

Université de Montréal

*Altération des mécanismes physiologiques et moléculaires
par un supplément sodique au cours de la gestation chez
la rate : modèle animal de pré-éclampsie.*

Par
Annie Beauséjour

Département d'obstétrique et Gynécologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctorae (PhD)
En Sciences Biomédicales

Août 2006

© Annie Beauséjour, 2006



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

*Altération des mécanismes physiologiques et moléculaires
par un supplément sodique au cours de la gestation chez
la rate : modèle animal de pré-éclampsie.*

Présentée par:
Annie Beauséjour

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Edgar Delvin
président rapporteur

Michèle Brochu
directrice de recherche

Alzbeta Chorvatova
membre du jury

Cathy Vaillancourt
examineur externe

« L'expérience est une bougie qui n'éclaire que celui qui la porte »

- Confucius

SOMMAIRE FRANÇAIS

La grossesse est une condition particulière où l'organisme maternel subit plusieurs changements physiologiques et moléculaires afin de s'adapter au fœtus et lui fournir les nutriments nécessaires à sa croissance. La pré-éclampsie est une pathologie hypertensive de la grossesse dont l'étiologie est encore inconnue. Ce désordre est accompagné d'une protéinurie et, dans certain cas, d'une restriction de croissance intra-utérine. De plus, une augmentation des marqueurs d'oxydation ainsi qu'une diminution de la capacité anti-oxydante sont observées tant au niveau plasmatique que placentaire chez les femmes souffrant de cette pathologie suggérant l'implication du stress oxydatif.

Dans le laboratoire, nous avons développé un modèle animal chez la rate en donnant un supplément sodique (0.9 ou 1.8% NaCl) dans l'eau de breuvage pendant 7 jours consécutifs correspondant à la dernière semaine de gestation. Les rates non-gestantes s'adaptent à une surcharge en sodium et maintiennent l'homéostasie sodée ainsi que la pression artérielle à des valeurs normales. Toutefois, lorsque donné pendant la gestation, le supplément 0.9% empêche la baisse de pression artérielle observée lors d'une gestation normale tandis que le supplément sodique 1.8% élève la pression artérielle et induit une protéinurie ainsi qu'une restriction de croissance intra-utérine correspondant à notre modèle de pré-éclampsie expérimentale. Ces résultats démontrent le nouvel équilibre qui se met en place pendant la grossesse peut être facilement déstabilisé par un supplément sodique. Nous émettons l'hypothèse qu'un apport riche en sodium induit un stress oxydatif au sein des organes cibles responsables de la nutrition fœtale et de la régulation de la pression artérielle. Ainsi, le premier objectif de cette thèse était de déterminer si, dans notre modèle animal, la présence d'un déséquilibre entre les forces oxydantes et anti-oxydantes était retrouvée dans le placenta. Le second objectif de mes travaux était d'analyser des paramètres selon leur implication dans le stress oxydatif/nitrosatif, l'apoptose, l'inflammation, le transport du sodium et le métabolisme du glucose dans le rein et le cœur.

Nous avons démontré, dans les placentas de rates recevant le supplément sodique 1.8%, une augmentation du stress oxydatif tel qu'indiqué par une élévation des niveaux de 8-iso-PGF_{2α}, marqueur de peroxydation lipidique. De plus, nos résultats suggèrent un déséquilibre dans la production des prostanoïdes favorisant la vasoconstriction. Ces résultats corrént avec les données obtenues dans des placentas de femmes pré-éclamptiques. De plus, cette condition oxydative pourrait induire des dommages à l'endothélium vasculaire et contribuer à l'augmentation de la résistance placentaire ainsi qu'à la diminution de la perfusion foeto-placentaire. Ce phénomène pouvant mener à une restriction de croissance intrautérine

Dans le rein, la gestation entraîne une augmentation de l'expression des nitrotyrosines, suggérant que la grossesse est, elle-même, une condition oxydative/nitrosative. Cependant, les adaptations de l'organisme maternel qui se produisent permettent de maintenir un équilibre adéquat. Par contre, lors d'un supplément sodique, la réponse maternelle est différente. Nos résultats démontrent qu'un supplément sodique de 1.8% au cours de la gestation induit un stress oxydatif rénal, une diminution de l'activité de la Na⁺,K⁺-ATPase ainsi qu'une augmentation de l'apoptose comparativement aux rates gestantes témoins. Ces résultats suggèrent qu'avec un supplément sodique, les limites de l'homéostasie cellulaire sont dépassées et que le stress oxydatif est amplifié. Puisque la réponse physiologique des rates non-gestantes est adéquate au maintien de leur homéostasie sodée et que les marqueurs de stress oxydatif ne sont pas changés par le supplément sodique, les travaux effectués dans le ventricule gauche cardiaque ont été effectués seulement chez les rates gestantes. Dans le cœur, nous avons observé, suite au supplément sodique 1.8%, la présence d'un stress oxydatif ventriculaire. En effet, nous avons noté une augmentation des nitrotyrosines ainsi qu'une diminution de la superoxyde dismutase, première enzyme de défense contre les forces oxydantes. Nos résultats suggèrent aussi une altération du métabolisme cardiaque puisque l'activité de l'aconitase, deuxième enzyme du cycle de Krebs est diminuée.

