** Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. *Gynecologic investigation* 5: 252-268, 1974.
98. **Rosso P, Donoso E, Braun S, Espinoza R, Fernandez C, and Salas SP.** Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecologic and obstetric investigation* 35: 162-165, 1993.
99. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 180: 608-613, 1999.
100. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, and Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47: 203-208, 2006.
101. **Scott PA, Tremblay A, Brochu M, and St-Louis J.** Vasorelaxant action of 17 - estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293: H3713-3719, 2007.

102. **Segal SS and Duling BR.** Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? *The American journal of physiology* 256: H838-845, 1989.
103. **Senadheera S, Bertrand PP, Grayson TH, Leader L, Murphy TV, and Sandow SL.** Pregnancy-induced remodelling and enhanced endothelium-derived hyperpolarization-type vasodilator activity in rat uterine radial artery: transient receptor potential vanilloid type 4 channels, caveolae and myoendothelial gap junctions. *Journal of anatomy* 223: 677-686, 2013.
104. **Sheng JZ, Ella S, Davis MJ, Hill MA, and Braun AP.** Openers of SKCa and IKCa channels enhance agonist-evoked endothelial nitric oxide synthesis and arteriolar vasodilation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: 1138-1145, 2009.
105. **Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, and Takeshita A.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 28: 703-711, 1996.
106. **Sibai B, Dekker G, and Kupferminc M.** Pre-eclampsia. *Lancet* 365: 785-799, 2005.
107. **Siler-Khodr TM, Yang Y, Grayson MH, Henderson GI, Lee M, and Schenker S.** Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol* 21: 169-180, 2000.
108. **Somm E, Vauthay DM, Guerardel A, Toulotte A, Cettour-Rose P, Klee P, Meda P, Aubert ML, Huppi PS, and Schwitzgebel VM.** Early metabolic defects in

dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. *PloS one* 7: e50131, 2012.

109. **Sprague B, Chesler NC, and Magness RR.** Shear stress regulation of nitric oxide production in uterine and placental artery endothelial cells: experimental studies and hemodynamic models of shear stresses on endothelial cells. *The International journal of developmental biology* 54: 331-339, 2010.

110. **St-Louis J, Pare H, Roy B, and Brochu M.** Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2: 516-522, 1995.

111. **St-Louis J, Pare H, Sicotte B, and Brochu M.** Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *The American journal of physiology* 273: H1148-1153, 1997.

112. **St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A, and Brochu M.** Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 131: 331-339, 2006.

113. **Stankevicius E, Dalsgaard T, Kroigaard C, Beck L, Boedtkjer E, Misfeldt MW, Nielsen G, Schjorring O, Hughes A, and Simonsen U.** Opening of small and intermediate calcium-activated potassium channels induces relaxation mainly mediated by nitric-oxide release in large arteries and endothelium-derived hyperpolarizing factor in small arteries from rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339: 842-850, 2011.

114. **Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, and Simonsen U.** [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina* 39: 333-341, 2003.

115. **Storment JM, Meyer M, and Osol G.** Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. *American journal of obstetrics and gynecology* 183: 449-453, 2000.
116. **Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, and Brandes JM.** Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 162: 121-125, 1990.
117. **Thoresen M and Wesche J.** Doppler measurements of changes in human mammary and uterine blood flow during pregnancy and lactation. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 67: 741-745, 1988.
118. **Tosun M, Paul RJ, and Rapoport RM.** Coupling of store-operated Ca<sup>++</sup> entry to contraction in rat aorta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 285: 759-766, 1998.
119. **Trévoux R.** L'endomètre présent et avenir. 2009.
120. **van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, De Mey JG, and van Eys GJ.** Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biology of reproduction* 72: 1161-1168, 2005.
121. **Vequaud P and Freslon JL.** Components of flow-induced dilation in rat perfused coronary artery. *Cell biology and toxicology* 12: 227-232, 1996.
122. **Verkeste CM, Slangen BF, Dubelaar ML, van Kreel BK, and Peeters LL.** Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rat. *The American journal of physiology* 274: H1662-1666, 1998.

123. **Vodstrcil LA, Tare M, Novak J, Dragomir N, Ramirez RJ, Wlodek ME, Conrad KP, and Parry LJ.** Relaxin mediates uterine artery compliance during pregnancy and increases uterine blood flow. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26: 4035-4044, 2012.
124. **Wanstall JC, Jeffery TK, Gambino A, Lovren F, and Triggle CR.** Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol* 134: 463-472, 2001.
125. **Zana-Taieb E, Butruille L, Franco-Montoya ML, Lopez E, Vernier F, Grandvullemin I, Evain-Brion D, Deruelle P, Baud O, Delacourt C, and Jarreau PH.** Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. *PloS one* 8: e78326, 2013.
126. **Zhu R, Hu XQ, Xiao D, Yang S, Wilson SM, Longo LD, and Zhang L.** Chronic hypoxia inhibits pregnancy-induced upregulation of SKCa channel expression and function in uterine arteries. *Hypertension* 62: 367-374, 2013.





