

Université de Montréal

Le système vasopressinergique et son rôle possible dans la  
maturation cardiaque

Par  
Malgorzata Miskurka

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences  
en Sciences de la santé  
option Sciences biomédicales

Novembre 2005

© Malgorzata Miskurka, 2005



W

4

U58

2006

V.080

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Le système vasopressinergique et son rôle possible dans la  
maturation cardiaque**

Présenté par :  
Malgorzata Miskurka

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....Dr. Daniel Bichet.....  
président-rapporteur

.....Dr. Jolanata Gutkowska.....  
directeur de recherche

.....Dr. Marek Jankowski.....  
codirecteur

.....Dr. Eric Troncy.....  
membre du jury

## **Abstract:**

Traditionally, the hypothalamo-neurohypophysial system was thought to be the exclusive source of vasopressin (VP). VP is implicated in vasoconstriction, free water reabsorption, and adrenocorticotrophic hormone secretion. These actions are mediated by three receptors localized in the vascular tree (V1), kidney (V2) and pituitary gland (V3), respectively. Recently, *de novo* synthesis of VP was identified in the heart. Stimulation of VP receptors leads to cell proliferation and hypertrophy. Since these two effects are crucial to heart development, we investigated whether the VP system is altered during heart maturation by studying its temporal and spatial distribution. Experiments were performed on Sprague-Dawley rats at the age of 1, 5 and 60 postnatal days, and on newborn rat cardiomyocytes in culture. Cardiac expression of the VP-Neurophysin-II precursor gene was obtained by real time PCR. Radioimmunoassay demonstrated that cardiac VP concentration decreases postnatally from  $711 \pm 67$  in newborns to  $213 \pm 18$  pg/mg protein in adult rats. Immunocytochemistry showed VP in fibroblasts infiltrating the myocardium and in adventitia of coronary vessels. V1 and V2 receptors were expressed and regulated in the maturing heart and in cardiac isolated cells, as detected by RT-PCR, Western-blotting, and immunocytochemistry analysis. Interestingly, a transient elevation of transcript and protein for V2 was observed at day 5, whereas two molecular forms were obtained for V1, one of 45 kDa and increasing, the other of 150 kDa and decreasing progressively during heart maturation. We conclude that dynamic changes of the cardiac VP system during postnatal ontogeny indicate a possible role in cardiac development.

**Key words :** vasopressin, V1, V2, heart, immunolocalisation, RNAs, proteins, postnatal ontogenesis, rat

## RÉSUMÉ :

L'hypothalamus est connu comme la source unique de la Vasopressine (VP). La VP est impliquée dans la vasoconstriction, la réabsorption d'eau et la sécrétion d'ACTH. Ces actions sont conduites par récepteurs : V1 (vasculaire), V2 (rénal) et V3 (hypophysaire). La synthèse *de novo* de VP a été démontrée dans le coeur. La stimulation des récepteurs mène à la prolifération et à l'hypertrophie cellulaire. Comme ces deux actions sont cruciales pour le développement cardiaque, nous avons investigué les changements d'expression du système de VP pendant la maturation cardiaque. Les expériences ont été effectuées sur les coeurs de rat (Sprague Dawley) âgés de 1, 5, 66 jours postnataux et sur les cardiomyocytes néonataux en culture. La présence des transcrits du gène de la VP-Neurophysine-II cardiaque a été obtenue par la PCR en temps réel. Le RIA a démontré que la concentration de VP cardiaque passe de  $711 \pm 67$  chez le nouveau-né à  $213 \pm 18$  pg/mg protéines chez adulte. La VP a été détectée dans les fibroblastes du myocarde et dans l'adventice des vaisseaux coronaires par immunocytochimie. Les analyses par RT-PCR, Western-blot et immunocytochimie détectent l'expression et la régulation de V1 et V2 dans le tissu et les cellules cardiaques. Une élévation transitoire était obtenue pour V2 au jour 5. Deux formes moléculaires ont été observées pour V1 : 45 kDa qui augmente et 150 kDa qui diminue progressivement pendant la maturation. L'ensemble des changements dynamiques du système VP pendant l'ontogenèse postnatale indique son rôle potentiel dans le développement cardiaque.

**Mots clés : vasopressine, V1, V2, coeur, immunolocalisation, ARNms, protéines, ontogenèse postnatale, rat**

Liste des tableaux .....	5
Liste des figures .....	6
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1. La vasopressine, l'historique.....	1
2. Caractéristiques structurelles et fonctionelles .....	1
3. La régulation de la relâche de vasopressine .....	3
4. Les récepteurs vasopressinergiques .....	4
4.1 Mécanismes d'action des récepteurs de la vasopressine.....	4
4.2 Les effets produits par la vasopressine via ses récepteurs .....	5
4.3 Récepteur V1: description et rôle.....	6
4.4 Récepteur V2 : description et rôle.....	7
4.5 Récepteur V3 : description et rôle.....	8
4.6 Récepteurs purinergiques (P2) et d'ocytocine (OTR).....	8
5. Expression extra- hypophysaire de la Vasopressine .....	9
5.1 Les effets de la vasopressine sur le système cardiovasculaire .....	10
5.2 Les effets de la vasopressine sur les cellules cardiaques .....	11
6. Objectifs et hypothèse .....	12
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	14
1. Animaux .....	14
2. Essai radioimmunologique.....	14
2.1 Marquage de la vasopressine.....	14
2.2 Extraction de la vasopressine et reconstitution des échantillons.....	15
2.3 Rendement d'extraction et contrôle expérimental .....	15
2.4 Dosage de la vasopressine.....	15
3. Mesure des protéines.....	16
4. Immunocytochimie.....	16
4.1 Préparation des tissus pour l'ICC.....	16
4.2 La réaction d' ICC.....	17
4.3 Préparation des cellules pour ICC .....	18
4.4 Microscopie.....	18

5. PCR classique et PCR en Temps Réel .....	18
5.1 Isolation d'ARN total et la transcription inverse (classiques).....	19
5.1.1 Isolation d'ARN total et la transcription inverse pour la PCR en Temps Réel .....	19
5.2 L'amplification (classique) d'ADNc.....	20
5.2.1 L'amplification d'ADNc par la méthode de la PCR en Temps Réel.....	20
5.3 Séquençage du produit de PCR.....	21
5.4 Les séquences et les conditions d'amplifications optimales .....	21
6. Western-blot.....	21
6.1 Préparation des échantillons.....	21
6.2 Électrophorèse sur le gel de polyacrilamide et le transfert des protéines .....	23
6.3 Immunodétection des protéines.....	23
7. La culture cellulaire.....	23
7.1 Isolation des cardiomyocytes et des fibroblastes à partir des cœurs des rats nouveaux nés .....	24
7.2 Propagation et différenciation des cellules souches embryonnaires – lignée P19 .....	25
7.3 Protocole de différenciation cellulaire .....	25
8. Analyses statistiques .....	25
CHAPITRE III : DESCRIPTION DES RÉSULTATS.....	26
1. Présence d'ARNm de la vasopressine dans le cœur de rat en maturation.....	26
2. Mesure de la concentration de la vasopressine dans les quatre compartiments du cœur de rat adulte par la méthode de dosage radio immunologique.....	27
2.1 Optimisation des conditions d'extraction et de dosage de la vasopressine .....	27
2.2 Caractérisation immunologique de la vasopressine cardiaque et la standardisation du dosage radio-immunologique.....	28



2.3	Mesure de la concentration de la vasopressine immunoréactive dans les quatre chambres du cœur de rat adulte	29
3.	Quantification de la vasopressine dans le cœur de rat pendant la maturation.....	30
4.	Vasopressine dans le tissu cardiaque, analyse immunocytochimique .....	31
5.	Démonstration de la présence des récepteurs de la vasopressine dans le cœur de rat durant la maturation.....	34
5.1	L'expression et la régulation d'ARNm des récepteurs d'AVP dans le cœur de rat durant la maturation obtenues par analyses RT-PCR .....	35
5.2	L'expression et la régulation protéiques des récepteurs d'AVP dans le cœur de rat durant la maturation obtenues par Western-blot.....	36
5.3	Récepteurs de la vasopressine dans le cœur de rat, démonstration immunocytochimique.....	39
5.4	Présence des récepteurs d'AVP dans les cellules cardiaques démontrée par immunocytochimie.....	40
	CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	46
1.	Identification de la VP.....	47
2.	Rôle possible de la VP dans le cœur en développement.....	47
3.	Rôle possible de la VP dans la différenciation des cellules cardiaques.....	49
4.	Rôle possible de la VP dans les vaisseaux en développement.....	50
5.	Implication du récepteur V1 dans la maturation cardiaque.....	52
6.	Implication du récepteur V2 dans la maturation cardiaque.....	54
	RÉFÉRENCES:.....	57
	ANNEXE 1 : Exemple d'optimisation de l'amplification des gènes.....	63
	ANNEXE 2 : Amplification des gène de la VP-NE-II et 18S par PCR en temps réel .....	64
	ANNEXE 3 : Optimalisation de la méthode d'extraction de la vasopressine.....	65

Tous les tests ont été effectués par deux personnes indépendantes. Le nombre de réplicats pour chaque condition testée variait entre 4 à 6. Les résultats obtenus ont été comparables; seul les résultats de l'auteur sont résumés dans les tableaux. .... 66

ANNEXE 4 : Optimalisation des essais immunocytochimiques ..... 67

ANNEXE 5 : Séquence du produit de PCR du gène V2 dans le coeur de rat ..... 68

ANNEXE 6 : Optimalisation du Western-blot pour récepteurs V1 et V2 ..... 70

ANNEXE 7 : Présence de deux formes moléculaires de V1 dans les cellules cardiaques isolées obtenue par Western-blot..... 71

ANNEXE 8 : Présence des transcrits de V1 et V2 dans les cellules cardiaques..... 72

ANNEXE 9 : Induction de GATA 4 dans les cellules P19 en présence de la vasopressine..... 73

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Les séquences des amorces et les conditions optimales de l'amplification des gènes.....	22
<b>Tableau II :</b> Les résultats de la différence des valeurs correspondant au nombre des cycles nécessaires pour atteindre le seuil d'amplification du gènes de Neurophysine II-VP et de 18S dans les échantillons cardiaques (cœurs 1, 5, 66 jours et cellules isolées) et de l'hypothalamus. (Ct -cycle threshold) .....	27

## Liste des figures

- fig. 1 :** Structure du gène de la vasopressine. Le premier exon comprend : la région noncodante du promoteur en 5', un signal peptide putatif, l'hormone nanopeptidique vasopressine, et NH<sub>2</sub>-terminal, la région variable de la neurophysine II. Le deuxième exon code la région centrale conservée de la neurophysine II, et le dernier exon code la partie terminale COOH de la neurophysine, avec un résidu additionnel d'arginine et une glycoprotéine à la fin..... 2
- fig. 2 :** Comparaison des séquences des acides aminés d'ocytocine et de la vasopressine ..... 3
- fig. 3 :** Différentes dilutions (1:10, 1:20 et 1:40, en duplicata) des extraits auriculaires et ventriculaires ont été mesurées par la méthode radio-immunologique à l'aide d'un anticorps spécifique anti-vasopressine. Les échantillons sont comparés avec la courbe standard de la vasopressine synthétique. Les résultats sont exprimés comme ratio de liaison (en pourcentage) de <sup>125</sup>I-VP en présence (concentrations descendantes) et absence de la VP synthétique ..... 29
- fig. 4 :** La concentration de la vasopressine dans les quatre compartiments de cœur adulte de rat mesurée par la méthode radio-immunologique (RIA) suite à une extraction du peptide sur des billes de verre activées par la chaleur (Vycor). Analyse statistique effectuée à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls.  $n = 4$ ,  $P < 0.001$  entre les oreillettes et les ventricules, et  $P < 0,05$  entre les ventricules gauches et droits, qui montrent que la différence entre des compartiments est significative..... 30
- fig. 5 :** Changements de la concentration de la vasopressine, dans le cœur entier de rat âgé de 1, 5 et 66 (adulte) jours postnataux, mesurée par la méthode de dosage radio-immunologique suite à l'extraction du peptide sur des billes de verre activées par la chaleur (Vycor). Analyse statistique effectuée à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls.  $n = 6$ , (l'essai a été répété 3 fois, chaque échantillon a eu 4 dilutions différentes)  $P < 0,05$  entre les jours 1 et 5, et  $P < 0,001$  entre les jours 5 et 66. .... 31
- fig. 6 :** Démonstration immunocytochimique de la présence de vasopressine dans les oreillettes et ventricules de cœur de rat de 22 jours. L'agrandissement est de 200X. L'anticorps contre VP a été préincubé (aAVP + peptide) ou non préincubé (aAVP +0) avec la VP synthétique. Les flèches indiquent la présence de la VP immunoréactive dans les fibroblastes. Les images ont été obtenues à l'aide de microscope Reichert-Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4. .... 33
- fig. 7 :** Démonstration immunocytochimique de la présence de VP comme détectée par la coloration (indiquée par les flèches) dans la région de la tunique externe des vaisseaux coronaires (A) agrandissement 100X et (A')

- agrandissement 200X. La coloration est aussi obtenue dans la tunique externe (adventitia) de l'aorte (B). La coloration est réduite suite à la préincubation de l'anticorps avec la VP synthétique (B'). En (endothélium), Med (medium) et Adv (adventitia), agrandissement de 200X. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4..... 34
- fig. 8 :** Changements d'expression d'ARNm du récepteur de vasopressine V1 dans le cœur de rat pendant la maturation pour les groupes d'âge de 1, 5 et 66 (adulte) jours, mesurés par la méthode RT- PCR. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls;  $n = 5$ ,  $P < 0,05$  entre les jours 1 et 5 ainsi qu'entre les jours 1 et adulte..... 36
- fig. 9 :** Changements d'expression d'ARNm du récepteur V2 de la vasopressine dans le cœur de rat pendant la maturation pour les groupes d'âge de 1, 5 et 66 jours (adult), mesurés par la méthode RT- PCR. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls.  $n = 7$ ,  $P < 0,01$  entre jour 1 et 5,  $P < 0,05$  entre jour 5 et adulte..... 37
- fig. 10 :** Changements d'expression protéique (en pourcentage) du récepteur V1 vasopressinergique dans le cœur en maturation ( 1, 5 et 66 jours) analysés par Western-blot.  $n = 5$ ,  $P < 0,001$  entre les échantillons cardiaques pour la forme 150 kDa.  $P < 0,005$  et  $P < 0,001$  entre les jours 1 et 5 ainsi que les jours 1 et 66 respectivement. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls..... 38
- fig. 11 :** Changements d'expression protéique du récepteur V2 vasopressinergique dans le cœur en maturation (JP 1, 5 et 66) analysés par Western - blot.  $n = 5$ ,  $P < 0,05$  entre le jour 1 et 5, ainsi que de  $< 0,01$  entre le jour 5 et 66 (adult). Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls..... 39
- fig. 12 :** Démonstration immunocytochimique du récepteur V1 dans les oreillettes en présence (A, 500X) et en absence (B, 500X) de l'anticorps, et dans les ventricules (C, 200X) du cœur de rat de 22 jours. Les flèches noires indiquent la réaction dans les cardiomyocytes qui se caractérisent par les striations et la flèche rouge indique la réaction dans les fibroblastes. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4..... 41
- fig. 13 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V1 dans les ventricules, au niveau des cardiomyocytes (flèche noire) et fibroblastes (flèche rouge) du cœur de rat de 22 jours en présence de l'anticorps (A, 100X), ou en absence de l'anticorps (B, 100X). Une forte réaction dans les cardiomyocytes ventriculaires est présentée en C (agrandissement 550X). Les images ont été obtenues à l'aide de microscop

- Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4..... 42
- fig. 14 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V2 dans les oreillettes (A, 100X) et dans les cardiomyocytes auriculaires de cœur de rat de 22 jours en présence et en absence de l'anticorps (B et C). Les flèches indiquent la réaction positive après l'incubation avec l'anticorps spécifique et négative suite à l'incubation des coupes avec le NRS. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4..... 43
- fig. 15 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V2 dans les ventricules de cœur de rat de 22 jours en présence (A 100X, B 200X) et en absence de l'anticorps (C 200X). La flèche noire indique la réaction dans les cardiomyocytes et la flèche rouge pointe vers les fibroblastes. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4. .... 44
- fig. 16 :** Démonstration immunocytochimique de la présence des récepteurs de vasopressine (V1 en A, V2 en B , agrandissement de 550X) dans les cardiomyocytes isolés de cœurs des rats nouveaux-nés obtenue à l'aide des anticorps polyclonaux (dilutions 1 :500) (Cederlane). La réaction pour le V3 est négative. La réaction en présence de NRS (D) effectuée pour tous les récepteurs a donné des résultats négatifs. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4..... 45
- Le deuxième récepteur étudié pendant l'ontogenèse cardiaque postnatale, V2, s'avère surprenant. Premièrement, il est connu comme un récepteur exclusivement rénal, et la confirmation de son expression dans le cœur était nécessaire. Nous avons identifié le V2 en procédant au séquençage de son produit de PCR cardiaque en même temps que de son produit rénal. Sa localisation topographique montre sa présence dans les ventricules et les oreillettes. La coloration est surtout présente dans les cardiomyocytes, comme c'est le cas du V1, et ce résultat est confirmé par la coloration des cardiomyocytes fraîchement isolés. Récemment, Kaufmann et *al.* ont rapporté la distribution du gène de V2 dans les cellules endothéliales pulmonaires, dans le cœur et le muscle squelettique [68]. Cette distribution indique que nos résultats obtenus pour le récepteur V2 cardiaque chez le rat, pourraient aussi être importants pour les humains..... 54

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

aAVP	anti-arginine vasopressine
ACTH	hormone adrénocorticotrope
ADH	hormone antidiurétique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique cyclique
ANP	peptide natriurétique auriculaire
AMPc	adénosine mono-phosphate cyclique
AQP	aquaporine
ARNm	acide ribonucléique messenger
AVP	arginine vasopressine
bFGF	facteur de base de la croissance des fibroblastes
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BSA	albumine sérique de boeuf
COX	cyclooxygénase
CRF	facteur de la libération de corticotropine
Ct	cycle threshold
DAG	diacylglycérol
DDAVP	1-déamino-8-D-arginine vasopressine/ Desmopressine
dNTP	déoxynucléoside triphosphate
EtBr	bromure d'éthidium
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
E15.5	embryon âgé de 15,5 jours
FBS	sérum foetal bovin
GARG	globuline de chèvre anti-lapin
GMPc	guanosine mono phosphate cyclique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
ICC	immunocytochimie
IP3	inositol- triphosphate
kDa	kiloDaltons
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MLV	muscle lisse vasculaire
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthase
NP	neurophysine
NRS	sérum normal de lapin
OT	ocytocine
OTR	récepteur d'ocytocine
OVLT	<i>organum vasculosum laminae terminalis</i>
PEG	polyéthylèneglycol
PBS	tampon phosphate salin
PIP2	phospho-inositol-diphosphate
PLA2c	phospholipase A2 cytosolique

PLC	phospholipase C
PKC	phosphokinase C
PVDV	polyvinylidène difluorure
PVN	noyaux paraventriculaires
P2	récepteur purinergique
RAS	retrovirus associated sequence
RIA	essai radio-immunologique
RSK	ribosomal S6 kinase
RT-PCR	transcription inverse- réaction de polymérisation en chaîne
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SFO	organe subfornical
SON	noyaux supraoptiques
TBS	tampon tris salin
TFA	trifluoroacetic acid
V1	récepteur de la vasopressine de type 1
V2	récepteur de la vasopressine de type 2
V3	récepteur de la vasopressine de type 3
VP	vasopressine
VP- <sup>125</sup> I	vasopressine couplée à l'isotope d'iode 125
YM471	(Z)-4'-[4,4-difluoro-5-[2-(4-diméthylaminopiperidino)-2-oxoéthylidène]-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépine-1-carbonyl]-2-phénylbenzanilide monohydrochloride



## REMERCIEMENTS:

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Marek Jankowski de m'avoir donné l'opportunité de développer la pensée scientifique, de m'avoir laissé une grande autonomie et m'avoir supporté tout au long des mes études. Avec beaucoup de reconnaissance, je veux remercier Dre Jolanta Gutkowska de m'avoir accueilli dans son laboratoire et surtout de m'avoir encouragé dans mes choix autant académiques que personnels. Je veux aussi souligner ma grande reconnaissance pour Dre Suhayla Mukaddam-Daher qui est toujours prête pour donner les bons conseils, des remarques et des critiques constructives à tous les étudiants. Évidemment, je remercie tous les membres du laboratoire pour toute l'aide et la collaboration obtenues, et plus précisément Catia qui m'avait aidé à démarrer le projet, à Wang qui m'avait introduite dans les secrets de la biologie moléculaire et à Rody qui est devenue une étudiante modèle pour moi. J'ai beaucoup apprécié d'avoir fait mon projet de maîtrise dans ce laboratoire dynamique, rempli de divers projets de recherche et de personnes talentueuses. C'était pour moi une aventure très réussie et enrichissante. Les connaissances et les expériences acquises pendant la période passée dans ce laboratoire me seront grandement profitables pour la suite de ma carrière.

Je veux de tout mon coeur remercier mon mari Michal et mes deux fils Konrad et Alexander de m'avoir fourni la force et le courage nécessaires pour mener à bien ma maîtrise, et surtout pour leur compréhension pour tous les moments que je n'ai pu passer avec eux.

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

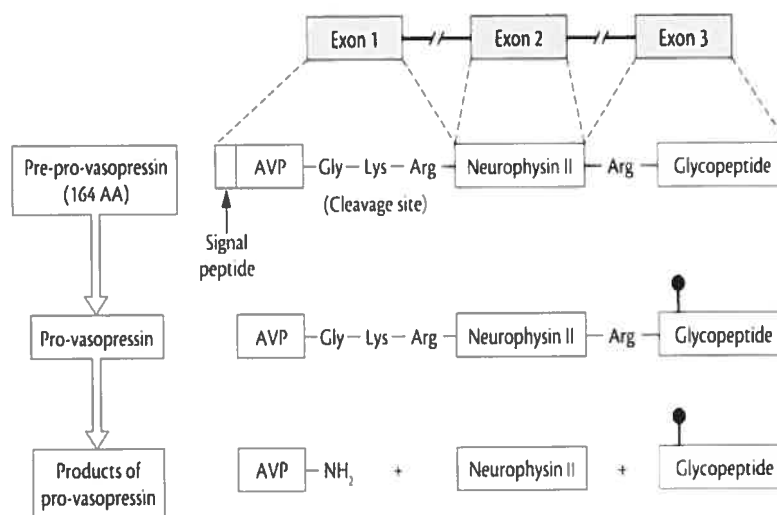
### *1. La vasopressine, l'histoire*

La vasopressine (VP) ou l'arginine vasopressine (AVP), l'hormone antidiurétique (ADH) constitue pour la plupart des mammifères un déterminant majeur lors de l'homéostasie de l'eau. Des nombreux chercheurs se penchent sur ce sujet depuis plusieurs décennies. Déjà en 1947, Verney [1] a proposé l'hypothèse stipulant l'existence des osmorécepteurs. Il a démontré que l'injection d'une solution hypertonique dans les artères carotidiennes d'un chien conscient, provoque une forte antidiurèse [2]. Aujourd'hui, il est reconnu que cette action est médiée par la VP qui est principalement sécrétée en réponse à l'augmentation d'osmolalité plasmatique ou bien en réponse à la diminution du volume plasmatique. En 1955 Du Vigneaud reçoit le prix Nobel pour la découverte et l'élucidation de la structure de la VP et d'ocytocine (OT). La connaissance de la structure chimique de ces deux hormones a ouvert le chemin pour la synthèse et le dessin des analogues en permettant ainsi leur exploitation en recherche et thérapeutique, exploitation qui continue jusqu'à aujourd'hui.

### *2. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles*

La VP partage beaucoup de caractéristiques avec l'OT. Chez les mammifères, la famille VP/OT provient d'une molécule ancestrale commune créée par la duplication du gène il y a environ 450 millions d'années [3]. L'hypophyse postérieure contient alors deux hormones, la VP et l'OT. Les deux sont synthétisées dans l'hypothalamus, plus précisément dans les corps cellulaires de neurones magnocellulaires localisés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Ces hormones contenant neuf acides aminés sont liées à une protéine, nommée neurophysine (NP). Celle-ci est une protéine qui lie spécifiquement les hormones et forme un complexe protéique soit avec VP soit avec OT. Neurophysine I est associée avec l'OT et une glycoprotéine pendant que la NP-II est associée avec la VP et une glycoprotéine spécifique à la VP en formant la molécule précurseur ou pro-VP faisant suite à la pré-pro-hormone après perte du peptide signal.

Le complexe protéique NP-hormone est emballé dans les granules microscopiquement visibles au niveau soma neuronal. Ils sont livrés à partir de neurones magnocellulaires par le transport intracellulaire jusqu'aux terminaisons nerveuses de l'hypophyse postérieure. Le contenu des granules est libéré dans la circulation générale soit à partir des terminaisons qui aboutissent directement sur les cellules endothéliales des capillaires soit sur des cellules qui sont adjointes aux parois des vaisseaux. Le niveau plasmatique normal de VP est très bas (environ 1 pg/ ml) et se situe proche de la limite de détection par l'immunodosage. Chez les humains, la demie vie de VP circulante est d'environ 18 minutes [4, 5].



**fig. 1 :** Structure du gène de la vasopressine. Le premier exon comprend : la région noncodante du promoteur en 5', un signal peptide putatif, l'hormone napeptidique vasopressine, et NH<sub>2</sub>-terminal, la région variable de la neurophysine II. Le deuxième exon code la région centrale conservée de la neurophysine II, et le dernier exon code la partie terminale COOH de la neurophysine, avec un résidu additionnel d'arginine et une glycoprotéine à la fin.