En conclusion, l'étude des manifestations qui surviennent au cours de la grossesse et de ses pathologies est possible grâce à l'élaboration de modèles animaux tels que celui que nous avons développé au cours de mes études. Mes travaux, en accord avec la littérature, démontrent que la gestation elle-même est une condition oxydante. De plus, les résultats présentés dans cette thèse indiquent qu'un nouvel équilibre physiologique et cellulaire est mis en place au cours de la grossesse, et que celui-ci peut être très sensible à une insulte maternelle. Ceci pouvant conduire à une réponse inappropriée de la grossesse et affecter la croissance foetale. De par les résultats obtenus par ces travaux, nous considérons que notre modèle animal est un outil précieux pour l'étude des mécanismes impliqués lors de la grossesse et de la pré-éclampsie. Ces travaux nous apportent une meilleure compréhension des atteintes physiologiques et cellulaires rencontrées en fin de gestation lorsque celle-ci est soumise à une insulte. De plus, ce modèle nous permettra de faire un suivi tout au long de la grossesse afin de déterminer quand l'insulte maternelle, ici le supplément sodique, devient nuisible.

MOTS CLÉS : Grossesse, pré-éclampsie, stress oxydatif, rein, placenta, cœur.

SOMMAIRE ANGLAIS

Pregnancy is a particular condition where several physiological and molecular changes occur in the maternal body to supply fetal demand. Preeclampsia is a hypertensive disorder of pregnancy accompanied by proteinuria and intrauterine growth restriction. The aetiology of this disease is not totally understood. However, there is mounting evidence that oxidative stress in circulation and placental tissues could play a pivotal role in the development of preeclampsia.

We developed an animal model by giving high sodium supplement (0.9 or 1.8% NaCl) to rats for 7 consecutive days corresponding to the last week of gestation. In nonpregnant rats, these supplements induced adjustments that conserve their sodium homeostasis and blood pressure levels at normal range. However, in pregnant rats, these supplement lead to experimental preeclampsia. Sodium supplementation of 0.9% prevents the decrease in blood pressure that normally occurs during gestation while 1.8% NaCl induces a rise in blood pressure, proteinuria and intrauterine growth restriction. These results show that the new equilibrium that takes place during pregnancy could be easily destabilized by high sodium supplementation. To better understand cellular mechanisms implicated in these modifications, we hypothesized that oxidative stress is present in target organs responsible for fetal nutrition and regulation of blood pressure. Thus, the first objective was to determine, in our animal model, if an imbalance between oxidative and antioxidative forces in favour of oxidation occurs in placenta. The second objective was to analyse parameters according to their role in oxidative/nitrosative stress, apoptosis, inflammation, sodium transport and glucose metabolism in the kidney and heart, both implicated in blood pressure regulation.

We have shown, in placenta from rats receiving 1.8% sodium supplement an increase in oxidative stress as indicated by an elevation in 8-isoPGF_{2α} levels, a marker of lipid peroxidation. We also have noted an imbalance in the production of prostanoides in support of vasoconstriction. These results suggest the presence of placental oxidative stress and correlate with data in human preeclampsia. Moreover, this oxidative condition

could induce vascular endothelial damage and contribute to increased placental resistance and decreased fetoplacental perfusion. This could lead to a decrease in blood supply to the fetus and thus intrauterine growth restriction.

In the kidney, we have observed a pregnancy-induced increase in nitrotyrosine expression, marker of nitrosative stress, suggesting that gestation *per se* is an oxidative/nitrosative condition. However, maternal adaptation occurs to maintain this new equilibrium. When high sodium supplement is given, maternal cellular response is different. In fact, we have shown that 1.8% NaCl solution induces renal oxidative stress, as well as decreases in Na⁺,K⁺-ATPase activity and apoptosis compared to control pregnant rats. These results suggest that with high salt intake, the boundaries of cellular homeostasis are exceeded and oxidative stress occurs. Since nonpregnant rats under condition of high salt supplementation are able to conserve their sodium homeostasis and as oxidative stress was not detected in kidneys of these rats, cardiac left ventricle studies were done only in pregnant rats. A 1.8% NaCl solution induced an oxidative stress in the hearts of pregnant rats. In fact, we have observed an increase in nitrotyrosine expression and a decrease in superoxide dismutase activity, first line enzymes in oxidative stress defence. Our results also suggest an alteration in cardiac metabolism since aconitase activity, the second Krebs cycle enzyme, was decreased.

In conclusion, the study of manifestations which occur during pregnancy and related pathologies is possible with the development of animal models such as the one that we developed. My work, in agreement with the literature, shows that gestation *per se* is an oxidative condition. Moreover, results presented in this thesis indicate that a new cellular equilibrium takes place during pregnancy, that is particularly vulnerable when maternal insult occurs. This leads to an inappropriate response of pregnancy and could affect fetal growth. From the results obtained during my studies, we consider that our animal model is an invaluable tool to study the mechanisms implicated during pregnancy and pre-eclampsia. This work gives us a better understanding in physiological and cellular adaptation implicated in an inappropriate response of pregnancy following

maternal insult. Moreover, this model will enable us to do time course studies during gestation in order to determine when maternal insult, in this case sodium supplementation becomes harmful. Thus, we will be able to know, at which time the cellular mechanisms become different between pregnant rats on high salt and control ones.