[http://www.nephrohus.org/uz/Na\\_dysnatremies\\_folder/images\\_hyponatremie\\_folder/vasopressin.html](http://www.nephrohus.org/uz/Na_dysnatremies_folder/images_hyponatremie_folder/vasopressin.html)

VP et OT ne sont pas seulement synthétisées et stockées dans les mêmes régions, mais possèdent aussi d'autres caractéristiques en commun. Les séquences d'acides aminés de VP et d'OT ne diffèrent qu'en position trois et huit et les deux hormones présentent un pont disulfure formé entre les cystéines en positions un et six. Ceci

constitue un peptide cyclique avec une partie de trois acides aminés COOH- terminaux qui sont responsables pour plusieurs effets hormonaux [6].

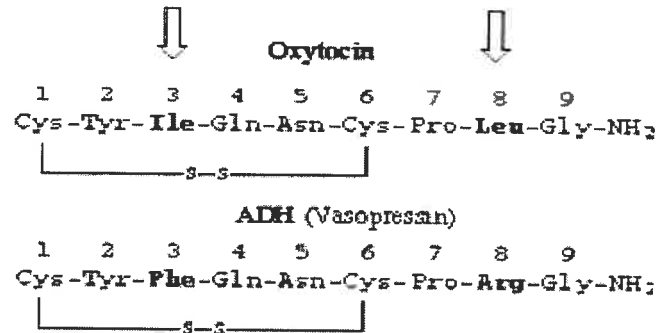


fig. 2 : Comparaison des séquences des acides aminés d'ocytocine et de la vasopressine  
<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/vasopressin.htm>

De plus, l'OT et la VP sont encodées par deux gènes différents qui sont placés sur le même chromosome, à 20p, et séparés par un segment d'ADN long de seulement 12 kilobases [7]. Malgré 80% d'homologie, ces deux hormones divergent dans leurs fonctions physiologiques: la VP est impliquée dans l'homéostasie osmotique et cardiovasculaire pendant que l'OT joue un rôle important dans la lactation, le comportement sexuel ainsi que dans la différenciation des cellules cardiaques [8]. Classiquement, deux fonctions physiologiques majeures sont accordées à la VP : (i) maintien de la pression osmotique et (ii) maintien du volume sanguin.

### 3. La régulation de la relâche de vasopressine

La pression osmotique effective du plasma constitue le stimulus le plus important pour la libération de la VP dans des conditions physiologiques. Une augmentation dans l'osmolalité plasmatique de seulement 1% est suffisante pour libérer rapidement la VP qui à son tour va changer la concentration et le flux urinaire. L'homéostasie de fluides corporels est maintenue par les réponses autonome et autocrine à des comportements spécifiques. La régulation osmotique physiologique la plus importante a lieu dans le système nerveux central. Un petit changement d'osmolalité plasmatique est détecté par le cerveau à l'aide d'osmorécepteurs localisés

dans *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) et dans l'organe subfornical (SFO). L'hyperosmolalité causée par la déshydratation ou par une charge de sel, stimule rapidement la transcription du gène de VP et en concomitance, l'augmentation d'ARNm de VP dans l'hypothalamus [3, 5, 9].

Cette hormone est aussi sécrétée par des changements de la pression et du volume sanguins. Une réduction du volume plasmatique de 5 à 10% a peu d'effets sur la concentration plasmatique de VP pendant qu'une chute du volume de 20% à 30% induit une intense sécrétion de l'hormone et donc une production maximale d'antidurèse. En fait, l'hypovolémie cause l'augmentation rapide d'ARNm dans SON et PVN ainsi que la relâche instantanée de la VP à partir des neurones magnocellulaires qui va agir dans le but d'augmenter la réabsorption d'eau en stimulant la migration des aquaporines 2 (AQP 2) vers la membrane apicale des cellules du tubule collecteur.

La relâche de VP est sous le contrôle des barorécepteurs situés dans le cœur, les grandes veines et les veines cardio-pulmonaires qui signalent la diminution du volume sanguin ainsi que les récepteurs de l'arc aortique et des sinus carotidiens qui signalent des changements dans la pression sanguine artérielle. Une diminution du volume sanguin de même qu'une diminution de la pression artérielle provoquent l'augmentation de l'excitabilité des neurones sécréteurs de la VP en permettant sa libération [2, 4-6, 10-11].

#### **4. Les récepteurs vasopressinergiques**

##### *4.1 Mécanismes d'action des récepteurs de la vasopressine*

L'action de VP est médiée par trois récepteurs membranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils se caractérisent par la présence des sept hélices hydrophobes trans-membranaires liées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires et par un domaine extracellulaire amino-terminal et cytoplasmique carboxy-terminal. Il existe trois différents sous-types des récepteurs de la VP : V1, V2 et V3 qui ont été clonés. Ces récepteurs sont couplés aux différentes protéines G. Les récepteurs V1 et V3 sont couplés à la famille Gq/11, pendant que V2 est couplé à la famille des protéines Gs. La voie classique de Gq/11 est activée par les

hormones mobilisant le calcium. La phospholipase- $\beta$  activée par cette voie transforme le PIP<sub>2</sub> en inositol- triphosphate (IP<sub>3</sub>) qui provoque la relâche de calcium à partir des réserves intracellulaires et en diacylglycérol (DAG) qui recrute la PKC à la membrane et l'active. La PKC est impliquée dans la modification de l'expression génique et de la synthèse protéique transmise par la voie de RAS et des MAP-kinases. D'autres voies sont aussi activées via le récepteur V<sub>1</sub> comme celle de la phospholipase A<sub>2</sub>, phospholipase C, et phospholipase D. Les protéines G<sub>s</sub> activent la voie de l'adénylate cyclase conduisant à l'augmentation d'AMPc qui à son tour active plusieurs voies cellulaires en incluant les canaux ioniques, les facteurs de transcription et les enzymes métaboliques [12-13].

#### 4.2 *Les effets produits par la vasopressine via ses récepteurs*

La famille des récepteurs vasopressinergiques est intéressante puisque ces récepteurs sont liés à des protéines G différentes ce qui produit souvent des effets opposés, par exemple : sur la croissance cellulaire ou la prolifération où V<sub>1</sub> produit des effets mitogéniques pendant que V<sub>2</sub> produit une réponse anti-mitogénique. De plus, l'expression, l'abondance et les réponses menées par ces récepteurs sont spécifiques à leur localisation, ce qui rend le système vasopressinergique plus complexe. Plusieurs chercheurs ont essayé d'étudier la distribution, le fonctionnement et le rôle exact des récepteurs de VP, mais jusqu'au présent, seules la rétention d'eau, la vasoconstriction et la stimulation d'ACTH semblent être claires.

En ce qui concerne la distribution, l'expression de V<sub>1</sub> a été décrite dans les cellules musculaires lisses vasculaires (MLV) et dans le foie, celle de V<sub>2</sub> dans les reins et de V<sub>3</sub> dans l'hypophyse antérieure. Les récepteurs V<sub>1</sub> sont impliqués dans le contrôle de la pression sanguine par la VP. Les récepteurs V<sub>2</sub> sont responsables pour des effets antidiurétiques de la VP. L'expression de ce récepteur a été décrite dans les cellules du tubule collecteur de la médulla principale et interne (au niveau de la membrane luminale et basolatérale). La stimulation d'ACTH est médiée par le récepteur V<sub>3</sub>. De manière générale, chacun des ces récepteurs possède une fonction principale qui lui est accordée, cependant des études récentes portant sur ces trois récepteurs révèlent de nouveaux sites

de leur expression ainsi que de nouveaux rôles possibles de la VP, leur ligand principal [6-7, 12].

#### 4.3 Récepteur V1: description et rôle

Le gène du récepteur V1 est localisé sur le chromosome 12 dans la région 12q 14-15. Le clonage de l'ADNc de 1354 nucléotides codant pour V1 du rat de 394 acides aminés a été rapporté par Morel A. et *al.* [14]. Ce gène possède deux sites de glycosylation N- liée, au niveau du N- terminal et de la boucle extracellulaire. La deuxième boucle intracellulaire du V1 est critique pour l'activation sélective de la protéine Gq/11. Une large distribution de V1 a été démontrée. Ces récepteurs se trouvent en grande densité dans le MLV, dans le cerveau, les testicules, le ganglion supérieur cervical, le foie, les vaisseaux sanguins, la médulla rénale, les plaquettes sanguines, le cortex adrénal, les adipocytes et le cœur [7, 15].

Comme la voie métabolique de V1 mobilise le calcium et que celui-ci est abondamment exprimé dans le muscle lisse vasculaire, le premier rôle qu'on lui attribue est d'induire la vasoconstriction suite à la liaison de VP donc de participer dans le maintien de la pression sanguine et du tonus vasculaire. Les études sur l'effet de VP sur la microvasculature montrent que l'application intraveineuse de VP en doses cliniques ( $0.0001 \text{ IU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) a causé une contraction significative des artérioles, une diminution du débit microvasculaire et de la densité capillaire fonctionnelle [16].

Un grand nombre de recherches se concentrent sur les effets physiologiques de VP via V1 sur le MLV. Un nombre croissant des mécanismes d'action engagés par ce récepteur a été rapporté. Les données montrent qu'en fait, une stimulation aiguë de MLV par VP résulte en une contraction, pendant qu'une exposition à long terme conduit à l'hypertrophie cellulaire. En présence des autres mitogènes, la VP augmente la synthèse d'ADN et la prolifération en agissant comme le facteur de progression. La VP stimule l'augmentation de la synthèse protéique dans les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses. Comme la VP se trouve localement produit dans les vaisseaux, elle a été proposée comme le facteur de croissance pour ces cellules spécifiques. D'autres études suggèrent que la VP est impliquée dans la régulation

d'acide arachidonique et dans la production des eicosanoïdes. L'une des voies du récepteur V1 implique la production de PLA2c qui à son tour stimule la COX pour produire des prostaglandines vasodilatatrices [17, 18].

D'autres études montrent que l'activation du V1 donne une induction immédiate de la réponse rapide d'expression des gènes via la voie de phosphorylation de la tyrosine kinase. Dans les cellules de muscle lisse isolées de l'aorte, cette réponse rapide des gènes résulte en une synthèse protéique ce qui mène à l'augmentation du contenu protéique et à l'hypertrophie cellulaire [19].

#### 4.4 Récepteur V2 : description et rôle

Le gène du récepteur V2 est localisé sur le chromosome X, en position q28. Il possède un seul site de glycosylation N-liée dans la partie extracellulaire amino-terminale. Une séquence courte dans la partie amino-terminale cytoplasmique du V2 est responsable de l'activation sélective de la protéine Gs. Ce récepteur se trouve principalement dans les reins, dans les tubules collecteurs. Comme, la Desmopressine (DDAVP), l'agoniste de V2 cause la libération du facteur de Willebrand ainsi que la vasodilatation. Son expression dans l'endothélium a été aussi postulé, mais aucune liaison spécifique à part dans les reins n'a été encore démontrée [7]. Hirasawa et *al.* a obtenu le signal pour l'ARNm de V2 dans le cerveau du rat nouveau-né qui décroît avec l'âge et qui n'est plus détecté après l'âge de deux semaines [15].

Le rôle principal et seul connu du récepteur V2 est dans l'homéostasie de l'eau. L'action antidiurétique de VP implique l'augmentation de la perméabilité des cellules rénales du tubule collecteur afin de permettre une plus grande réabsorption d'eau de l'urine vers le sang. La VP circulante active le récepteur V2 sur la membrane tubulaire luminale, ce qui mène à l'augmentation d'AMPc intracellulaire et la phosphorylation de la partie COOH terminale du canal à l'eau, l'aquaporine-2 trouvée dans les cellules tubulaires du néphron distal. Le nombre et la distribution des canaux aquaporines sont régulés via le récepteur V2. La VP stimule la synthèse d'ARNm d'aquaporine et régule l'insertion de cette protéine dans la membrane luminale des tubules collecteur par une exocytose rapide vers la membrane plasmique. La présence des aquaporines dans la membrane apicale cause une augmentation de la perméabilité à l'eau en permettant le



mouvement libre d'eau à partir de la lumière du tubule collecteur vers les cellules tubulaires, et ensuite le transport d'eau à travers la membrane basolatérale est facilité par les aquaporines trois et quatre qui y sont exprimées de manière constitutive [6].

#### 4.5 Récepteur V3 : description et rôle

Le récepteur humain V3, connu aussi comme V1b, a été récemment caractérisé. Il est principalement exprimé dans l'hypophyse et il est aussi couplé à la protéine G. Selon Thibonnier et *al.* [20], V3 peut être couplé à la famille de protéines G<sub>q</sub> ou à la combinaison de cette famille avec la famille G<sub>i</sub> ou G<sub>s</sub>, dépendamment de son niveau d'expression. Cette possibilité de différents couplages permet d'activer plusieurs voies de signalisation via différentes protéines G. Son gène est localisé sur la région du chromosome 1q32. Sa séquence compte 424 acides aminés et possède une homologie de 45% avec V1, de 38% avec V2 et 45% avec le récepteur d'ocytocine (OTR) [21, 7].

La distribution tissulaire de V3 a été étudiée par Ventura et *al.* [22] à l'aide de RT-PCR. Le site majeur d'expression du récepteur V3 s'avère être l'hypophyse, mais un faible signal a été aussi observé dans l'hypothalamus, dans le cerveau, la glande surrénale, le pancréas et le colon. La distribution extra-hypophysaire de l'expression de gène V3 a aussi été démontrée par Lolait et *al.* [23]. ARNm de ce récepteur a été détecté dans le thymus, le cœur, les poumons, la rate, les reins, l'utérus et dans les seins.

On sait peu de choses au sujet du rôle exact du V3. Ce récepteur qui se trouve dans l'hypophyse antérieure module la sécrétion d'ACTH à partir des corticotropes. La régulation de la sécrétion d'ACTH est une composante critique dans la réponse au stress. Or, la VP a une action synergique avec CRF dans la libération d'ACTH via V3, ce qui donne à ce récepteur une fonction différente de celle de V1 et de V2 [12].

#### 4.6 Récepteurs purinergiques (P2) et d'ocytocine (OTR)

La VP peut se lier à d'autres récepteurs que vasopressinergiques, notamment aux OTRs et à des récepteurs purinergiques de classe 2. Burbach et *al.* [24] ont étudié le profil pharmacologique de la famille des récepteurs de VP/OT. Il a rapporté que l'OTR possède une affinité égale pour la VP et l'OT, pendant que le récepteur V1 a une affinité

trente fois plus grande pour la VP que pour l'OT. L'OTR est fonctionnellement couplé à la protéine Gq/11 tout comme le V1. Il est impliqué dans la formation de NO qui stimule la guanylate cyclase soluble afin de produire du GMPc qui mène à la vasodilatation. Ce récepteur localisé dans une grande variété des tissus (notamment les tissus reproductifs) a été démontré dans le cœur. L'addition d'OT dans le coeur isolé en perfusion a stimulé la libération d'ANP pendant que l'ajout d'un antagoniste d'OTR a causé l'inhibition de l'ANP de manière dose dépendante. Et, récemment, l'implication du système d'OT cardiaque dans la différenciation cardiaque a été démontrée avec la lignée des cellules souches P19 ainsi qu'avec les cellules souches somatiques de la souris [25-26]. L'interaction de la VP avec les récepteurs purinergiques a été étudiée le cœur isolé perfusé, par Zentano-Savil T. et *al* [27]. L'auteur a démontré qu'une infusion intra-coronaire de la VP provoque la vasoconstriction coronaire, et un effet d'inotropie négative sur le cœur. Ces effets ont été abolis par l'utilisation des antagonistes soit de la VP soit des récepteurs purinergiques.

##### 5. *Expression extra- hypophysaire de la Vasopressine*

Nous avons décrit plusieurs fonctions physiologiques de la VP médiées par ces trois récepteurs. Rappelons qu'à part d'être impliqué dans l'homéostasie des fluides, la VP produit la contraction des artérioles et des capillaires, spécifiquement ceux des vaisseaux coronaires pour produire une augmentation locale de la pression. Il est important de souligner d'autres effets de la VP décrits dans la littérature. Notamment, la stimulation de la glycogénolyse dans le foie, l'implication dans la facilité l'apprentissage, la modulation de la libération de CRF et d'ACTH, l'induction de la maturation des cellules T dans le thymus ainsi que la stimulation de libération du facteur relaxant provenant de l'endothélium de la vasculature cérébrale et coronaire.

La liste d'action de la VP s'allonge et les chercheurs s'en intéressent de plus en plus. Cependant, les niveaux circulants de VP sont trop bas pour suffire à effectuer certaines de ces actions. Cette observation a permis de postuler que la VP pourrait être produite et agir localement au niveau des organes sur lesquels elle a des effets connus. Cette idée a amené alors à chercher d'autres sites que l'hypothalamus de la synthèse de

VP et de ces récepteurs. De plus, le fait que les rats Brattleboro, déficients en VP neurohypophysale ont des niveaux plasmatiques de VP significativement élevés, constitue un autre argument fort pour l'existence des systèmes (peptide et ses récepteurs) indépendants de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, la production de la VP dans plusieurs tissus périphériques a été déjà démontrée, entre autres, dans les glandes surrénales, les ovaires, les testicules et le thymus qui ont localement synthétisés et stockés la VP [28].

Simon et *al.* [29] étaient parmi les premiers à se concentrer sur l'expression de VP extra-pituitaire. Son travail a démontré la présence de VP en grandes quantités dans les vaisseaux sanguins des rats et du bovin. Il a été le premier à doser la VP dans plusieurs lits vasculaires et dans les oreillettes du cœur. Suite à la démonstration que les vaisseaux sanguins contiennent de la VP d'origine locale, il a étudié le rôle de ce peptide local, en examinant ses effets sur la croissance des cellules en culture provenant de l'endothélium et du MLV. Ces études ont démontré que la VP stimule la synthèse protéique sans stimuler la prolifération des cellules vasculaires en indiquant que la VP joue le rôle d'un facteur de croissance [16].

### 5.1 *Les effets de la vasopressine sur le système cardiovasculaire*

Récemment la présence du système vasopressinergique dans le cœur du rat a été démontré par Hupf et *al.* [30]. Ils ont montré la présence d'ARNm et la synthèse *de novo* de VP dans les cœurs normaux âgés de neuf semaines et dans les cœurs exposés à un stress mécanique. Ils ont aussi provoqué la relâche de l'hormone dans l'éluat du cœur isolé suite à l'application d'une pression trop élevée sur le cœur (*wall stress*). De plus, Ils ont trouvé que la VP induite dans le cœur isolé et perfusé, cause des effets directs sur la fonction cardiaque, ce qui résulte en une vasoconstriction coronaire et une relaxation impaire. L'ajout d'un antagoniste du récepteur V1 empêche ces changements en suggérant que ces effets sont produits via V1.

La VP fait présentement l'objet des études principalement dans le domaine de l'insuffisance cardiaque. Les effets cardiovasculaires de la VP et son fonctionnement sont des sujets de débats constants.

Dans le cœur isolé et perfusé, la VP augmente le taux de synthèse protéique. Cette augmentation est due à un mécanisme différent de celui d'AMPc qui est responsable de l'hypertrophie cardiaque induite par une pression trop élevée [31]. Ensuite, l'injection de la VP dans le cœur isolé, produit une diminution de la force contractile, de la fréquence cardiaque ainsi que du débit coronaire. Ces effets sont indépendants de l'endothélium et sont conduits via le récepteur V1 [32].

La VP se montre essentielle pour l'homéostasie cardiovasculaire. Dans les concentrations élevées, la VP cause la vasoconstriction coronaire dose-dépendante et une inotropie négative. Et, au contraire, à des faibles doses cette hormone cause un effet inotrope positif. Cependant, la VP n'a pas d'influence sur la chronotropie cardiaque. Or, les effets directs de la VP sur l'automatisme du myocarde ont été examinés en culture tissulaire. L'ajout de la VP à des doses croissantes (de 10  $\mu$ unités/ml à 10 unités/ml) n'a pas causé de changements de la fréquence des contractions [33, 34].

Le rôle de la VP est également investigué dans le maintien de la pression sanguine lors du choc septique. Dans l'état de choc septique, les niveaux de la VP augmentent de 20 à 200 fois pour produire une vasoconstriction profonde et aider à maintenir la perfusion des organes critiques (les poumons, le foie, les reins, et le cerveau) afin d'empêcher la défaillance de multiples organes. Lors d'un choc prolongé, les niveaux de VP diminuent ce qui contribue à l'hypotension réfractaire [2]. Les essais cliniques montrent que l'administration de VP durant un choc septique permet de rétablir la pression sanguine systémique. De plus, il a été démontré que la VP augmente la pression de la perfusion artérielle et coronaire, et son application est présentement proposée pour l'utilisation lors de l'arrêt cardiaque [34]. Finalement, certaines études montrent que la VP se distingue des autres agents vasoconstricteurs par son action double puisque celle-ci peut provoquer une vasodilatation dans certains lits vasculaires. Le mécanisme proposé responsable de cette vasodilatation est dû à l'activation des récepteurs endothéliaux d'ocytocine qui activent les isoformes endothéliaux de NOS [35].

## 5.2 *Les effets de la vasopressine sur les cellules cardiaques*

Plusieurs travaux portent sur les actions directes de la VP sur les cellules cardiaques. L'ensemble des travaux ne permet pas encore d'accorder un rôle bien défini de VP au niveau cellulaire du cœur.

La contribution significative de la VP dans la pathogénèse de l'hypertension via le récepteur V1 a été rapportée plusieurs fois en étudiant le modèle cellulaire. La stimulation des fibroblastes cardiaques des rats nouveaux-nés avec la VP a démontré une induction de la prolifération cellulaire médiée par ce récepteur, ce qui correspond au phénomène d'hyperplasie. V1 est aussi présent dans les cardiomyocytes et les expériences montrent que la VP provoque l'hypertrophie de ces cellules par la stimulation directe de la synthèse protéique. Ces effets sont induits par la voie de transduction IP3 et par la libération de  $[Ca^{2+}]$  intracellulaire. Par contre, cette activation des récepteurs V1 présents dans les cardiomyocytes néonataux, provoque la mobilisation de calcium intracellulaire provenant d'une source autre que le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie. Cette stimulation est médiée par la voie de PLC et la génèse de IP3. Celle-ci nécessite la présence de magnésium ainsi que de calcium extracellulaire, et elle est indépendante de l'activation de PKC ou de la cyclooxygénase. Selon les auteurs, ce mécanisme indique un rôle distinct de la vasopressine dans les physiologies et maladies cardiaques [36-37]. D'autres études montrent que la VP n'est pas impliquée dans le processus de remodelage ventriculaire. Comme la VP partage certaines propriétés avec l'angiotensine II et l'épinéphrine, deux agents impliqués dans l'insuffisance cardiaque, Chandrashekhar et al. [38] ont évalué le rôle de la VP dans le cœur normal versus post-infarctus. Il a observé que le blocage chronique du récepteur V1 n'a pas atténué le processus de remodelage ventriculaire. Ils ont constaté que la vasopressine ne participe pas dans la progression structurale de l'insuffisance cardiaque.

## ***6. Objectifs et hypothèse***

On connaît peu des choses au sujet de l'expression et du rôle de la VP pendant le développement et la maturation des mammifères. Burbach et al. [3] ont été parmi les rares chercheurs qui se sont intéressés à étudier l'ontogénèse de VP et d'OT dans le

cerveau. Ils ont montré la présence des transcrits d'OT et de VP dans les différents groupes de neurones déjà au jour 15.5 fœtal chez la souris (E15.5).

La distribution du gène et son expression ont été investiguées dans des tissus et conditions différents par plusieurs chercheurs, mais la question du rôle de la VP dans le processus de développement reste encore très ouverte. Dans ce travail nous voulons explorer le système vasopressinergique dans le cœur pendant l'ontogenèse postnatale dans le but d'établir le profil d'expression de la VP et de ses récepteurs.

Les effets de la VP sur la fonction cardiaque sont depuis quelque temps attentivement étudiés. Il a été démontré que dans le cœur, la VP provoque l'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaires. Étant donné que ces deux actions sont cruciales pour la maturation cardiaque, notre hypothèse postule que la VP d'origine cardiaque pourrait participer à ces changements développementaux.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons successivement effectués des analyses sur le cœur de rat démontrant :

- a- la présence d'ARNm de NPII-VP à des différents stades de maturation (jour 1, 5 et 66 postnatal) détectée par RT-PCR en temps réel
- b- la présence et la concentration de la VP immunoréactive obtenues par la méthode de RIA dans les quatre compartiments du cœur de rat adulte
- c- les différences de concentration de VP mesurée dans le cœur entier par RIA aux trois stades de maturation (jour 1, 5 et 66 postnatal)
- d- la localisation tissulaire (cœur de 22 jours) et cellulaire (cardiomyocytes du rat nouveau-né) des récepteurs de VP par immunocytochimie
- e- la différence dans l'expression d'ARNm et protéique de récepteurs de VP obtenues par les techniques de RT-PCR et Western-blot à des différents stades de maturation (jour 1,5 et 66)

## CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. *Animaux*

Toutes les expériences ont été effectuées en accord avec le Guide du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CIPA- CHUM). Des rates gestantes de 21 jours et non- gestantes ont été fournies par les Laboratoires Charles River. Après l'accouchement, les rats âgés de 1, 5 et 66 jours ont été sacrifiés par décapitation. Les cœurs prélevés ont été rapidement disséqués. Les reins, l'aorte et l'hypophyse ont été gardés pour servir à titre de contrôles positifs de nos essais. Tous les tissus ont été congelés soit dans l'azote liquide pour des analyses d'expression de la VP et de ses récepteurs par RIA, RT-PCR et Western-blot, soit dans la solution Tissue-Tek® pour les analyses de la distribution de VP et de ses récepteurs par immunohistochimie. Tous les échantillons ont été conservés à – 80 °C afin de pouvoir les utiliser encore dans l'avenir.