KEY WORDS: pregnancy, preeclampsia, oxidative stress, kidneys, placenta, heart.

TABLE DES MATIÈRES

Page de présentation de la thèse	I
Page de présentation du jury	II
Sommaire français	IV
Sommaire anglais	VI
Table des matières	X
Liste des figures	XIII
Liste des tableaux	XV
Liste des abréviations	XVI

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION **1**

1	PHYSIOLOGIE RÉNALE	2
1.1	ARCHITECTURE ET STRUCTURES RÉNALES	2
1.1.1	Le néphron	3
1.1.1.1	Le corpuscule rénal.....	3
1.1.1.1.1	Barrière de filtration	4
1.1.1.1.2	Appareil juxtaglomérulaire	5
1.1.1.2	Le tubule rénal	6
1.1.1.2.1	Tubule proximal	7
1.1.1.2.2	Anse de Henlé.....	8
1.1.1.2.3	Tubule distal	9
1.1.1.2.4	Tubule collecteur	10
1.1.2	Fonctions endocrines du rein.....	11
1.2	SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONÉ	11
1.2.1	Actions de l'angiotensine II.....	13
1.2.2	L'aldostérone.....	14
2	PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE	15
2.1	ANATOMIE.....	15
2.2	MÉTABOLISME CARDIAQUE	17
2.2.1	Le cycle de l'acide citrique	18
3	SIGNALISATION CELLULAIRE	19

3.1	MONOXYDE D'AZOTE	19
3.1.1	Synthèse du NO.....	19
3.1.2	Actions physiologiques du NO	21
3.2	EICOSANOÏDES	22
3.2.1	Biosynthèse des eicosanoïdes.....	22
3.2.2	Actions physiologiques des eicosanoïdes	23
3.3	CYTOKINES ET CHÉMOKINES.....	24
3.3.1	Facteur de nécrose tumoral	25
3.3.2	Facteur de croissance du tissu conjonctif.....	25
3.3.3	Chémokine chimiotactique des monocytes.....	26
3.4	STRESS OXYDATIF ET NITROSATIF	26
3.4.1	Dérivés réactifs de l'oxygène	27
3.4.2	Dérivés réactifs de l'azote.....	29
3.4.3	Cibles des ROS et RNOS.....	29
3.4.3.1	Peroxydation lipidique.....	30
3.4.3.2	Oxydation et nitration protéique.....	31
3.4.4	Systèmes antioxydants.....	33
3.4.4.1	Les vitamines.....	33
3.4.4.2	Le glutathion et la glutathion peroxydase.....	34
3.4.4.3	La superoxyde dismutase et la catalase	35
3.5	MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE.....	35
3.5.1	Caractéristiques morphologiques et biochimiques.....	36
3.5.2	Effecteurs de l'apoptose.....	37
3.5.2.1	La famille bcl-2	38
3.5.2.2	Les caspases.....	39
4	LA GROSSESSE.....	41
4.1	SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE.....	42
4.2	SYSTÈME RÉNAL	43
4.2.1	Système rénine-angiotensine	44
4.3	SYSTÈME ENDOCRINIEN	45
4.4	ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES	46
4.5	LE PLACENTA	47
4.5.1	Le développement du placenta	47
4.5.2	Circulation foeto-maternelle	51
4.5.3	Fonctions endocrines du placenta	52

5	CONDITIONS HYPERTENSIVES DE LA GROSSESSE.....	54
5.1	CLASSIFICATION	55
5.1.1	Pré-éclampsie : Hypothèses postulées	55
5.1.1.1	Défaut de placentation	56
5.1.1.2	Réponse inflammatoire non contrôlée	57
5.1.1.3	Hypothèse de nature génétique.....	57
5.1.1.4	Hypothèse à caractère immunologique.....	58
5.1.1.5	Déséquilibre entre les forces oxydantes et anti-oxydantes	58
6	MODÈLE ANIMAL DE PRÉÉCLAMPSIE	60
7	HYPOTHÈSE	62
	<u>CHAPITRE 2</u>	<u>63</u>
	PLACENTAL OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF PREECLAMPSIA	63
	<u>CHAPITRE 3</u>	<u>91</u>
	MATERNAL INSULT DURING RAT PREGNANCY LEADS TO ALTERED KIDNEY AND CARDIAC MECHANISMS	91
	<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	<u>127</u>
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>147</u>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	<i>Anatomie descriptive du rein et du néphron</i>	3
Figure 2 :	<i>Résumé de la filtration et de la réabsorption dans le néphron et le tubule collecteur</i>	7
Figure 3 :	<i>Principales protéines de transport dans la portion initiale et finale du tubule proximal, l'anse de henlé, le tubule distal et le tubule collecteur</i>	10
Figure 4 :	<i>Cascade bioenzymatique du système rénine-angiotensine</i>	12
Figure 5 :	<i>Anatomie descriptive du cœur</i>	16
Figure 6 :	<i>Cycle du citrate (cycle de krebs ou des acides tricarboxyliques)</i>	19
Figure 7 :	<i>Synthèse, dégradation et principales actions physiologiques du NO. (BH4) tetrahydrobioptérine, (FAD) Flavine adénine dinucléotide, (FMN) Flavine mononucléotide, (GCs) Guanylate cyclase soluble, (ONOO-) peroxyinitrite</i>	20
Figure 8 :	<i>Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes</i>	23
Figure 9 :	<i>Formation des isoprostanes</i>	27
Figure 10 :	<i>Implication du NO et de l'anion superoxyde dans la formation de la 3-nitrotyrosine</i>	31
Figure 11 :	<i>Systèmes oxydants et anti-oxydants de la cellule</i>	32
Figure 12 :	<i>Cascade apoptotique</i>	41
Figure 13 :	<i>Développement du placenta humain</i>	47
Figure 14 :	<i>Structure définitive du placenta</i>	48
Figure 15 :	<i>Implantation des embryons et formation du placenta chez la rate gestante</i>	49
Figure 16 :	<i>Structure définitive du placenta chez la rate gestante</i>	50
Figure 17 :	<i>Influence d'un stress oxydatif sur la production de prostacycline et thromboxane</i>	59
Figure 18 :	<i>Schéma proposé des évènements survenant dans le placenta des rates recevant un supplément sodique 1.8%</i>	130
Figure 19 :	<i>Schéma proposé des évènements survenant dans le rein des rates recevant un supplément sodique 1.8%</i>	132