Le choix de groupe d'âge est critique pour l'étude de maturation cardiaque. Or, chez le rat, la période postnatale de 1 à 4 jours correspond à l'étape de l'hyperplasie intense des cardiomyocytes. Le 5<sup>ième</sup> jour postnatal est le début de l'hypertrophie développementale pendant laquelle le volume des cardiomyocytes augmente dramatiquement. Finalement, l'âge adulte représente le cœur entièrement développé et proprement fonctionnel.

### 2. *Essai radioimmunologique*

#### 2.1 *Marquage de la vasopressine*

La VP synthétique (Peninsula Laboratories) a été marquée avec <sup>125</sup>I par la méthode de lactoperoxydase. Brièvement, 10 µg de VP ont été mélangés avec 10 µl d'iode (15 mCi/mg Iodide) en présence du tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) et 10 µl de lactoperoxydase (Sigma) a été ajouté suivi de l'ajout de trois volumes de 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) dans des intervalles de 5 minutes. Suite à cette réaction, le liquide a été injecté dans une colonne du type bondapack C18 (Waters) de HPLC (Waters). Les

fractions de 1 ml ont été cueillies et comptées au compteur gamma (Cobra II, Packard). La fraction de VP marquée a été ensuite évaluée pour déterminer sa capacité de liaison avec l'anticorps spécifique contre la VP. La fraction VP-  $^{125}\text{I}$  a été aliquotée et utilisée pendant 2 mois.

### *2.2 Extraction de la vasopressine et reconstitution des échantillons*

L'extraction de la VP du tissu cardiaque a été effectuée sur des billes de verre (Vycor no. 7930, Corning) précédemment lavées avec l'acétone 60% et activées par la chaleur (500 °C) pendant 1 heure. Les cœurs congelés ont été pulvérisés, placés dans une solution acide (HCl 1N, acide formique 1%, TFA 1%, NaCl 1%) et homogénéisés 3 fois 15 secondes. Un ml d'échantillon a été mélangé avec 1 ml de Vycor® par la rotation pendant 30 minutes à 4 °C. Le Vycor® avec le peptide adsorbé était rincé deux fois avec l'H<sub>2</sub>O nanopure et élué avec l'acétonitrile 60% dans du HCl 0,05 M. Les éluations ont été lyophilisées au SpeedVac® (Savant).

Les échantillons ont été reconstitués dans 250-500 µl de tampon de dosage immunologique (sodium phosphate monobasique 19mM, sodium phosphate dibasique 81 mM, NaCl 50 mM, BSA 1%, Triton 100-X 0,01%).

### *2.3 Rendement d'extraction et contrôle expérimental*

Huit mille cpm de la VP-  $^{125}\text{I}$  ont été ajoutés dans les homogénats ou dans les échantillons extraits. Le rendement d'extraction a été évalué en pourcentage comme quantité de cpm obtenu après l'extraction par rapport à la quantité de cpm ajoutée avant l'extraction. Pour des raisons de contrôle inter-expérimental, une quantité de 30 pg/ml de VP synthétique a été ajoutée dans les échantillons de plasma de rat, conservés à - 80 °C et utilisés en même temps que l'extraction et le dosage des échantillons cardiaques. Les tissus de l'hypophyse ont été homogénéisés pour chaque essai dans la solution acide (HCl 1N, acide formique 1%, TFA 1%, NaCl 1%) et utilisés à titre de contrôle positif.

### *2.4 Dosage de la vasopressine*



Cent  $\mu\text{l}$  de l'échantillon (3-4 dilutions) ou de la VP standard (dilutions consécutives de 125 pg/tube à 0,122 pg/ tube) ont été incubés pendant 24 h à 4 °C avec 100  $\mu\text{l}$  d'anticorps spécifique (dilution de 1: 250 000) pour la VP (don généreux de Dr. Cowley AW. Medical College of Wisconsin). Les tubes témoins et la radioactivité totale ne contiennent pas d'anticorps. Cent  $\mu\text{l}$  de la VP-  $^{125}\text{I}$  (3500 cpm/ 100  $\mu\text{l}$ ) ont été ensuite ajoutés dans tous les tubes. Après une autre incubation de 24 h à 4 °C, la séparation du ligand lié a été effectuée par l'addition de 100  $\mu\text{l}$  de chaque NRS (normal rabbit serum) et GARG (goat anti-rabbit globulin) (dilués 1:50 dans le tampon de dosage) suivie d'une incubation de 2 h à la température de la pièce. Un ml de PEG- 8000 (polyéthylèneglycol) (Sigma) a été ajouté dans chaque tube et les échantillons ont été centrifugés à 3000 rpm (Sorvall RC 3B, Du Pont Instruments) pendant 30 minutes. Les surnageants ont été aspirés et la radioactivité des culots a été mesurée par le compteur gamma (Cobra II, Packard).

### 3. *Mesure des protéines*

Les homogénats obtenus pour le dosage radio-immunologique, les fractions membranaires, tissulaires ou cellulaires, obtenues pour le Western-blot ont été mesurées pour leur contenu en protéines par la méthode de Bradford. La courbe standard a été réalisée avec plusieurs dilutions de BSA (Sigma) allant de 0 à 100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ . La solution de Bradford (Bio-rad) a été diluée 1 : 5 et 2 ml de cette solution ont été ajoutés pour chaque tube contenant 100  $\mu\text{l}$  de standard ou d'échantillon. Les mesures en absorbance ont été prises au spectrophotomètre (Ultrospec 3100, Amersham Bioscience) à 595 nm. Les lectures de dosage protéique ont été calculées et rapportées en mg/ml.

### 4. *Immunocytochimie*

#### 4.1 *Préparation des tissus pour l'ICC*

Les tissus ont été fixés dans une solution de formaldéhyde fraîchement préparée de paraformaldéhyde (paraformaldéhyde 4%, acide picrique 0,01% dans le tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2) après une perfusion cardiaque. Après une déshydratation

dans les séries d'alcools (50% à 100%), les tissus sont éclaircis dans trois bains de xylène et enrobés dans la paraffine liquide. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  ont été confectionnées à l'aide du microtron, puis déparaffinés par l'immersion dans le xylène 3 fois 10 minutes et ensuite réhydratés par une série d'alcools en concentrations décroissantes allant de 100% à 50%.

#### 4.2 *La réaction d' ICC*

Afin d'optimiser la présentation de l'antigène, les coupes ont subi un prétraitement au citrate de sodium. En bref, les coupes dans la solution de tampon citrate (0.1 M, pH = 6.0) ont été chauffées à la température de 90°C pendant 5 minutes et gardées dans la même solution jusqu'au refroidissement à la température ambiante. Après le refroidissement, les coupes ont été rincées à l'eau et l'activité de la peroxydase endogène (pseudoperoxydase) a été bloquée par une incubation de 5 minutes dans la solution à 3% du peroxyde. Les coupes ont été ensuite lavées 3 fois 5 minutes au tampon tris NaCl (NaCl 0,1 M, Tris- HCl 0,5 M, pH 7,6) et les sites non spécifiques bloqués pendant 10 minutes par la solution de blocage (n° du catalogue 008020, Zymed, South San Francisco, CA) pour être ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire (i) anti-rat AVP-V1R (n° catalogue RDI-AVPRV1abr, Cedarlane, Ontario, Canada) fait chez le lapin, dilué 1:200; (ii) anti-rat AVP-V2R produits chez le lapin (n° catalogue RDI-AVPRV1abr Cedarlane) dilué 1:200 et (iii) anti-rat AVP produit chez le lapin a été utilisé en dilution finale 1:7000.

Tous les anticorps ont été dilués dans la solution de blocage (Zymed). La durée d'incubation à 4 °C variait de 2 à 3 jours. Les sites de liaison d'antigène-anticorps ont été révélés par la méthode de biotine-streptavidine (n° de catalogue 95-9999 Histostain-DS, Zymed). En somme, chaque coupe a été incubée pendant 10 minutes avec l'anticorps secondaire biotinylé, rincée au PBS- Tween 0,05% et incubées encore 10 minutes avec un conjugué à la phosphatase alcaline. Après trois rinçages au PBS (tampon phosphate salin), les coupes ont été mises en présence d'un substrat chromogène fourni avec le kit (Zymed). La réaction de coloration était suivie ensuite d'une application du colorant double, dit de l'enforcement.

Le contrôle de l'immunocytochimie comprenait: (i) l'omission de l'anticorps primaire; (ii) le remplacement de l'anticorps primaire par un sérum normal de lapin dilué 1:100 et (iii) le blocage de l'anticorps par son antigène. Notons qu'en raison de la non-disponibilité des antigènes V1 et V2, la dernière condition ne s'appliquait qu'à l'anti-AVP. Pour bloquer celui-ci, l'antigène était incubé en présence de l'AVP synthétique. En résumé, l'anti-rat AVP a été pré-incubé 24 h à 4°C en présence de l'AVP synthétique  $10^{-6}$  M puis utilisé pour l'immunocytochimie.

#### 4.3 *Préparation des cellules pour ICC*

Les cellules cardiaques provenaient de la culture cellulaire mise au point au laboratoire à partir du cœur de rat nouveau-né selon la méthode décrite dans la section 7. Les cellules cardiaques ont étéensemencées sur des lames et laissées en culture pendant 5 jours. Après un lavage au PBS, les cellules sont fixées pendant 45 minutes dans la solution de Zamboni (4% formaldéhyde, 0.02% acide picrique, 0,1M tampon sodium phosphate, pH 7,3, utilisé à la température maximale de 16°C), puis gardées pour des utilisations ultérieures dans PBS-Triton 0,2% à 4°C jusqu'à 3 semaines. Les concentrations d'anticorps, les lames contrôles ainsi que la révélation des réactions ont été préparés et obtenus selon la description présentée ci haut.

#### 4.4 *Microscopie*

Les résultats d'ICC ont été observé au miroscop à l'optique Nomarski à contraste interférentiel (Reicht- Jung, polyvar). Ce système permet d'accentuer les contrastes dus au relief sur la surface de l'échantillon observé et donne l'illusion d'un effet 3D. La prise de photos a été effectuée à l'aide d'une caméra Nikon coolscan 4.

### 5. *PCR classique et PCR en Temps Réel*

L'étude concernant les ARNm des récepteurs de VP permettra d'ouvrir la voie vers l'étude de l'expression protéique. Il sera alors important de vérifier si (i) les ARNm

pour les deux récepteurs sont produits dans le cœur (ii) les ARNm sont traduits en protéines et (iii) l'expression protéique des récepteurs est régulée pendant la maturation

### *5.1 Isolation d'ARN total et la transcription inverse (classiques)*

L'isolation de l'ARN total à partir des tissus ou des cellules a été basée sur la méthode commercialisée de Chomczynski et Sacchi [39]. En bref, suite à l'homogénéisation des tissus ou de la lyse cellulaire dans le Trizol (Invitrogen), les échantillons passent par la séparation des protéines et des ARNs à l'aide de chloroforme et par la précipitation d'ARN avec l'isobutanol pendant 16-24 heures à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le culot, obtenu après la centrifugation à 12 000 g 10 minutes, a été dissout et le contenu en ARN a été mesuré au spectrophotomètre. Ensuite, l'intégrité d'ARN a été vérifiée sur un gel d'agarose dénaturant contenant le formaldéhyde. Les échantillons montrant un ratio d'absorbance de  $A_{260}/A_{280} > 1,6$  et la présence sur le gel de bandes distinctes correspondant au sous unités 18 S et 28 S de l'ARN ribosomal ont été sélectionnés pour PCR. L'ADNc a été synthétisé dans un volume final de 40  $\mu\text{l}$  contenant le tampon primaire, 4  $\mu\text{g}$  d'ARN tissulaire, 4  $\mu\text{l}$  d'amorces d'hexanucléotides (Amersham Pharmacia), et l'enzyme, la transcriptase inverse provenant du virus de myeloblastosis avian (12 unités/  $\mu\text{g}$  d'ARN, Invitrogen). La qualité d'ADNc a été vérifiée sur le gel d'agarose, seuls les longs et propres signaux ayant une migration homogène ont été considérés.

#### *5.1.1 Isolation d'ARN total et la transcription inverse pour la PCR en Temps Réel*

La préparation de l'ARN total à partir des tissus ou cellules est identique à celle décrite ci haut. La transcription d'ARN en ADNc a été effectuée à l'aide du kit (iScript cDNA Synthesis de Bio-Rad). En résumé, 1  $\mu\text{g}$  d'ARN a été mélangé avec 4  $\mu\text{l}$  du mix réactionnel, 1  $\mu\text{l}$  de la transcriptase inverse et complété à un volume total de 20  $\mu\text{l}$  avec de l'eau sans les nucléases. Le mix réactionnel complet a été ensuite incubé pendant 5 min. à  $25^{\circ}\text{C}$ , suivi de 30 min. à  $42^{\circ}\text{C}$  et de 5 min. à  $85^{\circ}\text{C}$

## 5.2 *L'amplification (classique) d'ADNc*

Les conditions optimales d'amplification ont été établies pour chaque paire des amorces en utilisant les tissus venant de reins et d'hypothalamus. Plusieurs températures d'annelement et différents nombres de cycles ont été testés. Les tubes contenant tous les produits d'amplification sauf l'ADNc et les tubes contenant tous les produits d'amplification avec l'échantillon d'ARNm ont servi d'échantillons contrôles pour la qualité des essais d'amplification.

5  $\mu$ l d'ADNc produit ont été ajoutés dans le mélange réactionnel de PCR (50 mM Tris- HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 40 pmol de chaque amorce) et amplifiés avec les amorces spécifiques pour V1R, V2R (Invitrogen) et 18S (Ambion) à l'aide de l'ADN polymérase Taq (2,5 unités, invitrogen) dans la machine de PCR Robocycler Gradient 40 Thermocycler (Stratagene). Huit  $\mu$ l du produit d'amplification ont été ensuite mélangés avec 3  $\mu$ l d'EtBr et déposés sur le gel d'agarose 1% pour migrer à 80 mV pendant 1 heure. L'amplification du gène 18S qui est exprimé dans les cellules de manière constitutive a servi de contrôle pour la réaction de transcription inverse. Pour vérifier la spécificité/ l'identité des échantillons amplifiés, les échantillons provenant des reins et d'hypothalamus ont été amplifiés dans les mêmes conditions et servis de contrôles positifs. Leurs produits ont été déposés sur le gel d'agarose et la co-migration des poids moléculaires obtenus a été comparée au poids moléculaire standard (123bp DNA Ladder, Invitrogen). Les bandes obtenues ont été visualisées et quantifiées à l'aide du système d'analyse Storm 840 Imaging System et du logiciel Image Quant (Version 4.2, Molecular Dynamics).

### 5.2.1 *L'amplification d'ADNc par la méthode de la PCR en Temps Réel*

L'amplification a été effectuée à l'aide des réactifs provenant du kit (SYBR Green Supermix de Bio- Rad). Le mélange réactionnel a été préparé selon les indications du kit : 25  $\mu$ l du supermix ont été mélangés avec 0,5  $\mu$ l de chaque amorce (500 nM) et 2  $\mu$ l d'ADNc d'un échantillon et le mélange a été complété au volume total de 50 ml avec de l'eau stérile. Les résultats d'amplification ont été obtenus à l'aide du logiciel MyIQ de Bio-Rad.

### 5.3 *Séquençage du produit de PCR*

Étant donné que le récepteur V2 de la VP n'a pas été encore identifié dans le cœur, les produits d'amplification pour V2 cardiaque ont été envoyés au service de séquençage (Laboratoire d'immunogénétique, CHUM, Hôpital Notre-Dame). L'appareil de séquençage utilisé était le suivant : Genetic analyser 3100 (Applied Biosystems). Le kit de réactifs pour le séquençage était le Big dye terminator version 3.1. La procédure utilisée était celle décrite dans ce kit.

### 5.4 *Les séquences et les conditions d'amplifications optimales*

Les nombres différents des cycles ont été effectués dans le but d'établir la phase exponentielle de l'amplification par PCR et de choisir des points de la courbe dont la technique se distingue par un caractère semi-quantitatif. Le tableau I résume les séquences des amorces ainsi que les conditions utilisées pour l'amplification des gènes.

## 6. *Western-blot*

### 6.1 *Préparation des échantillons*

Deux conditions d'homogénéisation ont été testées sur des échantillons de reins : avec et sans le cocktail des inhibiteurs de protéases à une concentration finale de 1:200 (Sigma, no. P 8340). Les tissus des cœurs ont été pulvérisés et homogénéisés dans 8 volumes de tampon sucrose (250 mM, Hepes/ Tris 20 mM, pH 7,4, contenant ou non le cocktail des inhibiteurs des protéases). Les échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 5000 rpm (Beckman, model J6-B) à 4°C, le surnageant ont été repris et recentrifugés pendant 30 minutes à 16500 rpm à 4°C. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 50-250 µl de tampon sucrose, dosés pour le contenu en protéines par la méthode de Bradford et conservés à - 80° C. Les cellules (cardiomyocytes ou fibroblastes) ont été rincés au PBS froid, grattées, récoltées et centrifugées à 1000 x g 1 minute. Le surnageant a été mélangé avec les inhibiteurs des protéases (Sigma) (dilution finale

1:200) et avec 500  $\mu$ l / pétri 100 mm de solution de lyse cellulaire RIPA ( NaCl150 mM, Tris , pH 7,6, Nonidet P-40 1 %, déoxycholate 0,5%, SDS 0,1%) et incubés pendant 30 minutes en vortexant à toutes les cinq minutes. Les tubes ont été finalement centrifugés à 12000 x g (10 000 rpm, Baxter Biofuge 13) pendant 10 min à 4°C et le surnageant a été dosé pour la concentration protéique et gardé à -80°.

**Tableau I :** Les séquences des amorces et les conditions optimales de l'amplification des gènes.

Gène	Séquences des amorces	Temp. annelation (° C)	Nb. cycles	Source
VIR F	5'ATGCTGGTGGTGATGACAGCCGACCGCTAC3' correspond aux bases 667-696 de la séquence clonée	61	31	Morel et al. [13] 534 pb
VIR R	5'CATCTGGACAATGAAGAAAGGCGCCCAGCA3' correspond aux bases 1171- 1200 de la séquence clonée			
V2R F	5'ATGGTGGGCATGTATGCCTCCTCCTACATG3' correspond aux bases 399-427 de la séquence	61	31	Park et al. [40] 461 pb
V2R R	5'AGTGTCATCCTCACGGTCTTGGCC3' correspond aux bases 835- 859			
VP-NP-II R	5'ATCCGACATGGAGCTGAGACA3' correspond aux bases 131-152 (exon 1)	62	40	Méchalay et al. [41] 387 pb
VP-NP-II F	5'GCAGAATCCACGGACTCTTGT3' correspond aux bases 487-508 (exon 3)			
VP R	5'GCTACTCCAGAACTGCC 3' correspond aux bases 91-108 (exon 1)	54	35	Hupf et al. [30] 275 pb
VP F	5' GCTACTCTCGACGCACCG 3' correspond aux bases 350-367 (exon 3)			
GATA4	5'CTGTCATCTCACTATGGGCA 3'	60	30	Matsuura et al. [26] 275 pb
GATA4	5' CCAAGTCCGAGCAGGAATTT 3'			

### 6.2 *Électrophorèse sur le gel de polyacrilamide et le transfert des protéines*

25 ou 50 µg des protéines pour chaque échantillon du tissu cardiaque, rénal ou de la préparation cellulaire ont été dénaturés par la chaleur dans un tampon dénaturant de Laemmli (1970) ( Tris- HCl 0,06M, pH 6,8, SDS 2%, Glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,002%). Les échantillons et le standard de poids moléculaire (Rainbow, Amersham) ont été ensuite déposés sur le gel de polyacrylamide 10% et la migration a été effectuée à 125 volts pendant 2 heures sur le système Mini protéine II (Bio Rad).

Les protéines séparées ont été ensuite transférées à partir du gel sur la membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) précédemment activée par les lavages consécutifs dans le méthanol, l'eau nanopure et le tampon de transfert (glycine 96 mM, Tris 10 mM et méthanol 10%). Le transfert a été effectué à 4°C durant la nuit à 30 mA.

### 6.3 *Immunodétection des protéines*

Suite au transfert, les membranes PVDF ont été incubées dans le lait écrémé 5% dissout dans le tampon TBS-Tween 1% (NaCl 150 mM, Tris 20mM, pH 7,5) pendant 1 heure. Les membranes ont été ensuite lavées dans du TBS et incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire (rabbit anti-rat AVP- V1R ou rabbit anti- rat AVP- V2R (Cedarlane) dilués 1 : 2000 dans du TBS- Tween 0,1%, BSA 3%). Une deuxième incubation avec l'anticorps secondaire (1 :5000) anti-IgG du lapin produit chez le chèvre et couplé à la peroxydase a été effectuée pendant 2 heures à la température de la pièce. Le signal de la réaction Antigène-Anticorps a été révélé en appliquant la solution de chemiluminescence (ECL, Amersham) sur des membranes pendant 5 minutes. Les résultats ont été visualisés après l'exposition des membranes contre un film (High performance chimoluminescence film, Amersham Bioscience), analysées à l'aide du logiciel Scion et vérifiées par les mesures dans le programme Photoshop.

## 7. *La culture cellulaire*



### *7.1 Isolation des cardiomyocytes et des fibroblastes à partir des cœurs des rats nouveaux nés*

L'isolation des cellules a été effectuée en utilisant le kit de Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical Corporation) décrit pour une portée. Toutes les étapes ont été effectuées dans des conditions stériles. Les rats nouveaux-nés de 3-4 jours ont été sacrifiés (sous la hotte) par décapitation et leurs corps ont été rincés dans l'éthanol 95%. Les cœurs entiers ou disséqués en ventricules et oreillettes ont été rincés dans la solution saline (Hank's), hachés finement et incubés dans 10 ml de milieu Hank's contenant 500 µg de trypsine (code TRLS, Worthington) pendant la nuit à 4°C

Le lendemain, la réaction de la trypsine a été arrêtée par l'ajout de son inhibiteur provenant de soya (code SI, Worthington) et l'incubation du tissu pendant 15 minutes dans le bain-marie. La digestion de l'organe a été poursuivie avec l'ajout de 5 ml de milieu Leibovitz L-15 contenant 1500 unités de collagénase (code CLSPA, Worthington) et l'incubation pendant 45 minutes à 37 °C à 3- 4 rpm (incubateur Cellstar). Les tissus digérés ont été ensuite titrés pour une meilleure dispersion de cellules à l'aide d'une pipette de 10 ml jusqu'à l'obtention d'une substance homogène. La suspension cellulaire a été ensuite filtrée sur un filtre de 70 µm et laissée reposée pendant 20 min. pour permettre une digestion complète du collagène. Après cette étape, la suspension cellulaire a été versée dans un pétri de 10 cm et mise dans l'incubateur pendant 45 minutes à 10% de CO<sub>2</sub> afin de permettre la séparation des fibroblastes par l'adhésion, cette étape a été répétée 2 fois pour obtenir une meilleure purification des deux populations cellulaires. Les cardiomyocytes ont été récoltés dans un tube, sédimentés à 50-100 x g pendant 5 minutes, comptés à l'hémacytomètre et 125 000 cellules / cm<sup>2</sup> ont étéensemencées (soit dans des pétris, soit sur des lames microscopiques) dans un milieu de croissance DMEM- F12 (Gibco) contenant FBS 10% (Gibco) et pénicilline/streptomycine 1%. (Gibco). Les cardiomyocytes ont été laissés pour 48 heures avant d'effectuer les expériences. Les fibroblastes ont été laissés croître pendant 2 semaines dans un milieu DMEM, FBS 10%, pénicilline/ streptomycine 1%.

## 7.2 *Propagation et différenciation des cellules souches embryonnaires – lignée P19*

Les cellules P19 ont été cultivées et différenciées selon le protocole de Rudnicki et McBurney. En bref, les cellules non différenciées ont été propagées dans le milieu  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -modified Eagle's medium, GIBCO-BRL Burlington, ON, Canada) contenant 2,5% de FBS, 7,5 % DBS (Cansera International, Rexdale, ON, Canada) et des antibiotiques (GIBCO/BRL) penicilline G (50 unités/ml) et streptomycine (50  $\mu$ g/ml). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub> et passées à tous les 2 jours [42].

## 7.3 *Protocole de différenciation cellulaire*

0,25  $\times 10^6$  cellules ont été laissées s'aggréger pendant 4 jours dans les boîtes de Petri bactériologiques, nonadhésives (6-cm de diamètre) contenant 5 ml du milieu complet en présence ou absence de OT ( $10^{-6}$  M) ou VP ( $10^{-6}$  M). Au jour 4 les agrégats (les corps embryonnaires) ont été transférées dans les boîtes de Petri (10 cm) ou dans les plaques de 24 puits adaptées pour la culture cellulaire et cultivés dans le milieu de culture complet en absence d'un agent. Les populations cellulaires ont été analysées dans la période du jour 10 à 14 du protocole de différenciation. Le jour 14 correspond normalement au moment d'observation des battements synchronisés des cardiomyocytes.