Figure 20 :	<i>Schéma proposé des évènements survenant dans le ventricule gauche des rates recevant un supplément sodique 1.8%</i>	134
Figure 21 :	<i>Modèle proposé selon lequel la vitamine E préviendrait la transition entre Th1 et Th2 au cours de la pré-éclampsie</i>	138
Figure 22 :	<i>Représentation schématique de l'invasion trophoblastique dans le placenta de rat</i>	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : <i>Principales protéines affectées par la nitration</i>	32
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	: Acide arachidonique
Acetyl CoA	: Acétyl Coenzyme A
ACTH	: <i>Adrenocorticotrophine hormone</i> (Adrénocorticotrophine)
ADP	: Adénosine diphosphate
AMP	: Adénosine monophosphate
ANGI	: Angiotensine I
ANGII	: Angiotensine II
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AT ₁	: Récepteur d'angiotensine II de type 1
AT ₂	: Récepteur d'angiotensine II de type 2
ATP	: Adénosine triphosphate
BH ₄	: <i>Tetrahydrobiopterine</i> (tétrahydrobioptérine)
Ca ²⁺	: Calcium
CAT	: Catalase
CED	: <i>C.elegans death</i>
CG	: <i>Chorionique Gonadotrophine</i> (Gonadotrophine chorionique)
Cl ⁻	: Chlore
COX	: Cyclooxygénase
CTGF	: <i>Connective tissu growth factor</i> (Facteur de croissance du tissu conjonctif)
CRH	: <i>Corticotrophin releasing hormone</i> (Corticolibérine)
DFG	: Débit de filtration glomérulaire
DHA	: <i>Dehydroascorbic acid</i> (Acide dehydroascorbique)
ECA	: Enzyme de conversion de l'angiotensine
EDRF	: <i>Endothelium derived relaxing factor</i> (Facteur relaxant dérivé de l'endothélium)
ENaC	: <i>Endothelial sodium channel</i> (Canal sodique sensible à l'amiloride)
FAD	: Flavine adénine nucléotide

Fe ²⁺	: Fer
FMN	: Flavine mononucléotide
GMPc	: Guanosine 3', 5'-cyclique monophosphate
GPx	: Glutathion peroxydase
GR	: Glutathion réductase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
GTP	: Guanosine 1', 3', 5'-triphosphate
H ₂ O ₂	: Peroxyde d'hydrogène
hCG	: <i>Human chorionic gonadotrophin</i> (Hormone gonadotrophine chorionique humaine)
HNE	: Hydroxynonenal
hPL	: <i>Human placental lactogen</i> (Hormone lactogène placentaire humaine)
IP ₃	: Inositol 1-4-5- triphosphate
K ⁺	: Potassium
kDa	: Kilodalton
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractan protein</i> (Protéine chimiotactique des monocytes)
MDA	: Malondyaldéhyde
Mg ²⁺	: Magnésium
MR	: <i>Mineralocorticoid receptors</i> (Récepteurs des minéralocorticoïdes)
Na ⁺	: Sodium
NaCl	: Chlorure de sodium
NHE	: <i>Na⁺-H⁺ exchanger</i> (Échangeur sodium proton)
NKCC	: <i>Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport</i> (Cotransporteur sodium, potassium et chlore)
NO	: <i>Nitric oxide</i> (Monoxyde d'azote)
NOS	: <i>Nitric oxide synthase</i> (Synthase de monoxyde d'azote)
O ₂ ^{•-}	: Anion superoxyde
OH [•]	: Radical hydroxyle
ONOO ⁻	: Peroxinitrite

PG	:	Prostaglandine
PLA ₂	:	Phospholipase A ₂
PO ₄ ²⁻	:	Phosphate
PRA	:	<i>Plasma renin activity</i> (activité rénine plasmatique)
RNOS	:	<i>Reactive nitrogen oxigen species</i> (Dérivés réactifs de l'azote)
ROS	:	<i>Reactive oxigen species</i> (Dérivés réactifs de l'oxygène)
SOD	:	Superoxyde dismutase
SRA	:	Système rénine-angiotensine
SRAA	:	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TGF	:	<i>Transforming growth factor</i> (Facteur de croissance transformant)
TNF	:	<i>Tumor necrosis factor</i> (Facteur de nécrose tumoral)
VEGF	:	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