## 8. *Analyses statistiques*

Le nombre d'échantillons (n) pour chaque essai a été déterminé de façon suivante : 5 rattes gestantes ont été sacrifiées, chacune ayant une portée de 10 à 18 rats. Les sujets provenant de différentes mères ont été divisé en trois groupes pour obtenir chaque groupe d'âge (jour 1, 5 et 66). Chaque groupe d'âge a été ensuite divisé en groupes de 4 sujets pour chaque essai de RIA, RT-PCR, Western-blot et de 2 pour l'immunocytochimie. Les sacrifices ont été effectué 2 fois, pour donner le nombre de sujets de 8 pour chaque essai et pour les trois groupes d'âges. Le logiciel PRIZM,

version 3, a été appliqué pour tous les analyses statistiques. Suite aux analyses, certains échantillons ont été rejeté et le nombre des échantillons final n'était pas égal. La distribution des moyennes par groupe a été considérée comme normale avec des variances égales. Nous avons employé le test d'analyse de variance (one way) pour des groupes indépendantes avec F-test comme test statistique et avec  $k-1$  (entre les groupes) et  $N-k$  (dans le même groupe) comme le degré de liberté. Une faible valeur de  $p$  (région de rejet) pour ce test indique une évidence de rejet de la hypothèse nulle en faveur de l'alternative. Puisque la rejection de la hypothèse nulle n'indique pas spécifiquement les quelles des moyennes sont différentes, le test de comparaison multiple a été appliqué avec le choix de procédure de Newman-Keuls. Ce test permet de comparer les moyennes de tous les groupes et de déterminer si leur différence est significative. Les valeurs obtenues correspondent à des valeurs moyennes avec l'erreur standard. Les figures correspondant à des résultats obtenus sont incluses directement du logiciel PRIZM et constituent la meilleure représentation graphique des calculs statistiques, sans aucune déformation et avec tous les paramètres obtenus des analyses.

## CHAPITRE III : DESCRIPTION DES RÉSULTATS

### *1. Présence d'ARNm de la vasopressine dans le cœur de rat en maturation*

Avant de quantifier la VP immunoréactive dans le cœur pendant la maturation, il a été important de vérifier si son ARNm était exprimé dans le cœur. Sachant que l'ARNm de VP cardiaque a été précédemment démontré dans des conditions de stress mécanique sur la paroi cardiaque [30], l'intérêt principal de cette étude était de vérifier si le gène de VP est aussi exprimé dans les conditions physiologiques. Les conditions d'amplification d'ARNm ont été établies à l'aide des échantillons de l'hypothalamus- le site principal de la synthèse de VP (annexe 1A). Cependant, les analyses par RT-PCR classique n'ont pas permis de détecter l'ARNm de VP dans les cœurs postnataux (jours 1, 5 et 66). Récemment, la détection du gène précurseur de VP, NPII-VP, dans le cœur s'est avéré possible, par la nouvelle méthode disponible de la PCR en temps réel. L'expression du gène précurseur de VP a été détectée dans l'hypothalamus, les cœurs à l'âge de 1, 5 jours et adulte ainsi que dans les cellules cardiaques (cardiomyocytes et fibroblastes). Le tableau II résume les résultats d'amplification (annexe 2) représentant le cycle auquel le seuil de la détection du signal correspondant au premier produit (amplicon) est atteint (Ct). La plus petite valeur de Ct, 9,51 cycles est obtenue pour l'hypothalamus ce qui prouve la plus grande abondance d'ARNm dans ce tissu. L'amplification des échantillons cardiaques montre un profil similaire avec des valeurs approchées pour le seuil de détection (22,57 pour cœur adulte, 24 pour cœur de 5 jours et 23,34 pour cœur de 1 jours). Le seuil de détection d'amplicon dans l'échantillon des cellules correspond au 28,72 cycles. Les produits du point de fusion pour des échantillons cardiaques et l'hypothalamus correspondent à un seul pic. Ceci démontre l'obtention d'un seul produit d'amplification ainsi que l'obtention d'un produit cardiaque identique au produit hypothalamique. En conclusion, ces résultats montrent que la détection de la présence d'ARNm cardiaque de VP n'est pas possible par la méthode de RT-PCR. Cependant, la présence d'ARNm de NPII-VP au niveau cardiaque a été détectée par PCR en temps réel et il est possiblement semblable à celui de l'hypothalamus. Par contre, il n'y a pas de différences au niveau d'expression d'ARNm de VP détectées pendant la maturation.

**Tableau II :** Les résultats de la différence des valeurs correspondant au nombre des cycles nécessaires pour atteindre le seuil d'amplification du gènes de Neurophysine II-VP et de 18S dans les échantillons cardiaques (cœurs 1, 5, 66 jours et cellules isolées) et de l'hypothalamus. (Ct -cycle threshold)

Ct VP- Ct 18S	
hypothalamus	9.51
cœur adulte	22.57
cœur 5 jours	24
cœur 1 jour	23.34
cellules cardiaques	28.72

## ***2. Mesure de la concentration de la vasopressine dans les quatre compartiments du cœur de rat adulte par la méthode de dosage radio immunologique***

Par dosage RIA nous avons procédé à la détection et à la quantification de l'hormone immunoréactive dans le cœur de rat adulte disséqué en oreillettes et ventricules gauches et droits. Ensuite nous avons effectué une étude concernant la production de VP cardiaque pendant la maturation. Avant de prendre ses mesures, les conditions d'extraction de la vasopressine cardiaque ont été optimisées et la standardisation de l'essai a été établie au cours de longs essais préliminaires.

### ***2.1 Optimisation des conditions d'extraction et de dosage de la vasopressine***

En premier lieu, la méthode d'extraction sur billes de verre (Vycor) activées par la chaleur a été comparée à la méthode d'extraction sur la colonne octadecylsilica (C<sub>18</sub>) (Sep-Pak) en présence et en absence de L-Cystéine, une molécule qui stabilise le pont disulfure dans la structure de la VP. Une quantité de 8000 cpm de la VP- I<sup>125</sup> a été ajoutée dans les homogénats pour permettre de vérifier le pourcentage de rendement suite à l'extraction. La méthode par Sep-Pak a donné des meilleurs résultats de rendement et s'avère plus efficace que la méthode par Vycor (un rendement jusqu'à 41% pour le Sep-Pak par rapport à 20 % pour le Vycor, - annexe 3, tableau I). En deuxième lieu, pour des raisons économiques, nous

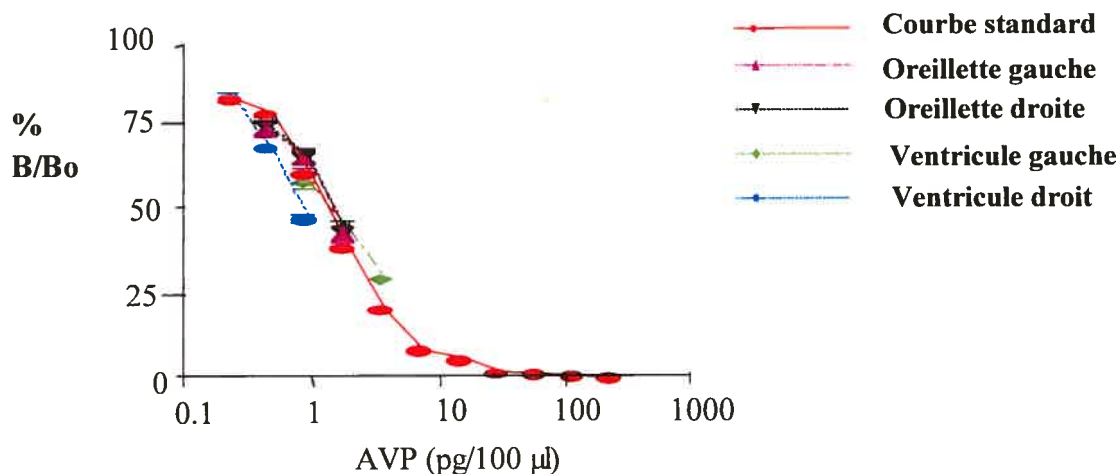
avons amélioré la méthode d'extraction par Vycor et cette méthode était utilisée ultérieurement. Plusieurs paramètres jouant sur le taux de rendement ont été testés, mesurés et présentés dans l'annexe 3, tableaux II et III. Les résultats obtenus montrent que le pH acide d'homogénat, le volume de Vycor utilisé ainsi que la température et le temps d'incubation des homogénats avec les billes influencent la liaison du peptide avec les billes de verre et le rendement d'extraction. Dans cette expérience, le recouvrement optimal de  $^{125}\text{I}$ -VP de 68% a été obtenu pour une extraction d'homogénat acide (pH 3) pendant 30 minutes à la température de 4°C en absence de L- cystéine et en utilisant 1 ml de Vycor.

Suite à l'extraction du peptide d'intérêt, le pH d'éluat était légèrement acide (pH d'environ 6). Il était alors important de vérifier l'influence du pH acide versus le pH physiologique sur la liaison d'antigène avec l'anticorps contre vasopressine (annexe 3, tableau 4). Ces tests ont démontré que la liaison d'antigène- anticorps n'a pas été affectée par les pH des éluats variant de 6 à 7,4.

## *2.2 Caractérisation immunologique de la vasopressine cardiaque et la standardisation du dosage radio-immunologique*

La nature de VP immunoréactive a été évaluée par la compétition de la liaison des extraits tissulaires ou de VP synthétique avec la VP marquée, à l'anticorps spécifique de la vasopressine. Différentes dilutions (1 :10, 1 :20 et 1 :40) des échantillons provenant des quatre compartiments cardiaques ont été dosés. L'addition de l'AVP synthétique à des concentrations croissantes a produit une plus grande compétition, comme le reflète la diminution dans  $B/B_0$  qui correspond à la fraction de la liaison maximale. L'augmentation similaire des volumes d'extraits a produit des courbes de compétition parallèles à celle de la VP synthétique. Le parallélisme existant entre la courbe standard et les différentes dilutions des échantillons (fig. 3) démontre que l'essai n'est pas affecté par l'interaction de l'anticorps anti-VP avec d'autres antigènes contaminants potentiels et que la spécificité de la méthode utilisée est haute. La inter-réactivité de l'anticorps avec l'OT et la vasotocine étant de  $< 1\%$  a été précédemment testée au laboratoire [43]. La sensibilité de l'essai était de 0,2 pg/tube et la linéarité de la courbe était obtenue entre 0,275 à 250 pg/100 $\mu\text{l}$ . L'utilisation des aliquots des échantillons de l'hypophyse, qui est le site de storage de VP, a servi comme un contrôle positif de l'essai et a permis de calculer la variation intra- expérimentale qui était de 5%. Le

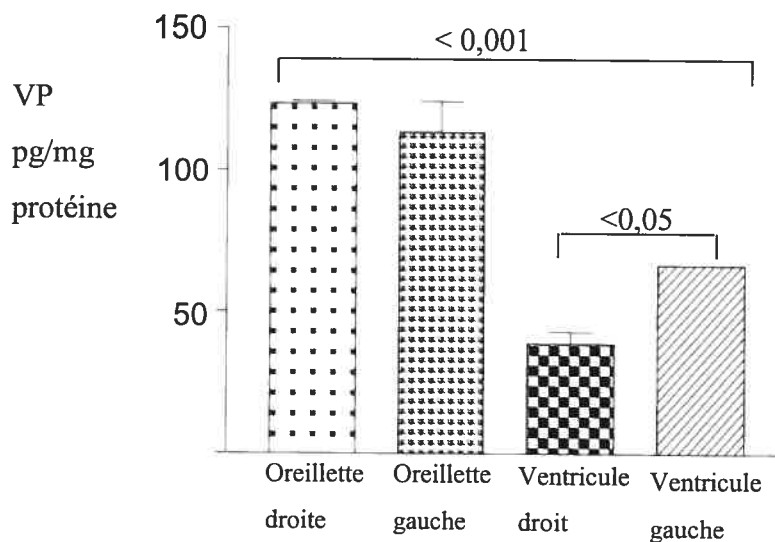
coefficient de variation inter-expérimentale de 35% a été obtenu en utilisant des échantillons de plasma de rat aliquotés contenant 30 pg de VP synthétique (une quantité située au milieu de la courbe standard).



**fig. 3 :** Différentes dilutions (1:10, 1:20 et 1:40, en duplicata) des extraits auriculaires et ventriculaires ont été mesurées par la méthode radio-immunologique à l'aide d'un anticorps spécifique anti-vasopressine. Les échantillons sont comparés avec la courbe standard de la vasopressine synthétique. Les résultats sont exprimés comme ratio de liaison (en pourcentage) de  $^{125}\text{I}$ -VP en présence (concentrations descendantes) et absence de la VP synthétique.

### 2.3 Mesure de la concentration de la vasopressine immunoréactive dans les quatre chambres du cœur de rat adulte

La VP immunoréactive a été détectée et mesurée dans tous les quatre compartiments du cœur de rat adulte (fig.4). La concentration de la VP calculée en pg/mg des protéines est significativement ( $p < 0,001$ ) plus grande dans les oreillettes ( $123 \pm 0.92$  pour l'oreillette droite et  $114 \pm 11$  pour l'oreillette gauche) que dans les ventricules ( $38.7 \pm 4.18$  pour le ventricule droit et  $66.7 \pm 0.1$  pour le ventricule gauche). De plus, la concentration de la VP dans le ventricule droit est significativement ( $p < 0,05$ ) plus basse que dans le ventricule gauche.



**fig. 4 :** La concentration de la vasopressine dans les quatre compartiments de cœur adulte de rat mesurée par la méthode radio-immunologique (RIA) suite à une extraction du peptide sur des billes de verre activées par la chaleur (Vycor). Analyse statistique effectuée à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls.  $n = 4$ ,  $P < 0,001$  entre les oreillettes et les ventricules, et  $P < 0,05$  entre les ventricules gauches et droits, qui montrent que la différence entre des compartiments est significative.

En conclusion, chez le rat adulte, la concentration VP est plus abondante dans les oreillettes que dans les ventricules et la concentration de VP dans le ventricule gauche est plus grande que dans le ventricule droit.

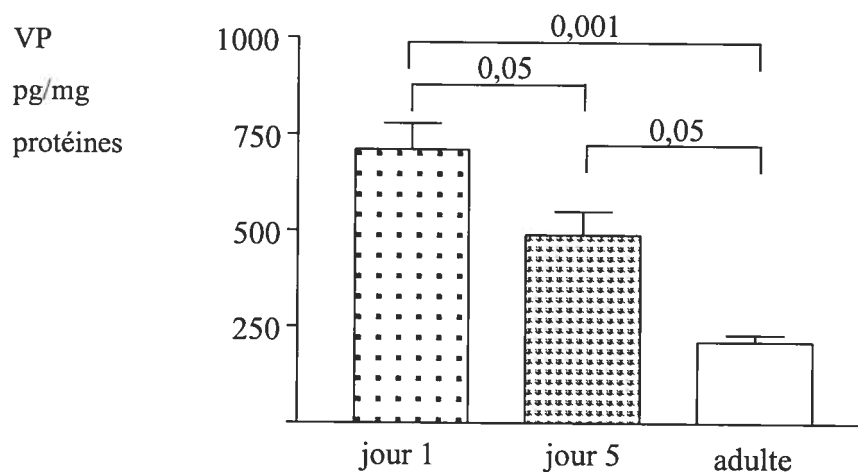
### 3. *Quantification de la vasopressine dans le cœur de rat pendant la maturation*

Comme la VP hypothalamique est régulée pendant le développement, où son niveau d'expression augmente pendant la croissance, nous avons investigué si et comment la VP cardiaque serait régulée pendant la maturation. Pour cette raison, suite à la démonstration de la VP cardiaque, nous avons procédé à la mesure de sa concentration dans les cœurs entiers âgés de 1, 5 et 66 jours postnataux.

La mesure de la concentration de VP cardiaque pendant la maturation, prise par la méthode RIA, est présentée dans la figure 5. Sa concentration dans le cœur entier, exprimée en pg/mg des protéines, diminue significativement entre les jours 1 et 66 postnataux ( $711 \pm 67$  pour jour 1,  $489 \pm 61$  pour jour 5 et  $213 \pm 18$  pour cœur adulte). Cette répartition



temporelle, de la VP cardiaque nous a donné une première piste dans l'investigation de sa participation potentielle dans la maturation du cœur.



**fig. 5 :** Changements de la concentration de la vasopressine, dans le cœur entier de rat âgé de 1, 5 et 66 (adulte) jours postnataux, mesurée par la méthode de dosage radio-immunologique suite à l'extraction du peptide sur des billes de verre activées par la chaleur (Vycor). Analyse statistique effectuée à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls.  $n = 6$ , (l'essai a été répété 3 fois, chaque échantillon a eu 4 dilutions différentes)  $P < 0,05$  entre les jours 1 et 5, et  $P < 0,001$  entre les jours 5 et 66.

En conclusion, il y a une diminution de la concentration de VP dans le cœur entier pendant la maturation.

#### 4. Vasopressine dans le tissu cardiaque, analyse immunocytochimique

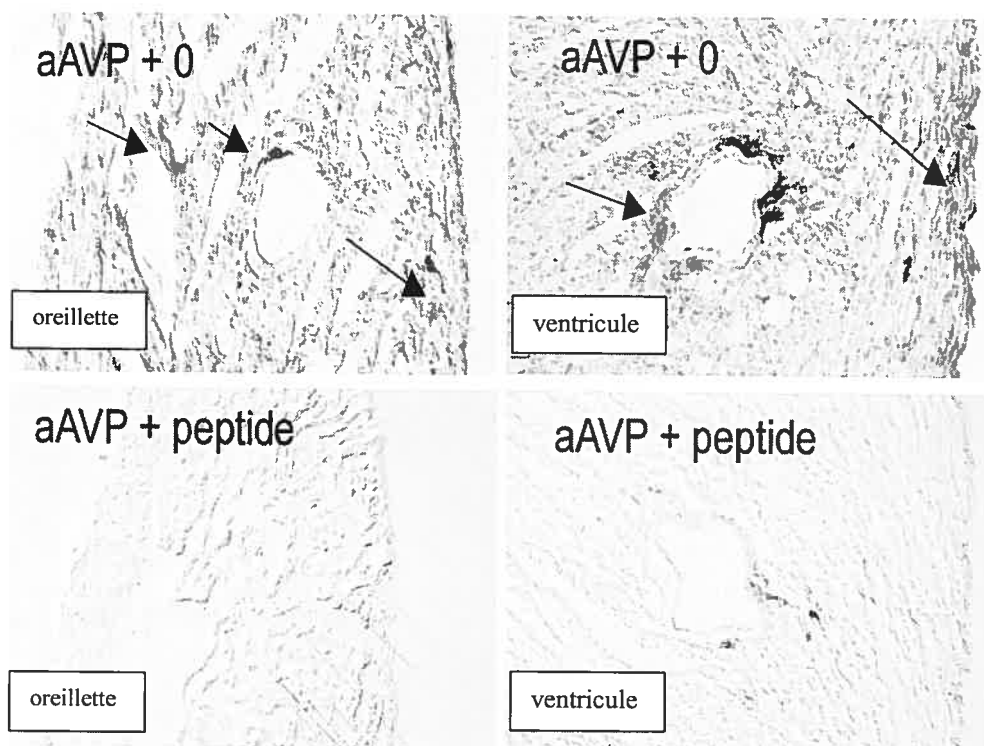
L'analyse immunocytochimique a confirmé la présence de l'immunoréactivité de la VP dans le cœur. De plus, l'observation microscopique a fourni l'information topographique sur la distribution de la VP cardiaque (Figures 6, 7).

Nos premières tentatives de la localisation des récepteurs de la VP se sont montrées vaines. Cependant, la présence des récepteurs de la VP a été suggérée par des méthodes de dosages de l'antigène et par des analyses de l'ARN messager. Il y avait donc des bonnes raisons pour entreprendre l'étude de la localisation de ces récepteurs, malgré des difficultés techniques rencontrées au passage. La connaissance de la localisation cellulaire des sites de

récepteurs est une condition essentielle pour la compréhension du rôle de la VP dans la physiologie cardiaque. Intéressés par le défi, nous nous sommes interrogés sur la façon de procéder. Nous avons donné à cette investigation deux directions: une direction biologique (déterminer le moment dans le développement cardiaque le plus favorable à l'essai immunocytochimique) et une direction technique (déterminer les paramètres de la fixation et du démasquage de l'antigène).

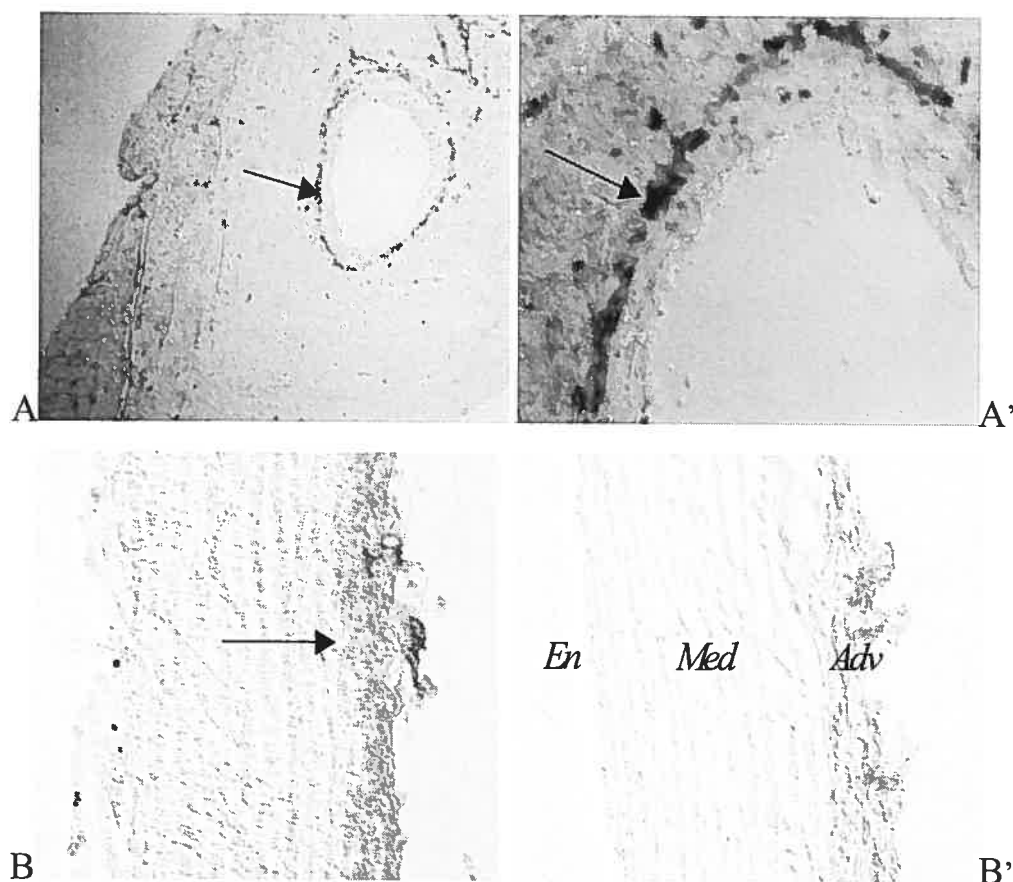
Rappelons que les coupes choisies pour l'immunocytochimie comprenaient le cœur de nouveaux-nés (jours 6, 12 et 22) et adulte (66 jours). Nos résultats ont démontré que le matériel biologique le plus favorable à l'étude provenait du rat âgé de 22 jours. La fixation histologique se montrait également importante, dans la mesure où seul le tissu perfusé au formaldéhyde répondait positivement à nos critères de sensibilité et de spécificité de l'immunocytochimie. De plus, l'ajout de l'étape du démasquage de sites antigéniques par échauffement au tampon citrate se montrait d'utilité incontestable.

Les premiers essais sur des coupes de cerveau ont permis d'établir les conditions optimales pour la liaison de l'anticorps contre la VP avec son antigène (annexe 4). La VP a été localisée dans les fibroblastes des régions auriculaire et ventriculaire, du cœur (fig. 6). La réaction observée est plus forte dans le ventricule. La spécificité de la réaction pour tous les échantillons a été démontrée suite à la préincubation de l'anticorps contre la VP avec la VP synthétique. L'adsorption de l'anticorps empêche la coloration des tissus cardiaques.



**fig. 6 :** Démonstration immunocytochimique de la présence de vasopressine dans les oreillettes et ventricules de cœur de rat de 22 jours. L'agrandissement est de 200X. L'anticorps contre VP a été préincubé (aAVP + peptide) ou non préincubé (aAVP +0) avec la VP synthétique. Les flèches indiquent la présence de la VP immunoréactive dans les fibroblastes. Les images ont été obtenues à l'aide de microscope Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4.

De plus, une forte coloration a été obtenue dans la tunique externe (adventice) des vaisseaux coronaires et de l'aorte (fig. 7). La spécificité de la réaction a aussi été démontrée suite à la préincubation de l'anticorps contre la VP avec la VP synthétique.



**fig. 7** : Démonstration immunocytochimique de la présence de VP comme détectée par la coloration (indiquée par les flèches) dans la région de la tunique externe des vaisseaux coronaires (A) agrandissement 100X et (A') agrandissement 200X. La coloration est aussi obtenue dans la tunique externe (adventitia) de l'aorte (B). La coloration est réduite suite à la préincubation de l'anticorps avec la VP synthétique (B'). En (endothélium), Med (medium) et Adv (adventitia), agrandissement de 200X. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4

En Conclusion, dans le cœur de rat de 22 jours, la VP est plus présente dans les fibroblastes du ventricule que d'oreillette. De plus, la VP est présente dans l'adventice des vaisseaux coronaires et de l'aorte.

##### 5. *Démonstration de la présence des récepteurs de la vasopressine dans le cœur de rat durant la maturation*

La synthèse locale de la VP dans le cœur a posé des questions sur la manière par laquelle cette hormone agit pendant la maturation. Est-ce qu'elle agit sur le cœur de manière

autocrine, paracrine ou bien, est-elle relâchée dans la circulation ? Pour répondre à cette question, nous avons premièrement vérifié quels récepteurs vasopressinergiques sont exprimés dans le cœur durant la maturation. En deuxième lieu, nous avons investigué si l'expression d'ARNm et protéique des ces récepteurs sont régulées dans le cœur pendant la maturation.

### *5.1 L'expression et la régulation d'ARNm des récepteurs d'AVP dans le cœur de rat durant la maturation obtenues par analyses RT-PCR*

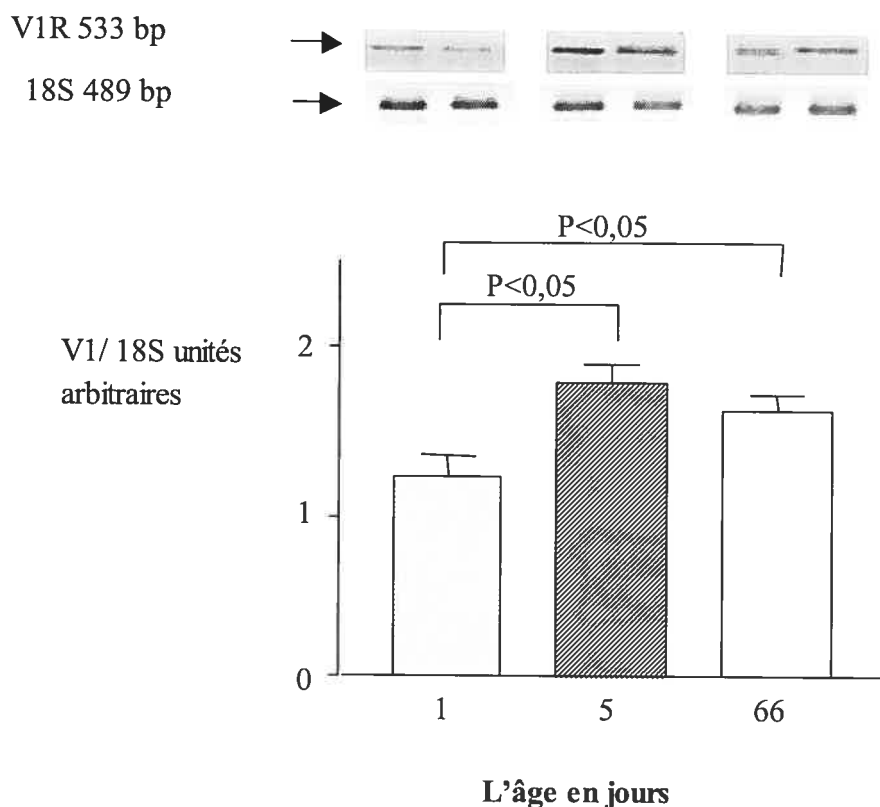
Les analyses par RT-PCR démontrent la présence d'ARNm pour V1 et V2 et ceci pour les trois groupes d'âges (jour 1, 5, et 66 postnataux). Même si les conditions d'amplification du récepteur V3 ont été établies, cette méthode n'a pas permis de détecter V3 dans le cœur de rat.

Les valeurs obtenues sont exprimées dans des unités arbitraires. Ces valeurs représentent le ratio des transcrits pour un récepteur sur 18S utilisé comme standard interne. Les conditions d'amplification pour les récepteurs, tels que la température d'annelation et le nombre des cycles pour les récepteurs V1 et V2, ont été testées précédemment dans notre laboratoire. Pour l'amplification du récepteur V3 cardiaque, la température d'annelation était testée sur l'échantillon de l'hypophyse (annexe 1B). Les échantillons des ARN rénaux ont servi pour les tests de contrôle positif pour les récepteurs V1 et V2.

Les résultats obtenus ont démontré que la synthèse d'ARNm du premier récepteur, V1, dans le cœur passe par une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) du jour 1 ( $1,20 \pm 0,13$ ) au jour 5 postnatal ( $1,77 \pm 0,11$ ) (fig. 8). Ce niveau d'expression a tendance à diminuer à l'âge adulte ( $1,60 \pm 0,09$ ). Il n'y a pas de différence significative entre le jour 5 et adulte.

Le signal pour la synthèse d'ARNm du deuxième récepteur V2 a aussi été obtenu dans le cœur pendant la maturation (fig. 9). Le niveau d'expression d'ARNm du V2R augmente de manière significative surtout au jour 5 postnatal. Son niveau est 2,1 fois plus grand par rapport au jour 1 et 1,5 fois plus grand par rapport au jour 66 postnatal.

Puisque ce récepteur n'a pas été encore identifié dans le cœur, les produits de PCR pour les échantillons de cœur âgé de 1 jour, un cœur d'adulte, ainsi qu'un échantillon de reins ont subi parallèlement le processus de séquençage. Le résultat obtenu correspondait bien à la séquence connue du récepteur V2 de rat (annexe 5).

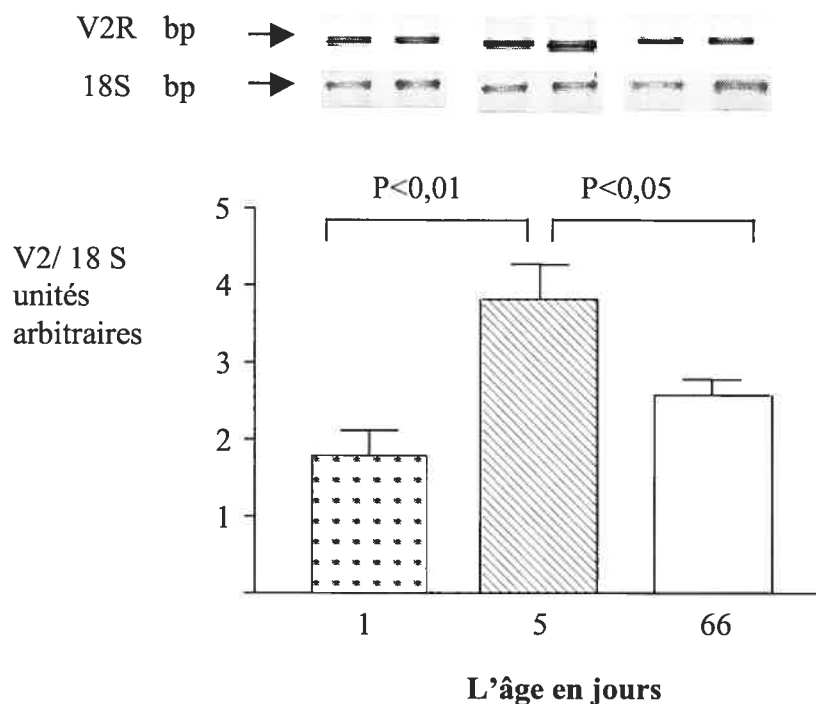


**fig. 8 :** Changements d'expression d'ARNm du récepteur de vasopressine V1 dans le cœur de rat pendant la maturation pour les groupes d'âge de 1, 5 et 66 (adulte) jours, mesurés par la méthode RT-PCR. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls;  $n = 5$ ,  $P < 0,05$  entre les jours 1 et 5 ainsi qu'entre les jours 1 et adulte.

En Conclusion, le profil d'expression d'ARNm pour V1 et V2 est semblable durant la maturation, le maximum d'expression est observé au jour 5.

### 5.2 *L'expression et la régulation protéiques des récepteurs d'AVP dans le cœur de rat durant la maturation obtenues par Western-blot.*

Nous avons utilisé la méthode de Western-blot pour détecter des formes moléculaires correspondant aux récepteurs V1 et V2 à l'aide des anticorps polyclonaux. Avant de procéder avec des échantillons cardiaques, plusieurs paramètres de la méthodologie, entre autres les concentrations du premier et du deuxième anticorps, ont été essayés sur des échantillons rénaux ceux-ci étant connus pour la présence des deux récepteurs en question.



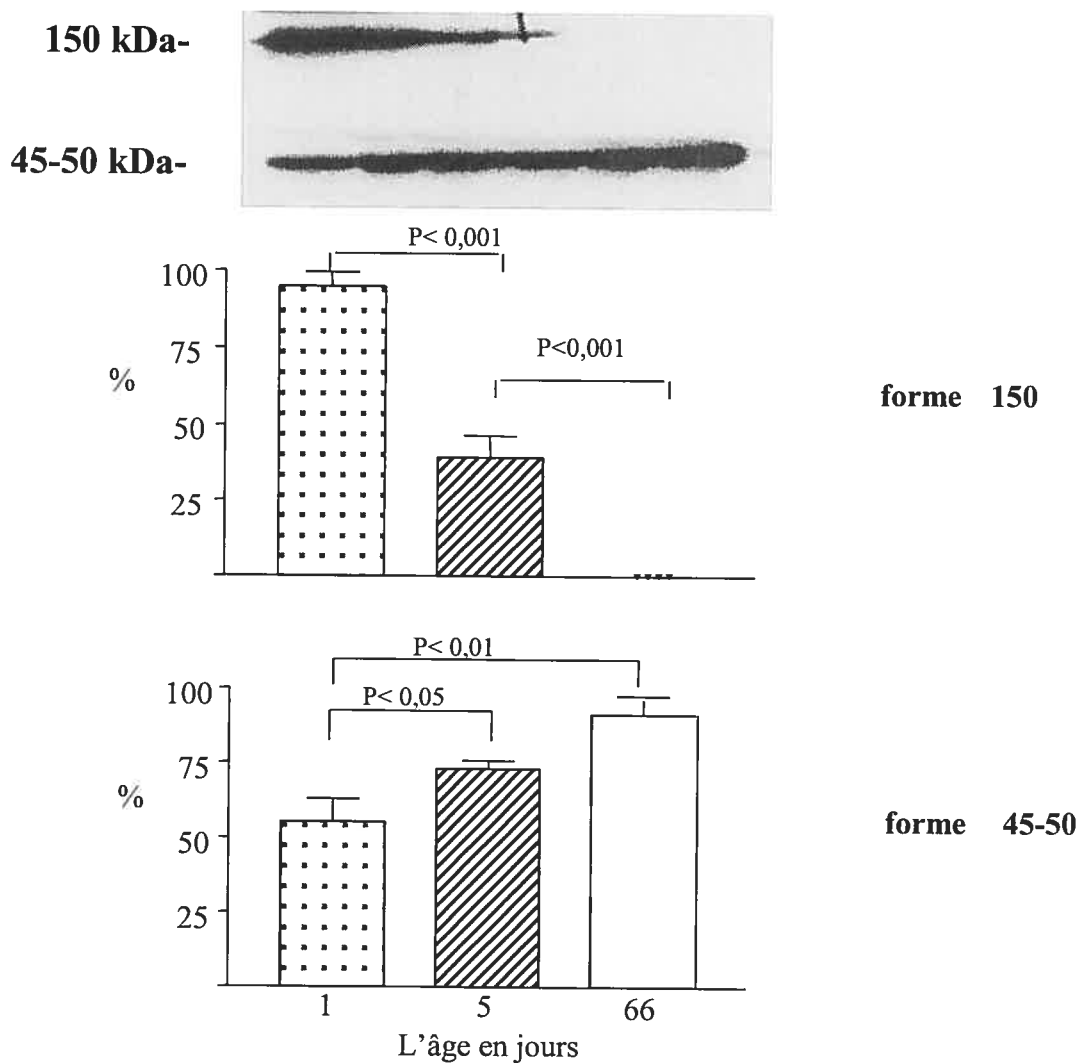
**fig. 9** : Changements d'expression d'ARNm du récepteur V2 de la vasopressine dans le cœur de rat pendant la maturation pour les groupes d'âge de 1, 5 et 66 jours (adulte), mesurés par la méthode RT-PCR. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls.  $n = 7$ ,  $P < 0,01$  entre jour 1 et 5,  $P < 0,05$  entre jour 5 et adulte.

L'optimisation des conditions pour la préparation des membranes est présentée dans l'annexe 6. Tous les Western-blot ont été effectués dans 2-3 expériences indépendantes. Les images représentatives ont été sélectionnées et présentées ci-dessous.

Les résultats obtenus pour le V1 démontrent la présence de deux bandes correspondant à deux formes moléculaires de 50 et de 150 kDa (fig. 10). Une forte dynamique d'expression de ces deux formes a été observée pour les trois groupes d'âges. La forme de 150 kDa donne un signal fort dans le cœur âgé d'un jour. Ce signal diminue de 60 % au jour 5 postnatal et devient très faible, voir absent dans le cœur adulte. Au contraire, l'expression de la forme de 50 kDa augmente progressivement pendant la maturation.

Une observation intéressante est parvenue suite au Western-blot fait pour V1 dans les cardiomyocytes et fibroblastes isolés des cœurs des rats nouveaux-nés ainsi que dans les cardiomyocytes isolés des cœurs adultes (annexe 7). Or, les bandes correspondant à la forme moléculaire de 150 kDa sont présentes seulement dans toutes les cellules des nouveaux-nés,

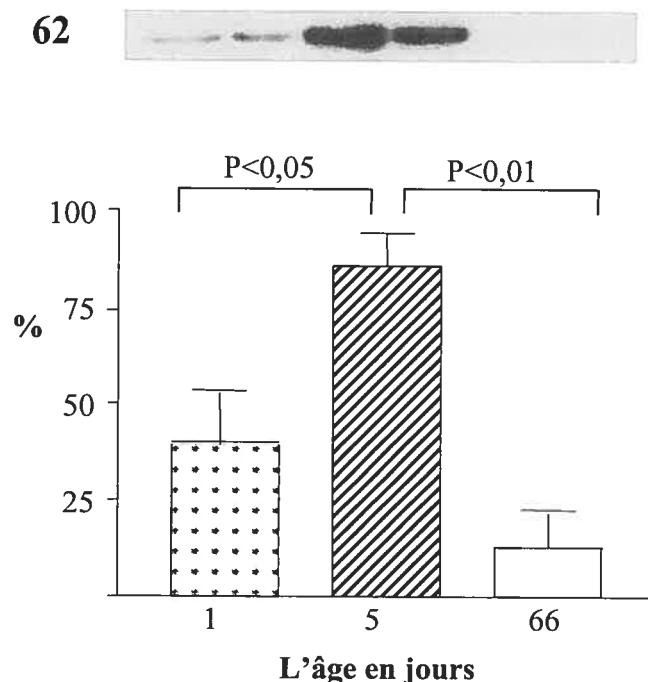
divisées en quatre populations : cardiomyocytes ventriculaires ou auriculaires et les fibroblastes ventriculaires et auriculaires. Le signal s'intensifie et une autre forme moléculaire de 90 kDa se présente dans les échantillons contenant des cardiomyocytes du cœur du nouveau-né entier. Cependant, la forme de 45-50 kDa n'apparaît que pour des cardiomyocytes adultes obtenues du cœur entier.



**fig. 10 :** Changements d'expression protéique (en pourcentage) du récepteur V1 vasopressinergique dans le cœur en maturation ( 1, 5 et 66 jours) analysés par Western-blot.  $n = 5$ ,  $P < 0,001$  entre les échantillons cardiaques pour la forme 150 kDa.  $P < 0,005$  et  $P < 0,001$  entre les jours 1 et 5 ainsi que les jours 1 et 66 respectivement. Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman- Keuls.



Les analyses de Western-blot pour le récepteur V2 dans le cœur en maturation, donnent un signal pour un poids moléculaire attendu d'environ 62 kDa. Parallèlement à l'expression d'ARNm, l'expression protéique de ce récepteur augmente remarquablement au jour 5 postnatal. Le niveau du signal était de 42 % pour le jour 1 et de 18 % pour le jour 66 par rapport au jour 5 postnatal (fig. 11).



**fig. 11** : Changements d'expression protéique du récepteur V2 vasopressinergique dans le cœur en maturation (JP 1, 5 et 66) analysés par Western - blot.  $n = 5$ ,  $P < 0,05$  entre le jour 1 et 5, ainsi que de  $< 0,01$  entre le jour 5 et 66 (adult). Analyses statistiques effectuées à l'aide du PRIZM (version 3) avec ANOVA et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls.

### 5.3 Récepteurs de la vasopressine dans le cœur de rat, démonstration immunocytochimique

Afin d'étudier la distribution des récepteurs vasopressinergiques dans le tissu cardiaque, nous avons employé la méthode d'immunocytochimie. Par RT-PCR, nous avons précédemment amplifié les récepteurs V1 et V2 dans les cardiomyocytes et fibroblastes en culture provenant des cœurs de rats nouveaux-nés, en utilisant les mêmes amorces que pour

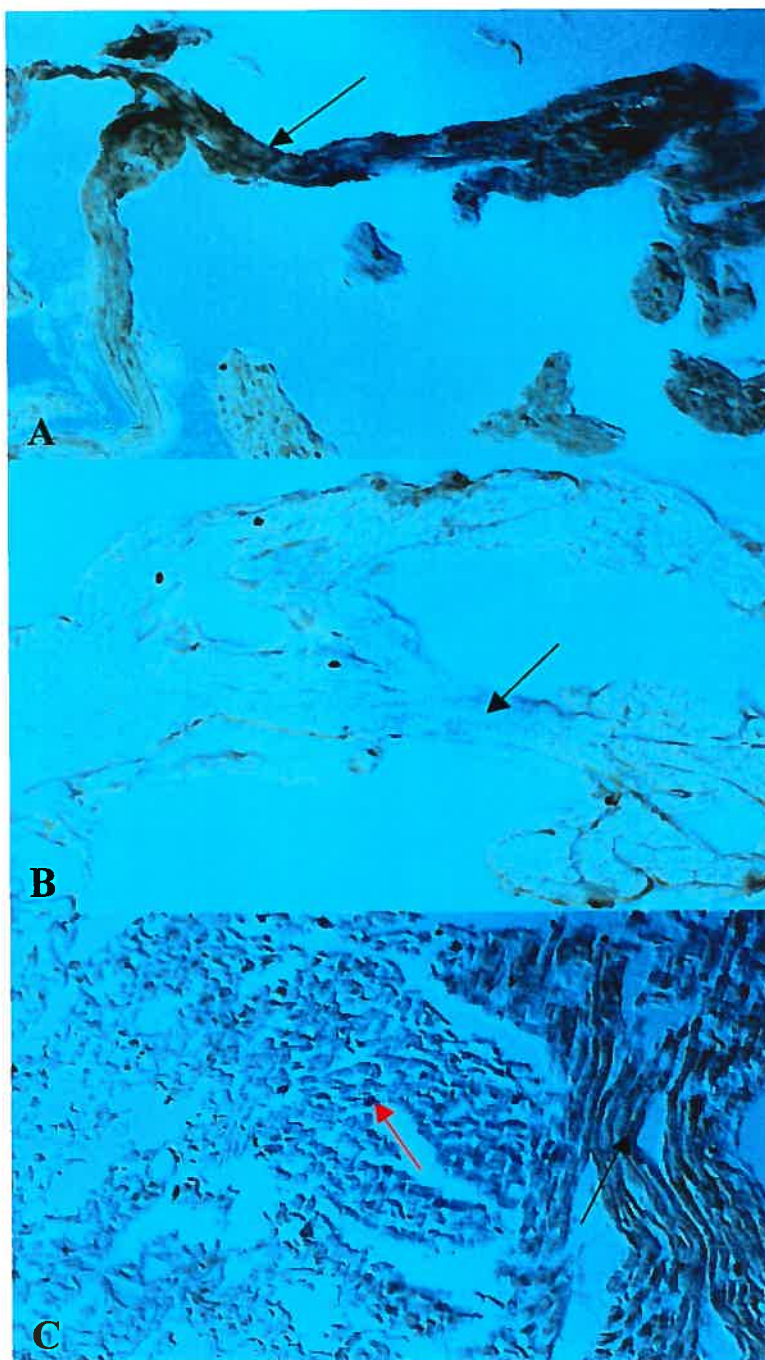
les échantillons tissulaires (annexe 8). Les échantillons de l'aorte et des reins ont servi de contrôles positifs pour les récepteurs V1 et V2 respectivement. Ces résultats démontrent que la synthèse d'ARNm pour les deux récepteurs vasopressinergiques a lieu dans les cardiomyocytes et fibroblastes. Cette technique a permis de confirmer l'expression des nos deux récepteurs dans les deux populations cardiaques. Nous avons alors entrepris la localisation topographique des récepteurs dans le cœur entier âgé de 22 jours dans le but d'obtenir une vue d'ensemble de la localisation du système vasopressinergique et pour construire une idée sur le mode de fonctionnement de la VP cardiaque au niveau local.

Les concentrations des anticorps et le temps d'incubation de l'échantillon avec l'anti-V1 ou l'anti-V2 ont été établies sur des coupes de reins de rat adulte (annexe 4). L'immunocytochimie sur des échantillons cardiaques (cœurs de 22 jours) a été performée en présence et en absence d'anticorps; dans ce dernier cas le NRS a été utilisé au lieu de l'anticorps. Les résultats démontrent une forte coloration des cardiomyocytes dans les régions des oreillettes ainsi que dans les ventricules et ceci pour les deux récepteurs de VP, V1 (fig. 12 et 13) et V2 (fig. 14 et 16). La présence des deux récepteurs est clairement visible dans les cardiomyocytes qui se caractérisent par les striations et une forme rectangulaire ainsi que dans les fibroblastes qui se distinguent par une plus petite forme, un peu allongée. La réaction n'est pas révélée dans les deux chambres du coeur en présence de NRS.

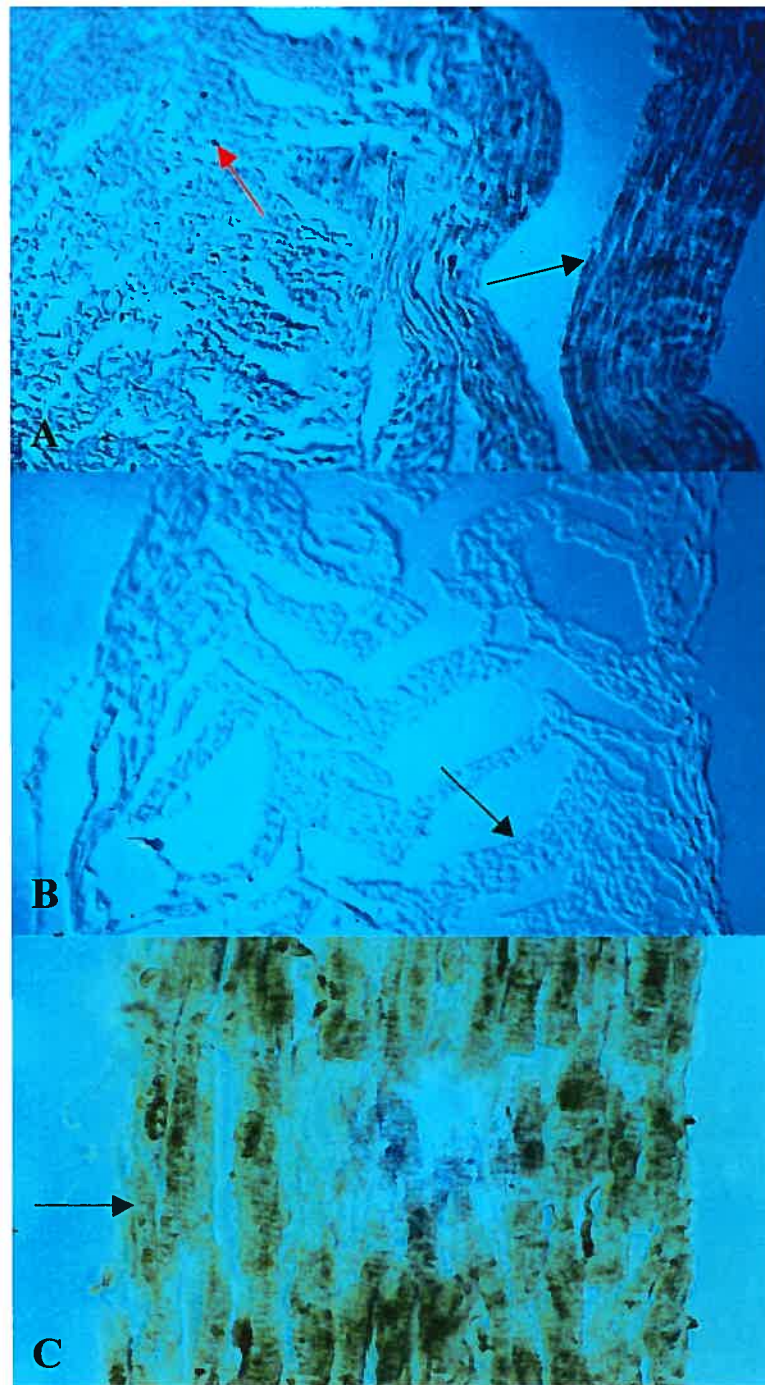
#### *5.4 Présence des récepteurs d'AVP dans les cellules cardiaques démontrée par immunocytochimie*

Les résultats d'immunocytochimie sur des fibroblastes et des cardiomyocytes isolés des rats nouveaux-nés (3-4 jours) démontrent la présence des deux récepteurs de la VP, V1 et V2 dans les cardiomyocytes. La méthode précédemment décrite, a été employée en présence et en absence de l'anticorps primaire remplacé par NRS. La coloration obtenue pour le récepteur V2 est plus forte que pour le récepteur V1 (figure 16). Cette technique n'a pas permis la détection de ces récepteurs dans les fibroblastes.