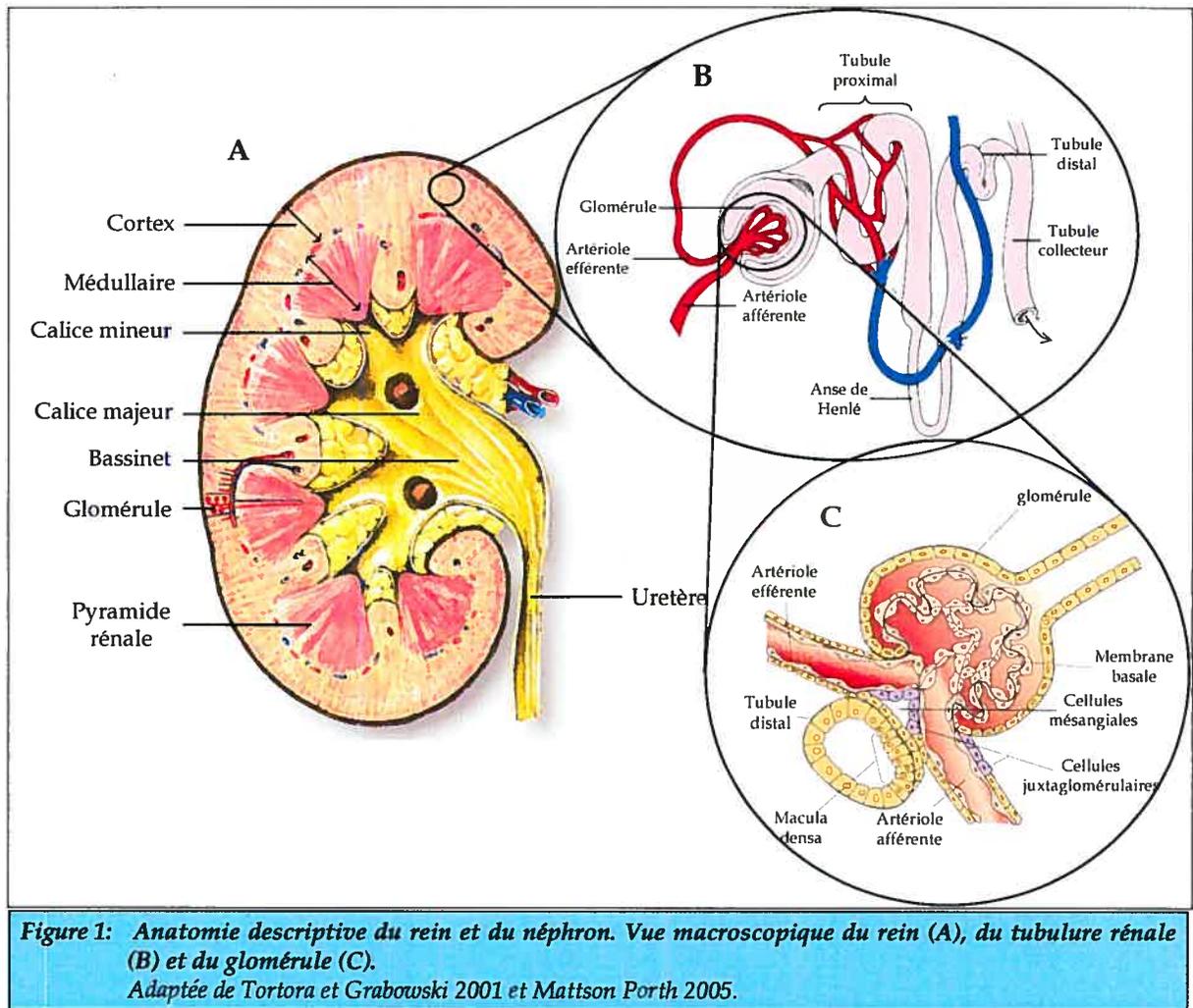
La grossesse est une condition particulière où plusieurs systèmes sont modifiés afin de permettre la croissance et le développement adéquat du fœtus. Des pathologies hypertensives, telle que la pré-éclampsie, peuvent survenir au cours de la grossesse et entraver son déroulement normal. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de la grossesse et ses pathologies, une revue générale des systèmes rénal et cardiaque ainsi que des différents mécanismes physiologiques et moléculaires qui les régissent sera faite. Par la suite, les changements survenant au cours de la grossesse et de l'hypertension de grossesse seront revus.

1 PHYSIOLOGIE RÉNALE

"Les os peuvent se fracturer, les muscles s'atrophier, les glandes se dérégler. Le cerveau, quant à lui, peut s'endormir sans menacer immédiatement la survie. Par contre, si les reins viennent à manquer...ni les os, ni les muscles, ni les glandes, ni le cerveau ne peuvent continuer à fonctionner." – Dr. Homer Smith, spécialiste des fonctions rénales ¹.