En conclusion, les récepteurs V1 et V2 sont présents dans les oreillettes et les ventricules du rat de 22 jours ainsi que dans les cardiomyocytes isolés du cœur de rat nouveau- né

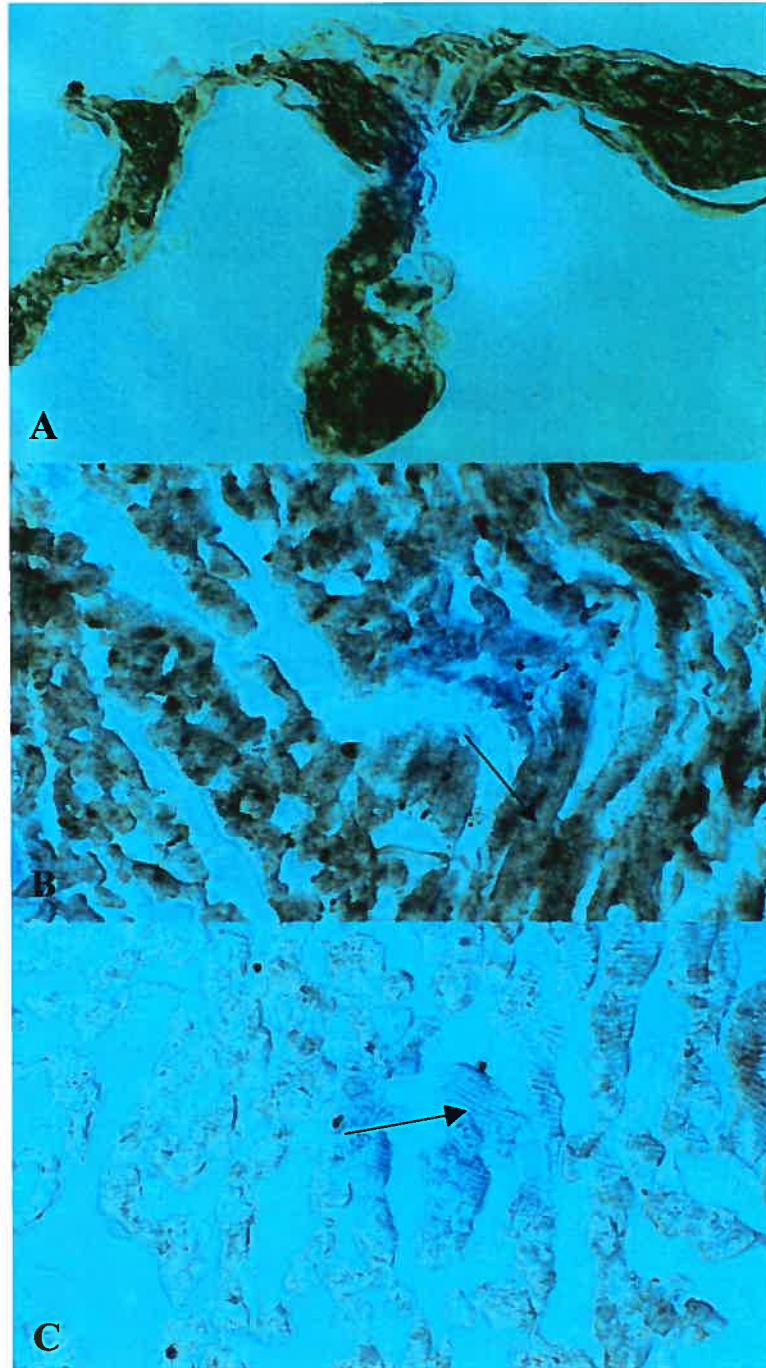


**fig. 12 :** Démonstration immunocytochimique du récepteur V1 dans les oreillettes en présence (A, 500X) et en absence (B, 500X) de l'anticorps, et dans les ventricules (C, 200X) du cœur de rat de 22 jours. Les flèches noires indiquent la réaction dans les cardiomyocytes qui se caractérisent par les striations et la flèche rouge indique la réaction dans les fibroblates. Les images ont été obtenues à l'aide de microscope Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4

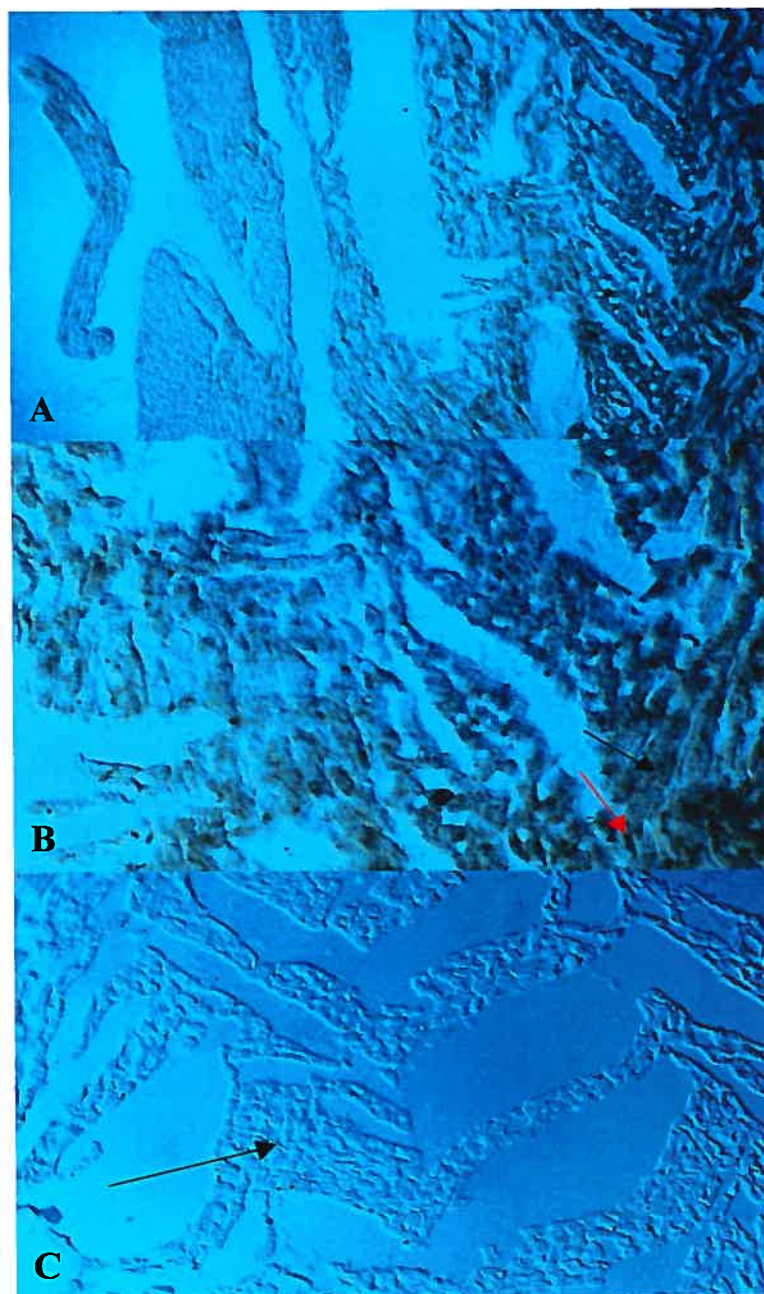


**fig. 13 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V1 dans les ventricules, au niveau des cardiomyocytes (flèche noire) et fibroblastes (flèche rouge) du cœur de rat de 22 jours en présence de l'anticorps (A, 100X), ou en absence de l'anticorps (B, 100X). Une forte réaction dans les cardiomyocytes ventriculaires est présentée en C (agrandissement 550X). Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4.

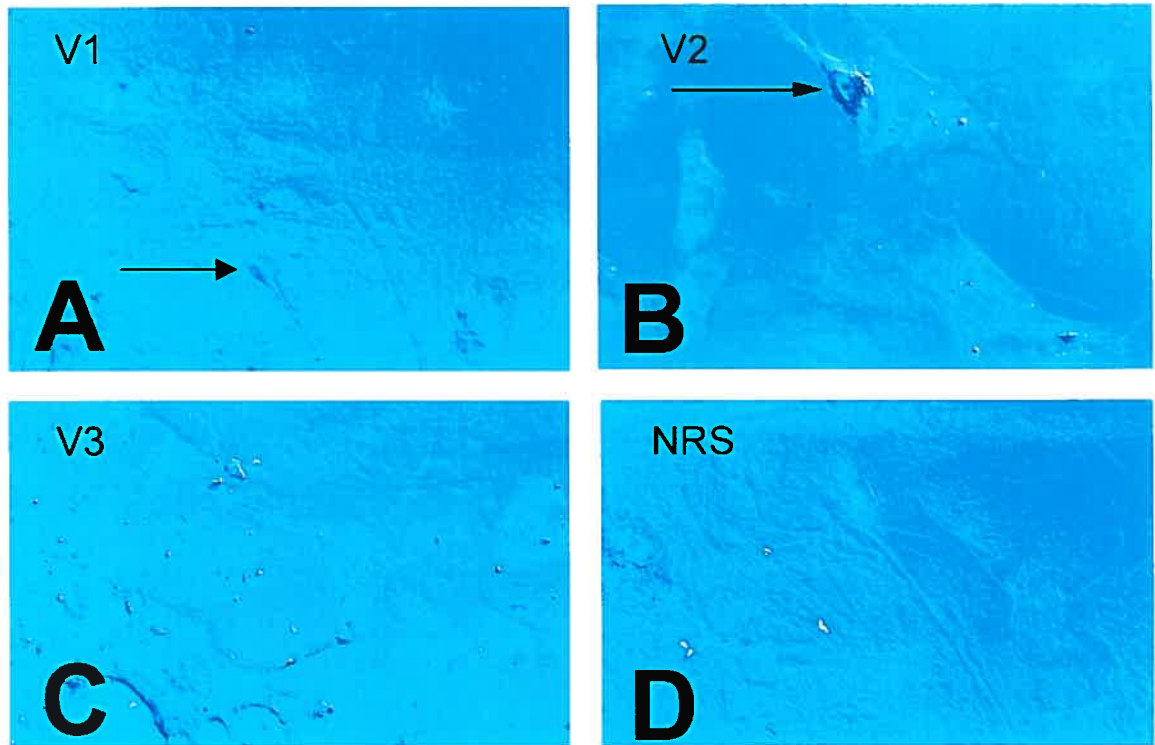




**fig. 14 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V2 dans les oreillettes (A, 100X) et dans les cardiomyocytes auriculaires de cœur de rat de 22 jours en présence et en absence de l'anticorps (B et C). Les flèches indiquent la réaction positive après l'incubation avec l'anticorps spécifique et négative suite à l'incubation des coupes avec le NRS. Les images ont été obtenues à l'aide de microscope Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4.



**fig. 15 :** Démonstration immunocytochimique de la présence du récepteur V2 dans les ventricules de cœur de rat de 22 jours en présence (A 100X, B 200X) et en absence de l'anticorps (C 200X). La flèche noire indique la réaction dans les cardiomyocytes et la flèche rouge pointe vers les fibroblastes. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4.



**fig. 16 :** Démonstration immunocytochimique de la présence des récepteurs de vasopressine (V1 en A, V2 en B , agrandissement de 550X) dans les cardiomyocytes isolés de cœurs des rats nouveaux-nés obtenue à l'aide des anticorps polyclonaux (dilutions 1 :500) (Cederlane). La réaction pour le V3 est négative. La réaction en présence de NRS (D) effectuée pour tous les récepteurs a donné des résultats négatifs. Les images ont été obtenues à l'aide de microscop Reichert- Jung (Polyvar) avec système Nomarski et photographiées avec le caméra Nikon coolscan 4.



## CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette étude nous démontrons pour la première fois la présence et la dynamique de l'expression de la VP et des ces récepteurs (V1 et V2) chez le rat pendant l'ontogenèse cardiaque postnatale. Premièrement, la synthèse locale de VP dans le coeur a été démontrée par l'obtention des transcrits du gène de la VP-NP11, suite à des analyses effectuées par la technique de la PCR en temps réel. Deuxièmement, la traduction de VP a été détectée dans toutes les quatre chambres du cœur adulte à l'aide de dosage radioimmunologique, et nos analyses démontrent que la VP est plus abondante dans les oreillettes que dans les ventricules. La concentration décroissante de la VP a été trouvée ensuite dans les cœurs suivant la période postnatale jusqu'à l'âge adulte. La concentration locale élevée de la VP dans les premiers jours postnataux soutient l'hypothèse que cette hormone est impliquée dans des mécanismes de la maturation cardiaque. La distribution spatiale de la VP dans le tissu cardiaque a montré la localisation du peptide dans les oreillettes et les ventricules et au niveau de la tunique externe (adventice) des vaisseaux coronaires. Comme la localisation spatiale de la VP est différente de celle obtenue pour les récepteurs, ceci élimine la possibilité que la VP dosée ou visualisée soit couplée à ses récepteurs. Ces résultats confirment que la VP est transcrite et traduite localement dans le cœur et indiquent qu'elle peut jouer un rôle non seulement au niveau du développement cardiaque, mais aussi au niveau vasculaire. De plus, nous avons montré par les analyses de RT-PCR et Western-blot les changements dynamiques d'expression des récepteurs V1 et V2 dans le cœur en période de maturation. La présence de deux formes moléculaires a été trouvée pour V1. Une forme moléculaire ayant une expression transitoire au jour 5 postnatal a été obtenue pour le V2. Cette régulation d'expression temporelle de V1 et V2 est en accord avec la possibilité de l'implication du système vasopressinergique dans la maturation cardiaque. Par la méthode d'immunohistochimie, ces récepteurs ont été visualisés dans les cardiomyocytes des oreillettes et ventricules et dans les cardiomyocytes isolés des coeurs des rats nouveaux-nés. De plus, les analyses par RT-PCR dans les fibroblastes et cardiomyocytes des rats nouveaux-nés ont confirmé la présence des gènes pour ces deux récepteurs dans les deux populations cellulaires en soulignant la possibilité pour la VP d'agir au niveau des cellules cardiaques pendant l'ontogenèse postnatale.



## ***1. Identification de la VP***

Le gène de l'hormone précurseur NPII-VP a été amplifié dans le cœur en même temps que dans l'hypothalamus. Le point de fusion pour des produits du PCR des échantillons cardiaques et de l'hypothalamus ont sorti à la même température en indiquant l'obtention d'un produit identique pour le tissu cardiaque et pour l'hypothalamus. Même si l'abondance d'ARNm cardiaque était estimée faible par rapport à l'hypothalamus, nous avons procédé à l'identification de la protéine de la VP.

La caractérisation immunologique initiale de la VP cardiaque a démontré que dans une étude de liaison par compétition avec l'anticorps VP-spécifique, la série des dilutions des échantillons provenant de quatre compartiments cardiaques a produit des courbes parallèles à celle obtenue avec la VP synthétique. Ces données indiquent que la VP est reconnue par cet anticorps dans les extraits cardiaques de la même manière que la VP authentique. Or, jusqu'à présent, la production de VP dans le cœur, a été démontré seulement dans la condition du stress mécanique effectué sur la paroi cardiaque [30]. L'identification de l'immunoréactivité de la VP dans les extraits des coeurs et les concentrations plus élevées du peptide cardiaque chez le rat nouveau-né par rapport au rat adulte suggèrent fortement que le cœur génère aussi la VP dans des conditions physiologiques telles que la maturation de l'animal.

## ***2. Rôle possible de la VP dans le cœur en développement***

On connaît peu de choses au sujet de l'expression et du rôle de la VP pendant le développement et la maturation des mammifères. Ugrumov et al. (2002) montrent que le nombre de neurones magnocellulaires à VP augmente chez les animaux immatures jusqu'à l'âge de puberté. Ces neurones commencent à réagir à des stimulations fonctionnelles (osmotiques) par l'augmentation de la synthèse d'ARNm de VP chez l'animal immature à partir de la fin de la vie fœtale [44].

Chez le rat, les niveaux de d'ARNm de VP augmentent dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse avec l'âge jusqu'au jour 21 postnatal. Au contraire, les niveaux plasmatiques de VP sont les plus élevés chez le rat immature, âgés de 8 jours et diminuent ensuite jusqu'au niveau adulte qui est atteint au jour 30 postnatal [45-46]. L'expression décroissante de la VP

intra-cardiaque mesurée pour trois groupes d'âges s'avère alors inverse à celle observée dans l'hypothalamus et similaire à celle mesurée dans le plasma. Ces observations suggèrent premièrement deux fonctions différentes de la VP : une dans la vie postnatale et l'autre dans la vie adulte. Deuxièmement, elles suggèrent que la VP provenant des sources périphériques et non hypothalamiques peut contribuer dans la circulation pendant les premiers jours postnataux. Nos résultats indiquent que le cœur peut être une des sources de VP et contribuer à des effets locaux aussi bien que systémiques en libérant la VP dans la circulation. Il est probable alors que le cœur du nouveau-né fournit la VP pendant que le système neurohypophysaire se développe afin d'assurer son abondance dans le plasma et maintenir ses fonctions au niveau de la pression sanguine et d'osmorégulation. Quelques recherches tendent à expliquer la présence de VP tôt dans les étapes du développement. Normalement, la VP est connue comme une hormone antidiurétique agissant sur son récepteur V2 rénal. Cependant, une étude démontre que les reins d'un animal nouveau-né sont résistants à la VP. L'expression génique du récepteur V2 rénal et de l'aquaporine 2 augmente graduellement pendant l'ontogénèse postnatale. Et, la capacité de la VP de réguler la perméabilité d'eau des tubules collecteurs est observée à partir du moment de sevrage. Ceci signifie que la VP n'est pas impliquée dans la régulation hydrique pendant les premiers jours de la maturation de l'animal [47].

Une étude sur l'influence de la VP circulante sur le contrôle de l'activité du nerf sympathique rénal et sur la fréquence cardiaque contrôlée par le baroréflexe artériel a été faite chez le fœtus et le nouveau-né de mouton. Les résultats de cette étude montrent que contrairement à l'âge adulte, cette hormone n'est pas impliquée dans la modulation du baroréflexe artériel à l'âge fœtal et postnatal [48].

Les études similaires sur l'ontogénèse des baroréflexes artériel et cardio-pulmonaires pendant la vie foetale et postnatale confirment que contrairement à l'angiotensine II qui contribue dans le « *resetting* » des baroréflexes tôt dans la vie, la VP circulante, même à des niveaux élevés, provoque peu d'effets sur la fonction de baroréflexes lors du développement. Ces effets ne sont observés qu'à l'âge adulte [49].

L'ensemble de ces travaux ne donne pas d'explications au sujet du rôle exact de la VP pendant la vie foetale ou postnatale, mais ils excluent celles qui semblent les plus probables. Ces travaux suggèrent aussi que la pression sanguine et l'osmorégulation qui sont

considérées comme les fonctions principales du système de la VP neurohypophysaire peuvent correspondre à l'âge adulte. Ces recherches encouragent notre hypothèse que la VP peut être impliquée dans les étapes de la maturation cardiaque telles que la prolifération et l'hypertrophie cardiaque.

### 3. *Rôle possible de la VP dans la différenciation des cellules cardiaques*

La synthèse de la VP a déjà été démontrée dans plusieurs organes. Récemment Hansenne et *al.* [50] montrent que dans le thymus de la souris, le gène de la VP est observé à partir du 15-ème jour embryonnaire. Dans une culture d'organe thymique foetal la VP était identifiée comme le facteur de différenciation des cellules-T. Ces résultats sont importants dans le contexte du développement cardiaque puisque la VP présente dans le cœur du nouveau-né pourrait jouer le même rôle dans la différenciation des cellules cardiaques. Nos études préliminaires concernant les effets de la VP sur la lignée des cellules souches embryonnaires, P19 démontrent que la stimulation de ces cellules par la VP résulte en une induction de l'expression du gène du facteur de transcription cardiaque GATA 4 qui sert de marqueur de la différenciation en cellules cardiaques (annexe 9). Ces résultats indiquent que la VP possède des capacités de différencier les cellules P19 en cardiomyocytes. Récemment, OT a été défini comme un facteur de différenciation cardiaque. Dans le modèle P19, OT provoque la différenciation cellulaire jusqu'à l'obtention des cellules battantes ayant des caractéristiques de cardiomyocytes [51]. Précédemment, la transcription et la traduction de cette hormone d'origine neurohypophysaire ont été démontrées dans le cœur [43]. De plus, son profil d'expression dans le tissu cardiaque pendant l'ontogénèse postnatale est comparable à celui obtenu pour la VP. Dans le cœur, OT est plus abondant dans les oreillettes que dans les ventricules et ses niveaux sont décroissants à partir de l'âge postnatal jusqu'à l'âge adulte. Nos résultats montrent que tout comme dans le système neurohypophysaire, les systèmes d'OT et de VP sont exprimés en même temps dans le cœur. L'interaction (*cross-talk*) des récepteurs de la famille VP/OT a été étudiée dans le cerveau [44] et aucune étude n'est connue dans le cœur. Etant donné que les deux systèmes d'OT et de VP existent dans le cœur et que la VP possède une haute affinité pour OTR, leur interaction reste probable. Cette expression parallèle et l'interaction existant entre les deux

systèmes hormonaux peuvent avoir des effets synergiques ou complémentaires sur la maturation cardiaque.

#### **4. Rôle possible de la VP dans les vaisseaux en développement**

L'origine de la VP cardiaque et plasmotique peut être aussi vasculaire puisque nous avons obtenu une forte coloration des vaisseaux coronaires, spécifiquement dans la région de la tunique externe (*adventitia*). Le rôle physiologique de l'*adventitia* comme un médiateur paracrine de la fonction vasculaire est de plus en plus étudié. Les fibroblastes adventitiels sont décrits comme les plus réactifs de la paroi vasculaire. La stimulation de l'*adventitia* est démontrée comme étant associée avec la transmodulation de ces fibroblastes en myofibroblastes connus pour avoir des propriétés constrictives ainsi que pour constituer une grande partie de la matrice extracellulaire. Ces deux événements conduisent notamment vers le remodelage vasculaire. Récemment, l'*adventitia* a été proposée comme celle qui semble jouer un rôle important dans le remodelage suite à une lésion vasculaire par la synthèse des facteurs de croissance et par la prolifération des fibroblastes qui précèdent la modulation des myofibroblastes migrant vers la région de néointima. Le fait d'avoir localisé la VP par ICC dans la tunique externe supporte ainsi sa fonction de région active [52-53].

La présence et la synthèse de la VP ont déjà été rapportées dans différents lits vasculaires, mais le compartiment vasculaire dans lequel celle-ci est produite reste un sujet de controverse. Or, il a déjà été démontré par l'ICC qu'entre 10 à 50% des cellules endothéliales provenant des vaisseaux de rat (l'aorte, les mésentères, les artères pulmonaires) donnent la coloration pour la VP. Aucune réaction n'était observée dans les structures de muscle lisse vasculaire ni dans l'*adventitia*. Simon et *al.* (1995), par contre, ont démontré grâce à la dénudation mécanique de l'endothélium que l'ARNm de la VP est produit par les structures subendothéliales comme le muscle lisse vasculaire ou l'*adventitia* perivasculaire, ce qui concorde avec nos résultats [55]. D'autres études supportent la possibilité que les cellules endothéliales contiennent et produisent l'AVP. L'ultralocalisation de la VP effectuée par Loesch et ses collègues (2000) montre que dans le cœur du rat nouveau-né, la VP a été localisée dans les cellules endothéliales des artères coronaires et des vaisseaux de petit diamètre ainsi que dans les fibroblastes. L'auteur propose que la VP contribue dans le

contrôle vasomoteur de la circulation coronaire durant la période du développement [54, 56]. Avec les autres facteurs vasoconstrictifs produits localement comme l'endothéline ou l'angiotensine II, la VP peut jouer en effet un rôle dans la régulation du tonus vasculaire. De plus, comme la VP augmente les effets vasoconstricteurs des catécholamines sur des vaisseaux sanguins *in vitro* et *in vivo*, elle peut agir en conjonction avec le système nerveux sympathique afin de réguler le tonus vasculaire [57].

Les résultats des études effectués dans le but de vérifier les effets de la VP sur les cellules composantes la vasculature sont divisés. La stimulation des cellules endothéliales vasculaires en culture par la VP conduit à l'augmentation de la synthèse protéique, mais n'influence pas la prolifération cellulaire [16]. De l'autre côté, l'injection intraveineuse de la VP cause une augmentation de la densité des capillaires en démontrant ses caractéristiques prolifératives. Il est intéressant d'observer que dans le tissu ventriculaire, cette injection cause une augmentation de facteur de croissance de base spécifique pour des fibroblastes (bFGF) [58]. Cette observation est importante dans le contexte des recherches de Tomanek *et al.* (1996). Ils ont montré qu'à l'étape postnatale, les artères et les veines coronaires ainsi que les capillaires du myocarde passent encore par des changements architecturaux. Cette étape de maturation est accompagnée de grands niveaux d'expression d'ARNm de bFGF dans le cœur pendant la première semaine postnatale [59].

L'expression élevée d'ARNm de bFGF cardiaque et la forte concentration de VP cardiaque dans la première semaine postnatale ainsi que le fait que la VP peut causer l'augmentation du bFGF indiquent une des voies possibles par laquelle la VP peut participer à la maturation du cœur. Ces données permettent de proposer que pendant l'ontogenèse postnatale, la VP adventitielle peut contribuer au remodelage développemental des vaisseaux sanguins/coronaires ainsi que promouvoir la croissance des fibroblastes cardiaques par l'activation de bFGF. Nos analyses par RT-PCR confirment que les fibroblastes du cœur nouveau-né possèdent les récepteurs V1 et V2 (annexe 8). Il faut souligner que chez le rat, la période postnatale de quatre premiers jours correspond à la phase d'hyperplasie intense lorsque le volume des cardiomyocytes reste constant malgré l'augmentation du poids cardiaque causé par la division des cardiomyocytes. Cette phase est aussi accompagnée par la prolifération des fibroblastes [60]. La participation du système vasopressinergique cardiaque dans cette étape développementale est alors plausible.