1.1 ARCHITECTURE ET STRUCTURES RÉNALES

Les reins sont les organes maîtres-chimistes de l'organisme. Ils filtrent le sang et forment l'urine contribuant ainsi à maintenir l'équilibre des liquides de l'organisme. Chez l'humain, les reins sont rétropéritonéaux et paravertébraux pesant chacun approximativement 150g. Ce sont des organes richement vascularisés qui reçoivent près de 25 % du débit cardiaque. Le rein se divise en deux zones distinctes : le cortex et la médullaire (Figure 1A). Le cortex est composé des corpuscules rénaux, des tubules proximaux et distaux ainsi que d'une partie des tubules collecteurs. Chez l'homme, la médullaire est divisée en 8 à 18 masses coniques striées, les pyramides rénales, dont les bases sont situées à la frontière cortico-médullaire et dont les apex s'étendent vers le centre du rein pour former des papilles. À l'extrémité de chaque papille se trouvent 10 à 25 petites ouvertures qui représentent la fin des tubules collecteurs. Les papilles se rejoignent pour former des calices mineurs et majeurs convergeant vers un unique bassinnet. À sa sortie du rein, le bassinnet devient l'uretère qui descend jusqu'à la vessie ^{2,3}.



1.1.1 LE NÉPHRON

Le néphron constitue l'unité fonctionnelle du rein. À eux deux, les reins possèdent un peu plus de 2 millions de néphrons chez l'humain et environ 60 000 chez le rat ⁴. Ils accomplissent trois grandes tâches : la filtration du sang, la réabsorption dans le sang de substances utiles et l'excrétion de substances nuisibles pour l'organisme. Les néphrons sont formés de deux parties, le corpuscule rénal où le sang est filtré et une partie tubulaire où les fonctions de réabsorption et d'excrétion s'accomplissent.

1.1.1.1 LE CORPUSCULE RÉNAL

Le corpuscule comprend le glomérule et la capsule glomérulaire ou de Bowman. Le corpuscule rénal est un ensemble de capillaires sanguins favorisant la filtration du sang. Chez l'homme, les glomérules mesurent 150 à 250 μm de diamètre alors que chez le

rat, ils ont de 100 à 150 μm de diamètre. Ils possèdent un pôle vasculaire, correspondant à la zone de connexion des artérioles afférente et efférente avec le glomérule, et un pôle urinaire qui correspond à la zone où débute le tube associé. La paroi capillaire du glomérule se comporte comme une membrane d'ultrafiltration de haute capacité. Le glomérule permet donc la formation d'un ultrafiltrat de plasma aussi nommé urine primitive. De grandes quantités de sodium (Na^+), de chlore (Cl^-), de calcium (Ca^{2+}), de magnésium (Mg^{2+}), de phosphate (PO_4^{2-}), de potassium (K^+), de glucose, de créatinine et d'urée sont ainsi filtrées. En dépit d'une résistance très basse au passage de l'eau, la paroi capillaire glomérulaire constitue une barrière très efficace au passage des protéines. En fait, elle restreint le passage des protéines de masse supérieure à l'albumine. La portion tubulaire étant capable que d'une très faible réabsorption de protéines, une élévation de la quantité de protéines filtrées entraîne conséquemment une protéinurie ²³.

1.1.1.1 BARRIÈRE DE FILTRATION

Le sang pénètre dans le glomérule par l'artériole afférente et traverse la membrane filtrante du corpuscule rénal. Cette membrane possède aussi le nom de barrière de filtration et se compose de trois couches distinctes. Le premier obstacle au passage des constituants sanguins de la lumière des capillaires vers l'espace de Bowman est l'endothélium fenestré des capillaires glomérulaires. Ensuite, une lame basale glomérulaire constituée de glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales fait aussi office de filtre. Elle apparaît sous trois couches : une centrale et épaisse nommée la lamina densa et deux autres qui sont périphériques et peu denses appelées les lamina rara externa et interna. Finalement, les podocytes forment des fentes de filtration (25 nm) recouverts par un mince diaphragme (4nm) ce qui permet la rétention de protéines de faible poids moléculaire.

En condition normale, les éléments figurés du sang, incluant les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes, ne traversent pas la barrière de filtration. Malgré la force considérable qui s'exerce sur la paroi des capillaires glomérulaires lors de l'ultrafiltration, ce processus possède toutefois une sélectivité de taille, de charge et de configuration

stérique. La flexibilité et la déformabilité des molécules influencent également leur filtration. La sélectivité par la taille s'effectue grâce à la largeur des différents filtres qui, ensemble, laissent une ouverture de 7,5 à 10 nm de diamètre. Cette ouverture est assurée par les pores endothéliaux, qui forment un filtre plutôt grossier et surtout utile pour empêcher le passage des cellules sanguines; la lame basale, un filtre fin et sélectif ; et les diaphragmes des fentes des podocytes, un filtre ultrafin.

Les capillaires glomérulaires sont très peu perméables aux protéines. Généralement, seules celles qui possèdent un diamètre inférieur à 30 Å et un poids moléculaire inférieur à 40 kDa sont filtrées librement. Ainsi, l'albumine (36 Å et 69 kDa) est très peu filtrée et les immunoglobulines de type G (55 Å et 150 kDa) ne le sont pas du tout. Les protéines qui ont passé la barrière de filtration se trouvent ensuite en compétition pour des sites de réabsorption sur les cellules épithéliales du tubule proximal.