### **5. Implication du récepteur V1 dans la maturation cardiaque**

La dynamique d'expression des récepteurs promet aussi la participation du système vasopressinergique dans le développement cardiaque. Nous avons montré par RT-PCR que le gène pour V1 est présent dans les fibroblastes et les cardiomyocytes du rat nouveau-né. Dans le cœur entier, les niveaux d'expressions d'ARNm et protéique ont tendance à augmenter jusqu'à l'âge adulte. Nos analyses immunocytochimiques montrent une forte coloration pour V1 dans les oreillettes et ventricules du cœur de 22 jours (l'âge adolescent). La réaction est surtout visible dans les cardiomyocytes. L'ICC dans les cellules cardiaques néonatales isolées donne une faible réaction pour la présence de V1 dans les cardiomyocytes. En fait, la localisation topographique de V1 dans le cœur n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Afin de mieux décrire la dynamique d'expression de V1 cardiaque il serait intéressant d'investiguer séparément son ontogenèse dans les vaisseaux coronaires et dans le myocarde. Il est très probable que dans les premiers jours postnataux, V1 est exprimé plutôt dans le myocardium tandis qu'à l'âge adulte il serait plus abondant dans les vaisseaux coronaires.

En connaissant les propriétés physiologiques du récepteur V1 il est possible de présumer que les effets prolifératifs et différentiels de la VP sont médiés par V1 pendant le développement cardiaque, et ceci pour les deux populations cellulaires cardiaques dans lesquelles il est présent. Plusieurs travaux mettent en évidence les effets hypertrophiques et hyperplasiques de la VP conduits via le récepteur V1.

La VP a été démontrée comme celle qui provoque de manière dose-dépendante l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules du MLV mesurées par l'activité de MAP-kinase. Ces effets de croissance cellulaire ont été inhibés par YM471, un antagoniste de V1R [61]. La promotion de la croissance cellulaire par la VP a aussi été rapportée dans les fibroblastes cardiaques néonataux. La synthèse de l'ADN ainsi que le nombre des fibroblastes augmentent suite à la stimulation des cellules par la VP. L'ajout d'un inhibiteur du V1 bloque ces effets [62]. Dans les cardiomyocytes néonataux, la VP accélère la synthèse protéique sans influencer le taux de la synthèse d'ADN. Ces actions conduisant vers l'hypertrophie cardiaque impliquent la voie de PLC et l'augmentation du calcium intracellulaire qui sont

reliés au récepteur V1. Le blocage de la voie métabolique du V1 inhibe ces actions [63]. D'autres études montrent que dans les cardiomyocytes adultes, la VP stimule, de manière dose-dépendante, l'activité des protéines RSK et ERK qui sont impliquées dans la régulation de la synthèse protéique au niveau de la traduction.

L'ensemble de ces données soutient l'hypothèse que la VP pourrait agir sur la prolifération des cellules cardiaques via son récepteur V1 qui se manifeste pendant la période de premiers jours postnataux correspondant à la phase d'une hyperplasie intense liée au développement.

Les résultats de Western-blot pour le V1 dévoilent la présence de deux formes moléculaires, autant dans les cœurs entiers que dans les cellules cardiaques isolées. Ces formes correspondent probablement à des monomères et à des dimères. Cet aspect a été étudié par Devost et *al.* [64] qui ont montré que les récepteurs d'OT peuvent former des oligomères : homo-oligomères et hétéro-oligomères avec les membres de la famille des récepteurs de VP. Ce processus d'oligomérisation est indépendant de la présence du ligand. L'hétéro-dimérisation entre les récepteurs couplés aux protéines G a été proposée comme jouant un rôle important dans les caractéristiques fonctionnelles du récepteur. Comme nous l'avons déjà mentionné, les récepteurs de VP et OT démontrent une affinité relativement haute pour les deux hormones, VP et l'OT. De plus, V1 et OTR sont co-exprimés dans quelques tissus comme le myomètre et dans quelques régions du système nerveux central pendant que V1 et V2 sont co-exprimés dans les tubules rénaux collecteurs. Les travaux de Terrillon et *al.* [65] montrent la possibilité de dimérisation entre ces récepteurs. Dans ces expériences, il rapporte l'expression de quatre espèces moléculaires pour V1 : les formes monomériques et dimériques de molécules précurseur glycosylées (45 et 90 kDa respectivement) et deux autres espèces de 75 et 150 kDa correspondent à des monomères et dimères des récepteurs V1 matures. Or, les espèces obtenues dans nos essais de Western-blot sont de 150 kDa et de 45 kDa qui peuvent correspondre alors respectivement à des dimères matures et à des monomères glycosylés. La signification physiologique de ce phénomène n'est pas encore connue, mais il est étonnant que la bande correspondant à des dimères matures est très tôt fortement exprimée dans la vie postnatale et elle disparaît chez les adultes. Inversement, la bande qui correspond au monomère glycosylé a une tendance à augmenter avec l'âge de rat. Des études plus approfondies seront nécessaires pour confirmer

les résultats observés et pour identifier les différentes formes moléculaires. L'utilisation des techniques de co-immunoprécipitation et de BRET (bioluminescence resonance energy transfer) a permis d'établir que dans les cellules transfectées embryonnaires rénales (humaines, 293T) V1a, V2 et OTR existent comme homo- et hétéro-dimères et que leur formation est un processus constitutif. Les mêmes approches utilisées avec un modèle des cellules embryonnaires cardiaques transfectées avec les récepteurs de VP et d'OT permettraient de vérifier si le même phénomène se reproduit ou s'amplifie au niveau cardiaque. Les protéines ainsi obtenues pourront être ensuite comparées par Western-blot avec les protéines isolées des cardiomyocytes et des fibroblastes des cœurs foetaux ou nouveaux-nés.

L'obtention de bandes qui suggèrent la dimérisation montre que ce phénomène peut être observé dans la nature et qu'il peut jouer un rôle dans le développement qui représente sans doute une des phases physiologiques présentant les plus intenses changements moléculaires et cellulaires. De plus, certains travaux démontrent que pendant certaines conditions physiologiques spéciales comme la grossesse, l'accouchement et la déshydratation, il y a des changements caractéristiques dans l'expression relative de V1/OTR dans l'utérus et de V1/V2 dans les tubules rénaux. Leurs niveaux d'expression sont modifiés de manière drastique. Ces changements peuvent avoir des conséquences particulières sur la fonctionnalité des récepteurs ainsi qu'inclure la possibilité de leur dimérisation [66-67].

#### **6. Implication du récepteur V2 dans la maturation cardiaque**

Le deuxième récepteur étudié pendant l'ontogenèse cardiaque postnatale, V2, s'avère surprenant. Premièrement, il est connu comme un récepteur exclusivement rénal, et la confirmation de son expression dans le cœur était nécessaire. Nous avons identifié le V2 en procédant au séquençage de son produit de PCR cardiaque en même temps que de son produit rénal. Sa localisation topographique montre sa présence dans les ventricules et les oreillettes. La coloration est surtout présente dans les cardiomyocytes, comme c'est le cas du V1, et ce résultat est confirmé par la coloration des cardiomyocytes fraîchement isolés. Récemment, Kaufmann et *al.* ont rapporté la distribution du gène de V2 dans les cellules endothéliales pulmonaires, dans le cœur et le muscle squelettique [68]. Cette distribution



indique que nos résultats obtenus pour le récepteur V2 cardiaque chez le rat, pourraient aussi être importants pour les humains.

Nos résultats montrent pour la première fois une forte régulation du V2 au niveau du gène et de la protéine pendant la maturation cardiaque. Le jour 5 postnatal semble être critique pour l'expression de ce récepteur. Ce moment correspond au début de la période d'hypertrophie cardiaque développementale pendant laquelle les cellules changent dramatiquement leur volume [60]. Ce parallèle entre V2 et le début d'hypertrophie cardiaque reste intrigant et peut être expliquée dans deux contextes.

En premier lieu, V2 qui est exprimé dans les reins, est responsable de la régulation de l'équilibre hydrique. Sa voie de signalisation passe par l'AMPC et engage le déplacement des aquaporines (AQP) vers la membrane afin de faire passer l'eau. Les AQP2, AQP3, et AQP4 sont celles qui participent dans cette régulation au niveau rénal. Dans le coeur il existe l'AQP1 au niveau des caveoles des myocytes cardiaques, mais son rôle physiologique et le fonctionnement sont encore mal connus [69]. Il est toute fois possible que la VP en agissant sur son récepteur V2 cardiaque, active l'AQP1 et provoque le changement du volume cellulaire hydrique. Cette idée est supportée par deux travaux : premièrement par Rajkumar *et al.* (1997) qui démontrent l'augmentation de la perméabilité des oocytes (*Xenopus*) transfectées et exprimant l'AQP1, suite à la stimulation par la VP. La perméabilité à l'eau de ces cellules était dépendante des niveaux d'AMPC signifiant que ce dernier peut activer l'AQP1, comme dans le cas de l'AQP2 rénale; deuxièmement, par Chen *et al.* (2000) qui s'intéressent au rôle de la VP dans la régulation du contenu hydrique et du volume cellulaire dans les astrocytes et dans les cellules neuronales. Ces derniers auteurs ont démontré que la VP augmente la perméabilité à l'eau des astrocytes et non celle des neurones en provoquant l'odème des astrocytes. Ces démonstrations nous permettent de suggérer que dans les conditions spéciales physiologiques, tel la maturation cardiaque, la VP peut induire les mêmes effets sur les autres types cellulaires comme des cardiomyocytes via son récepteur V2 qui est fortement exprimé au début de l'hypertrophie développementale [70-71].

En deuxième lieu, les études sur le développement cardiaque postnatal chez la souris (jours 21 à 50) ont démontré l'augmentation de la fréquence et du débit cardiaques qui résultent en une augmentation de la pression sanguine. Ces changements hémodynamiques

peuvent être à l'origine d'une augmentation de la contractilité de chaque cardiomyocyte [72]. Nous suggérons ainsi que la forte expression de V2 au jour 5 postnatal peut jouer un rôle dans l'adaptation du cœur aux changements volumiques par la régulation de la contractilité cardiaque. Comme le cœur au jour 5 entre dans la phase de forts changements volumiques ceci représente une situation de réduction de la capacité contractile du cardiomyocyte. L'apparition du récepteur V2, dont la voie métabolique engage l'AMPC, peut alors corriger cette réduction et assurer une contractilité suffisante. Weig *et al.* (2000) démontrent en fait, que la transfection du récepteur V2 dans le myocardium augmente la contractilité cardiaque *in vivo*. Cette étude permet de croire que dans une condition physiologique comme hypertrophie développementale, le V2 peut provoquer l'inotropie positive. De plus, nos résultats de Western-blot montrent que la V2 n'est pas présente dans le cœur adulte. Ceci indique premièrement que la traduction protéique est fortement régulée et ensuite que sa présence dans le cœur adulte n'est pas nécessaire, mais pourrait être induite dans des conditions comme l'hypertrophie pathologique [73].

Notre étude démontre pour la première fois un nouveau site de la synthèse de la VP et de ces récepteurs, soit dans le cœur de rat pendant l'ontogénèse postnatale. Ces résultats suggèrent une action locale paracrine de la VP dans le cœur en maturation, et démontre aussi que la VP est une candidate potentielle à l'ontogénèse cardiaque, ce qui indique un nouveau rôle possible de l'hormone étudiée depuis plusieurs décennies. De nombreux travaux récents cherchent à expliquer le rôle de la VP trouvée tôt dans l'organisme et plusieurs postulats ont été proposés dans cette discussion. Nous présentons le système vasopressinergique cardiaque et les changements par lesquels celui-ci passe lors de la maturation de l'animal, mais sa fonction exacte durant cette période reste à déterminer. Nos résultats démontrent que la concentration de la VP cardiaque est plus grande chez les rats nouveaux-nés que chez les adultes. Ces récepteurs exprimés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes sont régulés pendant l'ontogénèse postnatale et peuvent conduire à des effets prolifératifs ou à la différenciation cellulaire via V1 aussi bien qu'à des effets hypertrophiques ou inotropiques positives via V2. De multiples expériences s'avèrent nécessaires pour décortiquer le rôle du système vasopressinergique dans la maturation cardiaque et il nous semble pertinent de souligner que le rôle de la VP dans le développement cardiaque ne peut pas être étudié sans la mise en perspective de plusieurs éléments importants déjà discutés: premièrement, la VP

possède trois récepteurs produisant des effets différents dépendamment du site et de la quantité de leur expression. Deuxièmement, tout dosage quantitatif de la VP ou de son ARNm dans le cœur englobe le tissu cardiaque avec ses vaisseaux coronaires qui constituent aussi une source de la synthèse de VP. Finalement, il existe une interaction entre l'OTR et les récepteurs de la VP qui sont aussi co-exprimées dans certains tissus. Ultérieurement, il serait intéressant de déterminer la fonction du récepteur V2 cardiaque ainsi que d'établir les effets de la VP sur la différenciation cardiaque dans le contexte d'interaction avec le système de l'OT. Finalement, puisque le cœur est le premier organe fonctionnel et indispensable dans le développement du fœtus, l'importance de la VP dans l'ontogénèse cardiaque devrait être établie.

## RÉFÉRENCES:

1. Verney EB. *The antidiuretic hormone and the factors which determine its release* Proceedings of the Royal Society of London 1947; 135 : 25-105.
2. Baylis PH. *Regulation of vasopressin secretion*. Bailliere's clinical endocrinology and metabolism 1989; vol.3, no.2.
3. Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H. *Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System*. Physiological Reviews 2001 July; Vol. 81, No. 3, pp.1197-1267.
4. Ganong WF. Review of Medical Physiology 1993; Appleton & Lange. pp. 219-222
5. Bankir L. *Antidiuretic action of vasopressin : quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects*. Cardiovascular Research 2001; 51 : 372-390.
6. Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. *Neuroendocrine control of body fluid metabolism*. Physiol Rev. 2004 Jan; 84(1) : 169-208. Review.
7. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. *Science Review : Vasopressin and the cardiovascular system part 1 – receptor physiology*. Critical Care 2003; 7 : 427-343.
8. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. *Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99 : 9550-9555.
9. Skøtt O. *Angiotensin II and control of sodium and water intake in the mouse*. J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003; 284 : R1380-R1381.
10. Kakiya S, Arima H, Yokoi H, Murase T, Yambe Y, Oiso Y. *Effects of acute hypotensive stimuli on arginine vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000; 279 : E886-E892.
11. Birnbaumer M. *Review : The V2 vasopressin receptor mutations and fluid homeostasis*. Cardiovascular Research 2001; 51 : 409-415.
12. Birnbaumer M. *Vasopressin Receptors*. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11 : 406-410.
13. Crozatier B, Delcayre C. *L'étirement des myocytes cardiaques : un facteur adaptatif de la fonction myocardique*. Médecine/Science 1999; 15 : 345-51.

14. Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. *Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor*. Nature 1992; 356 : 523-526.
15. Hirasawa A, Hashimoto K, Tsujimoto G. *Distribution and developmental change of vasopressin V1a and V2 receptor mRNA in rats*. European Journal of Pharmacology 1994; 267 : 71-75.
16. Friesenecker B, Tsai AG, Dunser MW, Mayr AJ, Martini J, Hasibeder W, Intaglietta M. *Oxygen distribution in microcirculation after arginine vasopressin-induced arteriolar vasoconstriction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287 (4) : H1792-800.
17. Simon JS, Baum JS, Moore SA, Kasson BG. *Arginine vasopressin stimulates protein synthesis but not proliferation of vascular endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol. Mar 1995; 25 (3) : 368-375.
18. Nemenoff RA. *Vasopressin signaling pathways in vascular smooth muscle*. Frontiers in Bioscience 1998; 3 : d194-207.
19. Geisterfer AT, Owens GK. *Arginine-vasopressin-induced hypertrophy of cultured rat aortic smooth muscles cells*. Hypertension 1998; 14 : 413-420.
20. Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. *The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists*. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41 : 175-202.
21. Sugimoto T, Saito M, Michizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H. *Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor*. J Biol Chem. 1994; 269 : 27088-27092.
22. Ventura MA, René P, Keyzer Y, Bertagna X, Clauser E. *Gene and cDNA cloning and characterization of the mouse V3/V1b pituitary vasopressin receptor*. Journal of Molecular endocrinology 1999; 22 : 251-260.
23. Lolait SJ, O'Carroll AM, Mahan LC, Felder CC, Button DC, Young WS, Mezey E, Brownstein MJ. *Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92 : 6783-6787 Neurobiology.
24. Burbach H, Adan RA, Lolait SJ, Van Leeuwen FW, Mezey E, Palkovits M, Barberis C. *Molecular neurobiology and pharmacology of the vasopressin/oxytocin receptor family*. Cell Mol Neurobiol. 1995; 15 : 573-595.
25. Gutkowka J, Jankowski M, Lambert C, Mukkadam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. *Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart*. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94 : 11704-11709.

26. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I. *Adult Cardiac Sca-1-positive Cells Differentiate into Beating Cardiomyocytes*. J Biol Chem. 2004 March 19; Vol. 279, Issue 12, 11384-11391.
27. Zeneto-Sevin T, Sada-Ovalie I, Ceballos G, Rubio R, *Effects of Arginine Vasopressin in the heart mediated by specific intravascular endothelial*. European Journal of Pharmacology 2000; 410 : 15-23.
28. Clements JA, Funder JW. *Arginine vasopressin and oxytocin in organs outside the nervous system*. In: Frontiers in Neuroendocrinology, Ed. L. Martini and WF. Ganong. New York : Raven 1988; vol. 10, p.117-152.
29. Simon JS, Brody MJ, Kasson BG. *Characterization of a vasopressin-like peptide in rat and bovine blood vessels*. American Physiological Society 1992; H799-H805.
30. Hupf H, Grimm D, Riegger GA, Schunkert H, *Evidence for a vasopressin system in the rat heart*. Circulation Research 1999; 84 : 365-370.
31. Fukuzawa J, Haneda T, Kikichi K. *Arginine vasopressin increases the rate of protein synthesis in isolated perfused adult rat heart via V1 receptor*. Mol Cell Biochem. 1999; 195 (1-2) : 93-98.
32. Kaygisiz Z, Kabadere TE, Dernek S, Erden SH. *The effects of vasopressin in isolated rat heart*. Indian J Physiol Pharmacol. 2001; 45(1), 54-62.
33. Scott JA, Konstam M, Kolodny GM. *Absence of a direct chronotropic effect of vasopressin on the myocardial cells*. Pharmacology 1982; 24(1) : 57-60.
34. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. *Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 – clinical physiology*. Crit Care 2004 Feb; 8(1):15-23. Epub : 2003 June 26.
35. Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. *Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors*. Endocrinology 1999; 140 : 1301-1309.
36. Liu P, Hopfner RL, Xu YJ, Gopalakrishnan V.J *Vasopressin-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in neonatal rat cardiomyocytes*. Cardiovasc Pharmacol. 1999 Oct; 34(4) : 540-546.
37. Xue-Dong Y; Lian-You Z; Qiang-Sun Z; Xue L. *Effects of Arginine Vasopressin on Growth of Rat Cardiac Fibroblasts : Role of V1 Receptor*. Journal of Cardiovascular Pharmacology 2003; 42 (1) : 132-135.

38. Chandrashekhar Y, Prahash AJ, Sen S, Gupta S, Roy S, Anand IS. *The role of arginine vasopressin and receptors in the normal and failing rat heart*. J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(5) : 495-504.
39. Chomczynski P, Sacchi N, *Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium- thiocyanate- phenol- chloroform extraction*. Anal Biochem. 1989; 162 : 156-9.
40. Park F, Koike G, Cowley A.W, *Regional time-dependent changes in vasopressin V2 receptor expression in the rat kidney during water restriction*. Am J Physiol. 1998. May; 274 (5 Pt 2): F906-13.
41. Méchaly I, Macari F, Laliberté M, F, Lautier C, Serrano J, J, Cros G, Grigorescu F, *Identification by RT-PCR and immunolocalisation of arginine vasopressin in rat pancreas*. Diabetes & Metabolism 1999; 25 : 498-501.
42. Rudnicki MA, McBurney MW. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach*, ed. Robertson, EJ (IRL Press, Oxford, 1987), pp. 19-49.
43. Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, Gutkowska J. *Rat heart : a site of oxytocin production and action*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Nov 24; 95(24) : 14558-63.
44. Ugrumov MV, *Magnocellular vasopressin system in ontogenesis : development and regulation*. Microsc Res Tech. 2002 Jan 15; 56(2) : 164-71.
45. Almazan G, Lefebvre DL, Zingg HH. *Ontogeny of hypothalamic vasopressin, oxytocin and somatostatin gene expression*. Dev Brain Res. 1989; 45 : 69-75.
46. Hartman RD, Rosella-Dampman LM, Emmert SE, Summy-Long JY. *Ontogeny of opioid inhibition of vasopressin and oxytocin release in response to osmotic stimulation*. Endocrinology 1986 Jul; 119(1) : 1-11.
47. Baturina GS, Khodus GR, Nesterov VV, Solenov EI, Ivanova LN. *Vasopressin-dependent water permeability of the basolateral membrane of the kidney outer medullary collecting duct in postnatal ontogenesis in rats*. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 2003 May; 89(5) : 605-612.
48. Nuyt AM, Segar JL, Holley AT, O'Mara MS, Chapleau MW, Robillard JE. *Arginine vasopressin modulation of arterial baroreflex responses in fetal and newborn sheep* Am J Physiol. 1996; 271(6pt2) : R1643-53.
49. Segar JL. *Ontogeny of the arterial and cardiopulmonary baroreflex during fetal and postnatal life*. Am J Physiol. 1997; 273 (2 pt 2) : R457-71.

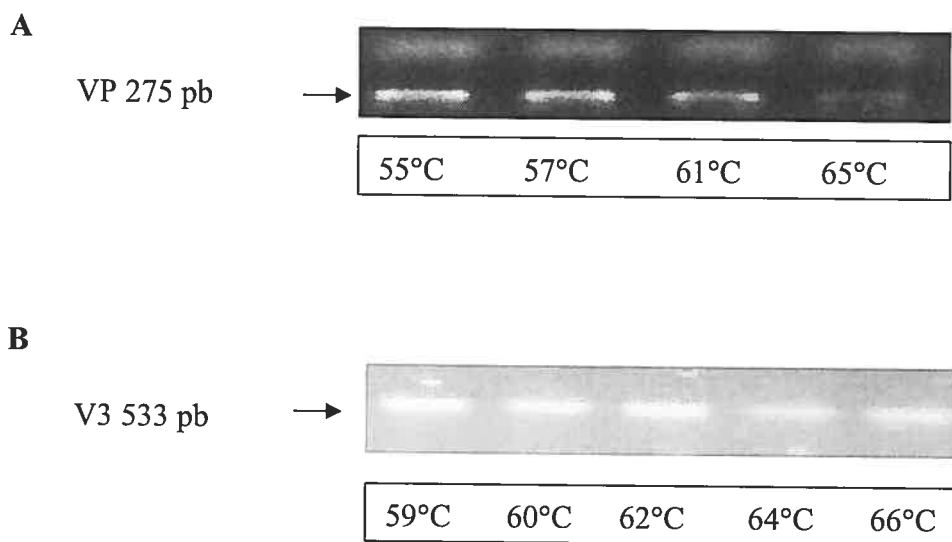
50. Hansenne I, Rasier G, Pequeux C, Brilot F, Renard Ch, Breton C, Greimers R, Legros JJ, Geenen V, Martens HJ. *Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network*. J Neuroimmunol. 2005 Jan; 158(1-2) : 67-75.
51. Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J. *Oxytocin in cardiac ontogeny*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 31; 101 (35) 13074- 9.
52. Scott NA, Cipolla G, Ross, CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN, *Identification of potential Role for the Adventitia in Vascular Lesion Formation After Balloon Overstretch Injury of Porcine Coronary Arteries*. Circulation 1994; 90 pt2 : I-392.
53. Rey EF, Pagano PJ. *The Reactive Adventitia. Perspectives on the Role of fibroblasts Oxidase in Vascular Function*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22 : 1-10.
54. Loesch A, Bodin P, Burnstock G. *Colocalization of endothelin, vasopressin and serotonin in cultured endothelial cells of rabbit aorta*. Peptides 1991 Sep-Oct; 12(5) : 1095-1103.
55. Simon J, Kasson BG. *Identification of vasopressin mRNA in rat aorta*. Hypertension. 1995 May; 25(5) :1030-3.
56. Loesch A, Burnstock G. *Ultrastructural localization of arginine vasopressin in coronary vessels of newborn rat*. Cell Tissue Res. 2000; 299 : 403-408.
57. Bartlestone HJ, Naysmith PA. *Vasopressin potentiation of catecholamine actions on dog, rat, cat and rat aortic strip*. Am. J. Physiol. 1965; 208 : 754-762.
58. Xie Z, Gao M, Batra S, Koyama T. *Remodeling of capillary network in left ventricular subendocardial tissues induced by intravenous vasopressin administration*. Microcirculation 1997; 4 : 261-266.
59. Tomanek RJ, Haung L, Survana PR, O'Brien LC, Ratajska A. *Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor*. Cardiovasc Res. 1996; 31 : E116-E126.
60. Leu M, Ehler E, Perriard JC. *Characterisation of postnatal growth of the murine heart*. Anat Embryol (Berl.) 2001 Sep; 204(3) : 217-24.
61. Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Kusayama T, Wada K, Ishii N, Yatsu U, Taniguchi N, Tanaka A. *Effect of YM471, an orally active non-peptide arginine vasopressin receptor antagonist, on human vascular smooth muscle cells*. J. Hypertens. 2002 Sep; 20(9) : 1807-14.



62. Yang XD, Zhao LY, Zheng QS, Li X. *Effects of arginine vasopressin on growth of rat cardiac fibroblasts : role of V1 receptor.* J Cardiovasc Pharmacol. 2003 Jul; 42(1) : 132-5.
63. Xu YJ, Ouk KS, Liao DF, Katz S, Pelech SL. *Stimulation of 90-and 70-kDa ribosomal protein S6 kinases by arginine vasopressin and lysophosphatidic acid in rat cardiomyocytes.* Biochem Pharmacol. 2000 May 1; 59(9) :1163-71.
64. Devost D, Zingg HH. *Identification of dimeric and oligomeric complexes of the human oxytocin receptor by co-immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer.* J Mol Endocrinol. 2003 Dec; 31(3) : 461-71.
65. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. *Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis.* Mol Endocrinol. 2003 Apr; 17(4) : 677-91.
66. Clerget MS, Elalouf JM, Germain G. *Quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction analysis of oxytocin and vasopressin receptor mRNA in the rat uterus near parturition.* Mol Cell Endocrinol. 1997; 136 : 79-98.
67. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F. *V2-like vasopressin receptor mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat medullary collecting tubules.* Am J Physiol. 1993; 26 : F35-45.
68. Kaufmann JE, Iezzi M, Vischer UM. *Desmopressin (DDAVP) induces NO production in human endothelial cells via V2 receptor- and cAMP-mediated signaling.* J Thromb Haemost. 2003 Apr; 1(4) : 821-828.
69. Page E, Winterfield J, Goings G, Bastawrous A, Upshaw-Earley J. *Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae : osmolarity-dependent reversible internalization.* Am J Physiol. 1998 Jun; 274 (6 Pt 2) : H1988-2000.
70. Patil RV, Han Z, Wax MB. *Regulation of water channel activity of aquaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide.* Biochemical and biophysical research communications 1997; 238 : 329-396 (article no RC977310).
71. Chen Y, Zhao Z, Hertz LJ. *Vasopressin increases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in differentiated astrocytes by activation of V1b/V3 receptors but has no effect in mature cortical neurons.* Neurosci Res. 2000 Jun 15;60(6):761-6.
72. Tiemann K, Weyer D, Djoufack C, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohé C, Fink K. *Increasing myocardial contractiom and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 284 : H464-H474.

73. Weig HJ, Laugwitz KL, Moretti A, Kronsbein K, Stadele C, Bruning S, Seyfarth M, Brill T, Schomig A, Ungerer M. *Enhanced cardiac contractility after gene transfer of V2 vasopressin receptors in vivo by ultrasound-guided injection or transcatheter delivery*. *Circulation* 2000 Apr 4; 101(13) : 1578-85.

## ANNEXE 1 : Exemple d'optimisation de l'amplification des gènes

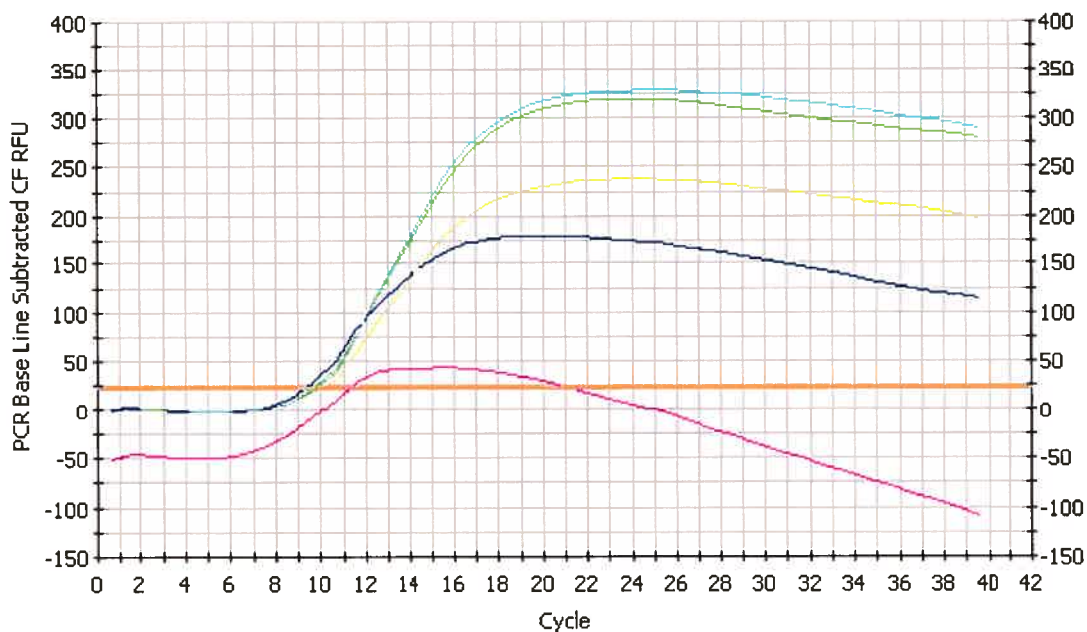
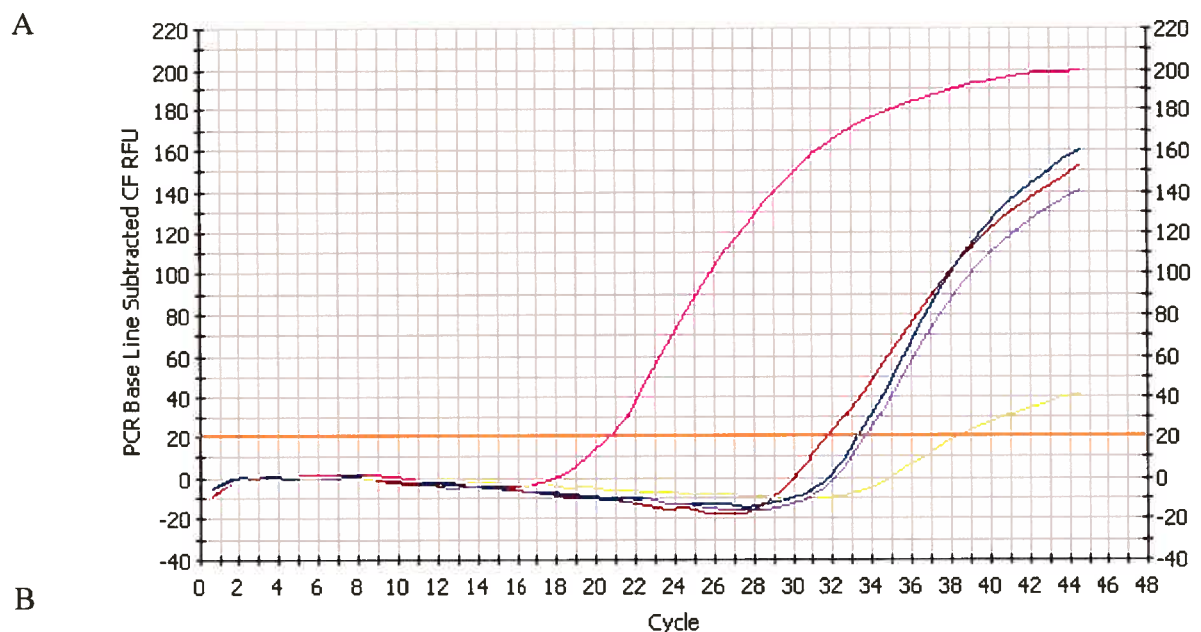


**A.** La température d'anneaulement pour l'amplification d'ARNm de la vasopressine. Le gradient de température a été effectué avec les échantillons d'hypothalamus de rat pour quatre températures (55, 57, 61 et 65 °C) pendant 35 cycles. La température d'anneaulement choisie était de 57°C.

**B.** La température d'anneaulement testée pour l'amplification d'ARNm du récepteur V3 de la vasopressine. Le gradient de température a été effectué sur l'échantillon de l'hypophyse de rat pendant 30 cycles à 59, 60, 62, 64, 66°C. La température choisie était de 60°C.

## ANNEXE 2 : Amplification des gènes de la VP-NE-II et 18S par PCR en temps réel

L'amplification de VP-NE-II (A) dans cinq échantillons de rat: hypothalamus (rose), cœur adult (brun), cœur de 1 jour (bleu), cœur de 5 jours (violet) et cellules cardiaques (cardiomyocytes et fibroblastes) (jaune). L'amplification de 18S (B) : hypothalamus (rose), cœur adult (bleu marin), cœur de 1 jour (jaune), cœur de 5 jours (vert) et cellules cardiaques (cardiomyocytes et fibroblastes) (bleu ciel). La ligne orange correspond au seuil qui est un point de détection du signal et qui permet de trouver le Ct. (cycle threshold) correspondant au cycle auquel le seuil de détection est atteint pour chaque échantillon.



### ANNEXE 3 : Optimisation de la méthode d'extraction de la vasopressine

#### I. Comparaison de rendement d'extraction par Sep-pak et par Vycor en pourcentage :

**Tableau I :** Comparaison de la méthode d'extraction sur billes de verre (Vycor) versus la méthode d'extraction sur la colonne octadecylsilica (C<sub>18</sub>) (Sep-Pak) en présence et en absence (+/-) de L-Cystéine. Une quantité de 8000 cpm de <sup>125</sup>I-AVP a été ajoutée dans les homogénats ou dans le tampon d'homogénéisation et incubée avec le Vycor pendant 30 minutes à la température de la pièce. Le dosage de vasopressine marquée, après l'extraction, permet de calculer le pourcentage de rendement

		SEP – PAK	VYCOR
Homogénat	+ L – Cystine	34 – 41	11 – 20
	- L – Cystine	18 – 37	4 – 11
Tampon	+ L – Cystine	68 – 80	38 – 51
	- L – Cystine	40 – 56	30 – 56

#### II. Amélioration de la méthode d'extraction par Vycor

**Tableau II :** L'influence du pH d'homogénat et du volume de Vycor sur le rendement d'extraction. Les tissus sont homogénéisés dans le tampon à un pH = 3. Le Vycor est suspendu dans l'eau nanopure. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à la température ambiante en absence de L-cystéine et en utilisant 1 ou 0,5 ml de Vycor. Une quantité de 8000 cpm <sup>125</sup>I-VP a été ajoutée dans les homogénats ou dans le tampon d'homogénéisation pour permettre de calculer le pourcentage de rendement en mesurant la quantité de vasopressine marquée après l'extraction.

pH d'homogénat	Volume Vycor en ml	Rendement %
0	0.5	49
	1	28
2	0.5	59
	1	58
4	0.5	59
	1	54

**Tableau III :** L'influence de la température d'incubation (température de la pièce versus 4°C) sur l'extraction, en présence et en absence de L-Cystéine. Les échantillons sont incubés pendant 30 min. avec 1 ml de Vycor. Une quantité de 8000 cpm de  $^{125}\text{I-VP}$  a été ajoutée dans les homogénats ou dans le tampon d'homogénéisation pour permettre de calculer le pourcentage de rendement en mesurant la quantité de vasopressine marquée après l'extraction.

		temp. pièce	temp. 4 °C
Homogénat	+ L – Cystéine	14-18%	60-65%
	- L – Cystéine	12-13%	67-68%
Tampon	+ L – Cystéine	53-56%	63-65%
	- L – Cystéine	51%	78-80%

**Tableau IV :** Influence du pH de l'échantillon extrait sur sa liaison avec l'anticorps.

pH	% liaison Ag- Ac
6	24
6.5	24
6.7	26
6.9	25
7.2	25
7.4	23

Tous les tests ont été effectués par deux personnes indépendantes. Le nombre de réplicats pour chaque condition testée variait entre 4 à 6. Les résultats obtenus ont été comparables; seul les résultats de l'auteur sont résumés dans les tableaux.

#### ANNEXE 4 : Optimisation des essais immunocytochimiques

**Tableau I :** Regroupement des résultats des tests pour des contrôles positifs de l'immunocytochimie (ICC) effectués avec les anticorps contre la vasopressine et les récepteurs V1 et V2 (Cederlane). Les essais ont été faits sur des coupes de reins, du cerveau et de l'aorte de rat adulte et la réaction a été révélée par la méthode de Zymed. Intensité de l'ICC : nd : non-déecté; ± : très faible; + à +++++ : faible à intense.

Tissu	VP	V1R	V2R
Reins :			
Zone médullaire	nd	+	++++
Zone du cortex	nd	+++	±
Cerveau :			
Noyaux supraoptiques	++++	nd	nd
Vaisseaux :			
Tunique externe (fibroblastes)	+++++	+	±
Tunique moyenne (muscles lisses)	nd	+++	nd
Tunique interne (endothélium)	nd	nd	nd

## ANNEXE 5 : Séquence du produit de PCR du gène V2 dans le coeur de rat

Résultats de séquençage automatique pour les échantillons cardiaques et rénaux. Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide du programme USC Sequence Alignment Server (format BLAST) et les résultats trouvés, alignés correspondent à la séquence de *Rattus norvegicus*.

### Récepteur V2 de la vasopressine – séquence R

```
CNNNNCCAATACNNCTATGGCCATGACANTAGACCGCCATCGTGCCATCTGCCGCCCTA
TGCTAGCATACCGCCATGGAGGTGGGGCTCGCTGGAACAGGCCAGTGCTGGTGGCCTGGG
CCTTCTCACTCCTTCTCAGCCTGCCTCAGCTCTTCATCTTTGCTCAGCGTGATGTGGGAA
ATGGCAGTGGGGTGTGGATTGCTGGGCCGATTTGCAGAACCATGGGGCCTTCGTGCCT
ATGTCACCTGGATTGCCTTGATGGTGTGGTGGCACCTGCCCTAGGCATTGCTGCCTGTC
AGGTTCTTATCTCCGGGAGATACACGCCAGTCTGGTGCCAGGGCCATCCGAGAGGGCAG
GGAGGGCGCCGANAGGGCGCCGGACAGGAAGCCCCAGCGAGGGAGCACATGTATCAGCAG
CCATGGCCAAGACCGTGAGGATGACACTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

### Récepteur V2 de la vasopressine – séquence F

```
CCANAGGNNGNNNGGAAGAGCANGATCNTCCCTCGCTGGGGCTTCCTGATCCAGGGCGCC
TCTGCGGCACCTCCCTGCCCTCTCGGATGGCCCTGGCACCAGACTGGCGTGTATCTCCCG
GAAGATAAGAACCTGACAGGCAGCAATGCCTAGGGCAGGTGCCACAAACACCATCAAGGC
AATCCAGGTGACATAGGCACGAAGGCCCATGGTTCTGCAAATCGGGCCAGCAATCAAA
CACCCCACTGCCATTTCCACATCACGCTGAGCAAAGATGAAGAGCTGAGGCAGGCTGAG
AAGGAGTGAGAAGGCCAGGCCACCAGCACTGGCCTGTTCCAGCGAGCCCCACCTCCATG
GCGGTATGCTAGCATAGGGCGGCAGATGGCACGATGGCGGTCTAGTGTCATGGCCAGGAT
CATGTAGGAGGAGGCATACATGCCACCANTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```



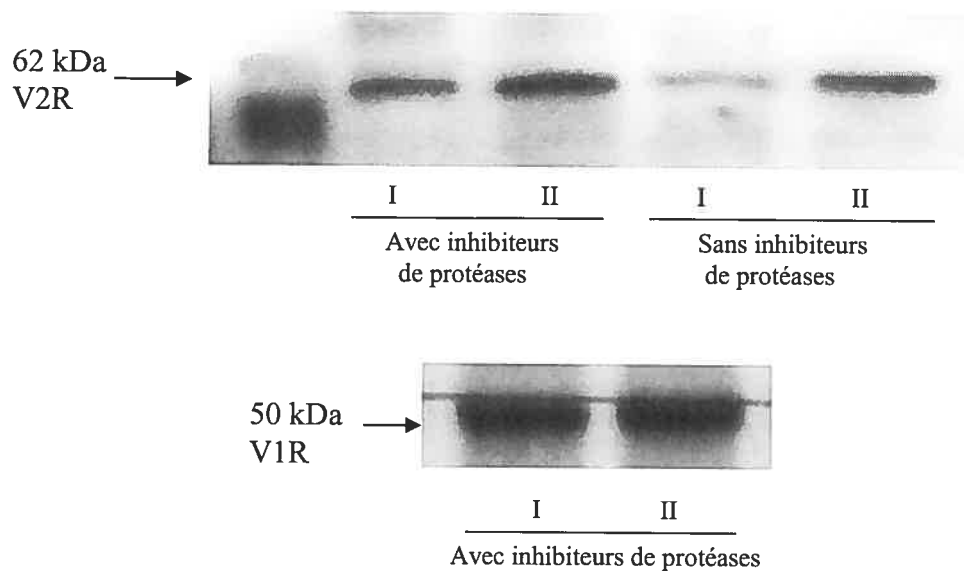
Vérification des résultats du produit PCR pour le récepteur V2 par le séquençage automatique. Résultat de l'alignement de la séquence du récepteur V2 cardiaque obtenue par RT-PCR avec la séquence de la banque des gènes à l'aide de BLAST 2.

```

Query: 16  tccctcgctggggcttctgatccaggcgccctctgcggcacctccctgccctctcggat
75  |||
Sbjct: 777  tccctcgctggggcttctg-tcc-ggcgccctctgcggcgccctccctgccctctcggat
720
Query: 76  ggccctggcaccagactggcgtgtatctcccgaagataagaacctgacaggcagcaatg
135  |||
Sbjct: 719  ggccctggcaccagactggcgtgtatctcccgaagataagaacctgacaggcagcaatg
660
Query: 136  cctagggcaggtgccacaaacacatcaaggcaatccagggtgacataggcacgaaggccc
195  |||
Sbjct: 659  cctagggcaggtgccacaaacacatcaaggcaatccagggtgacataggcacgaaggccc
600
Query: 196  catggttctgcaaatcgggccagcaatcaaacaccccactgccatttcccacatcacgc
255  |||
Sbjct: 599  catggttctgcaaatcgggccagcaatcaaacaccccactgccatttcccacatcacgc
540
Query: 256  tgagcaaagatgaagagctgaggcaggctgagaaggagtgagaaggcccaggccaccagc
315  |||
Sbjct: 539  tgagcaaagatgaagagctgaggcaggctgagaaggagtgagaaggcccaggccaccagc
480
Query: 316  actggcctgttcagcgagccccacctccatggcggtatgctagcatagggcggcagatg
375  |||
Sbjct: 479  actggcctgttcagcgagccccacctccatggcggtatgctagcatagggcggcagatg
420
Query: 376  gcacgatggcgggtctagtgtcatggccaggatcatgtaggaggaggcatacatgcccacc
435  |||
Sbjct: 419  gcacgatggcgggtctagtgtcatggccaggatcatgtaggaggaggcatacatgcccacc
360

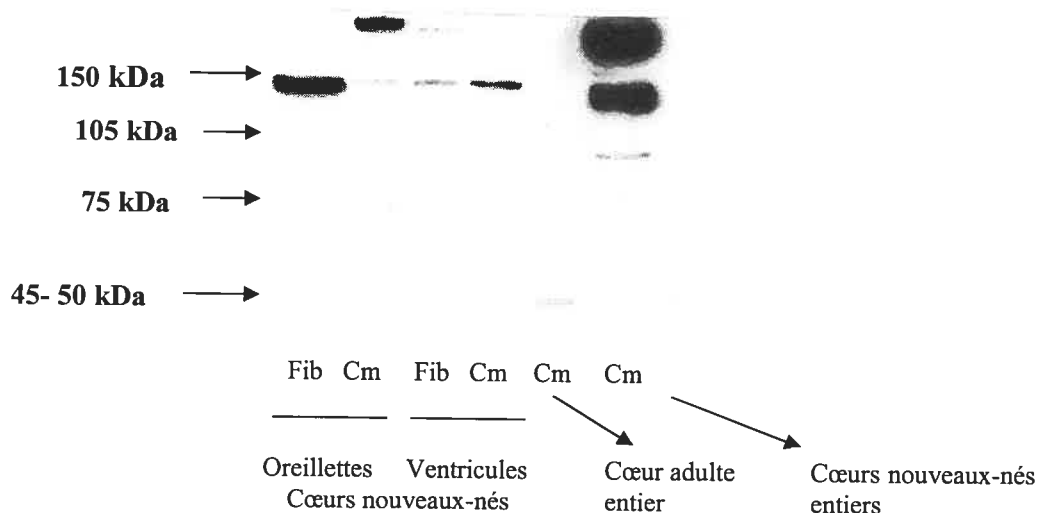
```

## ANNEXE 6 : Optimisation du Western-blot pour récepteurs V1 et V2



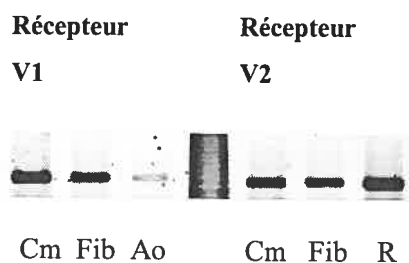
Optimisation des conditions de Western-blot pour les anticorps polyclonaux contre les récepteurs V1 et V2 dans les reins. Les membranes ont été préparées selon la méthode décrite dans le chapitre de matériel et méthodes. Les échantillons ont été pris à deux étapes de la préparation membranaire : après la première et après la deuxième centrifugation (I vs II). La présence et l'absence des inhibiteurs des protéases (no. P8340, Sigma) pendant l'homogénéisation aussi été testée. La préparation des membranes optimale contenait l'absence des inhibiteurs et une deuxième centrifugation.

### ANNEXE 7 : Présence de deux formes moléculaires de V1 dans les cellules cardiaques isolées obtenue par Western-blot



Deux formes moléculaires, 45-50 et 150 kDa, pour le récepteur V1 de la vasopressine obtenues par la méthode de Western-blot dans les cellules cardiaques isolées des cœurs des rats adultes et nouveaux-nés. Les cardiomyocytes (Cm) et les fibroblastes (Fib) ont été isolées et les membranes cellulaires ont été préparées par les méthodes décrites dans le chapitre matériels et méthodes. Les dilutions anticorps utilisées étaient de 1 : 5000.

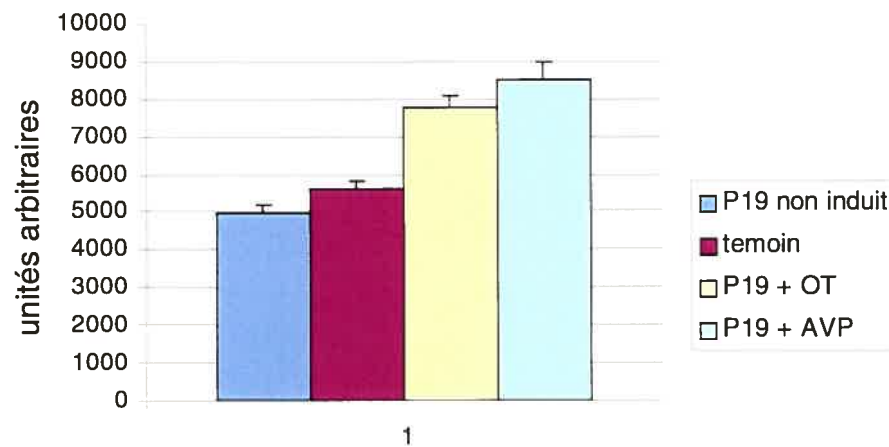
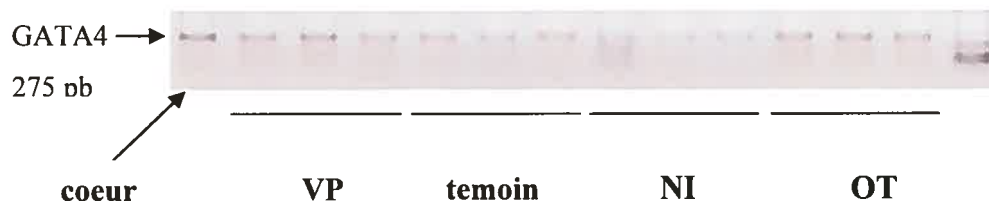
## ANNEXE 8 : Présence des transcrits de V1 et V2 dans les cellules cardiaques



L'amplification des récepteurs V1 et V2 vasopressinergiques par RT-PCR dans les cardiomyocytes (Cm) et fibroblastes (Fib) de rats nouveaux-nés. Les cardiomyocytes et les fibroblastes ont été isolées des cœurs de rats nouveaux-nés et les ARNm isolés à partir des ces cellules ont été transcrits et amplifiés par les méthodes décrites dans le chapitre matériels et méthodes, en utilisant les mêmes amorces que pour les échantillons tissulaires. Les échantillons de l'aorte (Ao) et de rein (R) ont servi comme contrôle positif de l'essai pour V1 et V2 respectivement.

## ANNEXE 9 : Induction de GATA 4 dans les cellules P19 en présence de la vasopressine

Résultats préliminaires démontrant l'induction du gène GATA 4, marqueur de la différenciation cardiaque, suite à la stimulation des cellules P19 avec la VP ( $10^{-6}$ ) ou l'OT ( $10^{-6}$ ). Les cellules ont été stimulées pendant 4 jours et cultivées jusqu'au jour 14.



## ANNEXE 9 : Induction de GATA 4 dans les cellules P19 en présence de la vasopressine

Résultats préliminaires démontrant l'induction du gène GATA 4, marqueur de la différenciation cardiaque, suite à la stimulation des cellules P19 avec la VP ( $10^{-6}$ ) ou l'OT ( $10^{-6}$ ). Les cellules ont été stimulées pendant 4 jours et cultivées jusqu'au jour 14.