1.1.1.2 APPAREIL JUXTAGLOMÉRULAIRE

L'appareil juxtaglomérulaire est une structure endocrine hautement spécialisée de l'artériole afférente et du tubule droit distal. Il est situé au pôle vasculaire du corpuscule rénal et est constitué de la macula densa, des cellules juxtaglomérulaires et des cellules mésangiales extraglomérulaires (Figure 1C).

La macula densa est une région cellulaire située face à l'artériole afférente et qui se différencie du reste de la paroi du tubule droit distal. Les cellules qui la composent sont prismatiques et ont un noyau arrondi situé au pôle apical. Ces cellules épithéliales sont des senseurs pour la concentration en NaCl de la lumière tubulaire et sont directement impliquées dans la régulation de la filtration glomérulaire par l'intermédiaire du rétrocontrôle tubulo-glomérulaire. Les cellules juxtaglomérulaires ou « cellules granuleuses » sont des cellules musculaires lisses spécialisées situées dans la partie terminale de l'artériole afférente. Elles sont cubiques et possèdent des propriétés contractiles. Elles jouent un rôle de barorécepteur, c'est à dire qu'elles sont sensibles à la pression sanguine. Les cellules juxtaglomérulaires sont innervées uniquement par des

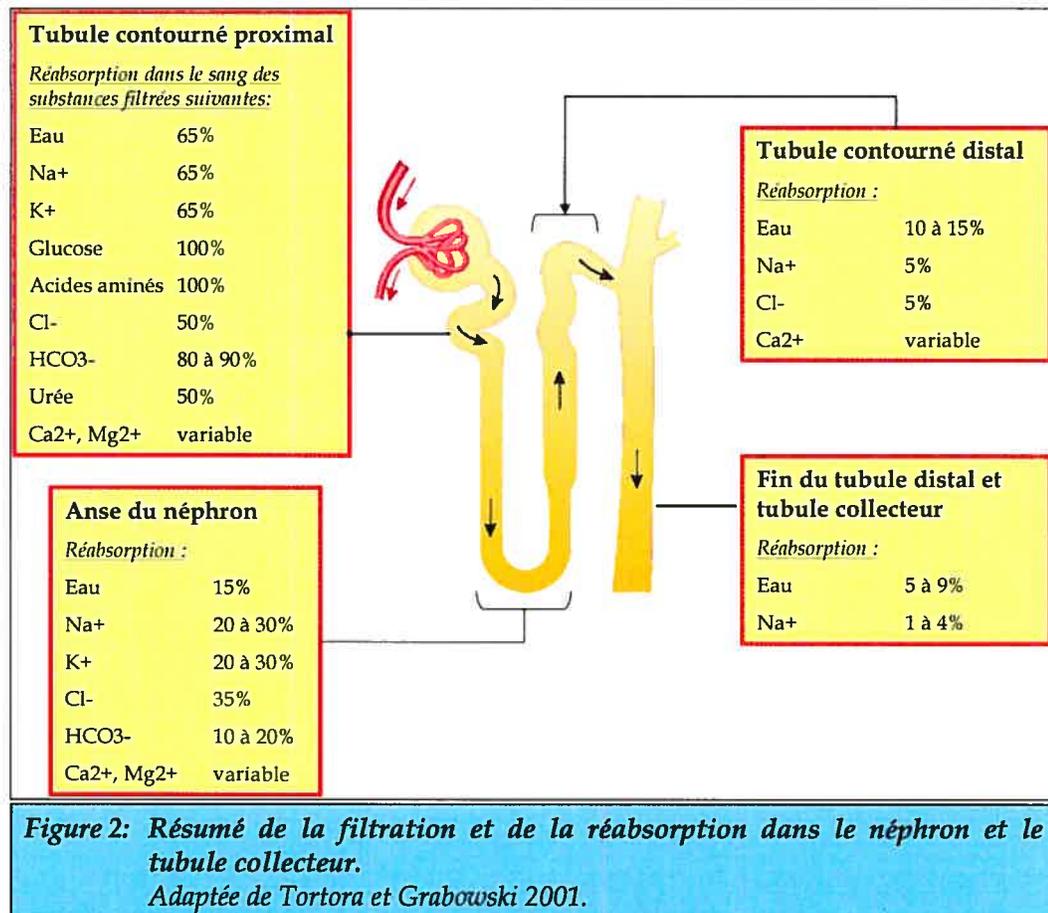
fibres sympathiques (pas d'innervation parasympathique). Elles ont aussi une fonction sécrétrice endocrine. En effet, elles libèrent la rénine contenue dans ses granulations. Cette sécrétion augmente lors de libération par les fibres adrénérgiques de norépinéphrine et dopamine induisant une vasoconstriction des artérioles efférentes. Enfin, les cellules mésangiales extraglomérulaires forment une masse conique entre l'artériole afférente et l'artériole efférente dont la base repose sur la macula densa. La fonction de ces cellules est encore mal connue.

1.1.1.2 LE TUBULE RÉNAL

Le pôle urinaire de chaque glomérule donne naissance à un tube rénal. Chaque tube rénal est constitué d'un enchaînement de plusieurs tubules que l'on nomme : tubule proximal, anse de Henlé, tubule distal et tubule collecteur (Figure 1B). Les caractéristiques morphologiques des différents tubules d'un même tube rénal sont distinctes et dépendantes de la fonction du segment étudié. Le tubule rénal est tapissé d'une unique couche de cellules épithéliales comprenant une membrane apicale du côté de la lumière tubulaire et une membrane basolatérale bordant le côté plasmatique. La majeure partie de l'eau et des nombreux solutés (Na^+ , glucose, acides aminés, etc.) est réabsorbée et retourne à la circulation sanguine (Figure 2). La plupart des petites protéines et peptides sont également réabsorbés et n'apparaissent qu'en faible concentration dans l'urine en condition physiologique. Le processus de réabsorption tubulaire implique une panoplie de transporteurs, de canaux et de pompes dépendantes de l'ATP.

La réabsorption tubulaire dépend grandement de la manipulation du sodium tout au long du tubule rénal. En fait, la réabsorption basolatérale de sodium s'effectue de façon active puisqu'elle doit lutter contre deux gradients : le gradient électrique (d'un potentiel légèrement négatif à l'intérieur de la cellule vers un potentiel extracellulaire positif) et le gradient chimique vers une concentration en sodium beaucoup plus importante (de 10 à 20 mmol intracellulaire à 140mmol dans le milieu extracellulaire). La $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est responsable de l'expulsion de 3 ions sodium et de l'entrée de 2 ions potassium dans la cellule. La réabsorption de sodium nécessite donc de grande quantité d'énergie (ATP).

L'activité de cette pompe est nécessaire à la réabsorption des autres solutés puisqu'elle crée et maintient une concentration intracellulaire plus faible de sodium permettant la création d'un gradient chimique nécessaire au transport actif secondaire des transporteurs du côté apical de la cellule. On retrouve la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans tous les segments du néphron : tubule proximal, anse de henlé, distal et collecteur. Cette pompe est principalement inhibée par la ouabaine et par une diminution de la formation d'ATP et du métabolisme cellulaire ⁵.



1.1.1.2.1 TUBULE PROXIMAL

Le tubule proximal est constitué d'une portion suivant un parcours sinueux au niveau du cortex lui donnant le nom de tubule contourné et d'une partie droite cortico-médullaire que l'on nomme le tubule droit. Chez l'humain tout comme chez le rat et d'autres espèces, le tubule proximal est subdivisé en trois segments distincts (S1, S2 et S3) ⁶. Le segment S1 correspond au 2/3 du tubule contourné et est la portion initiale du tubule

proximal. Le segment S2 est formé de la fin du tubule contourné et de la portion initiale du tubule droit. Le segment S3 quant à lui, représente le reste du tubule droit proximal. Les cellules du tubule contourné proximal sont très riches en vésicules d'endocytose et en lysosomes, deux composants impliqués dans le processus de réabsorption et de dégradation des macromolécules telles que les protéines plasmatiques de faible poids moléculaire. Le tubule contourné proximal joue un rôle majeur dans la réabsorption de plusieurs ions. Au début du tubule proximal (Figure 3A), à la membrane apicale, la réabsorption de sodium s'effectue passivement et est favorisée par le gradient électrochimique. L'entrée passive de sodium dans la cellule est aussi couplée au transport actif secondaire impliquant d'autres substances soit par cotransport ou par contre-transport. La majorité de la réabsorption du sodium survient grâce à l'échangeur $\text{Na}^+\text{-H}^+$ de type 3 (NHE3). Plusieurs autres cotransporteurs sont aussi présents assurant la réabsorption sodique (cotransporteur Na^+ - glucose; cotransporteur Na^+ - acides aminés; cotransporteur Na^+ - phosphate; cotransporteur Na^+ - bicarbonate) ^{2,3,5}.

Dans la portion terminale du tubule proximal (Figure 3B), la réabsorption de sodium s'effectue passivement conjointement avec celle du chlore par voie paracellulaire. Cependant, certaines études suggèrent l'implication du canal sodique sensible à l'amiloride (ENaC) et de l'échangeur NHE3 au niveau de la membrane apicale ^{7,8}. La manipulation des ions au niveau du tubule proximal fait en sorte que le sodium est réabsorbé à 65% par les pompes à sodium, les antiporteurs et les symporteurs, le bicarbonate à 90% par diffusion facilitée, le Cl^- à 50% par diffusion et le K^+ à 65% par diffusion. D'autres ions tels que le Ca^{2+} , le phosphate, l'eau et des solutés organiques (glucose et acides aminés) sont aussi réabsorbés massivement. Approximativement la moitié de l'ultrafiltrat glomérulaire est réabsorbée dans le tubule proximal.

1.1.1.2.2 ANSE DE HENLÉ

Partie descendante

À la fin du tubule proximal, les cellules épithéliales deviennent plus minces et le tubule descend dans la médullaire. Étant difficile à disséquer et à isoler, cette portion du

néphron est mal connue. Ce segment est perméable à l'eau mais peu perméable aux ions Na^+ et Cl^- . De plus, il ne semble pas avoir de transport actif.

Partie ascendante

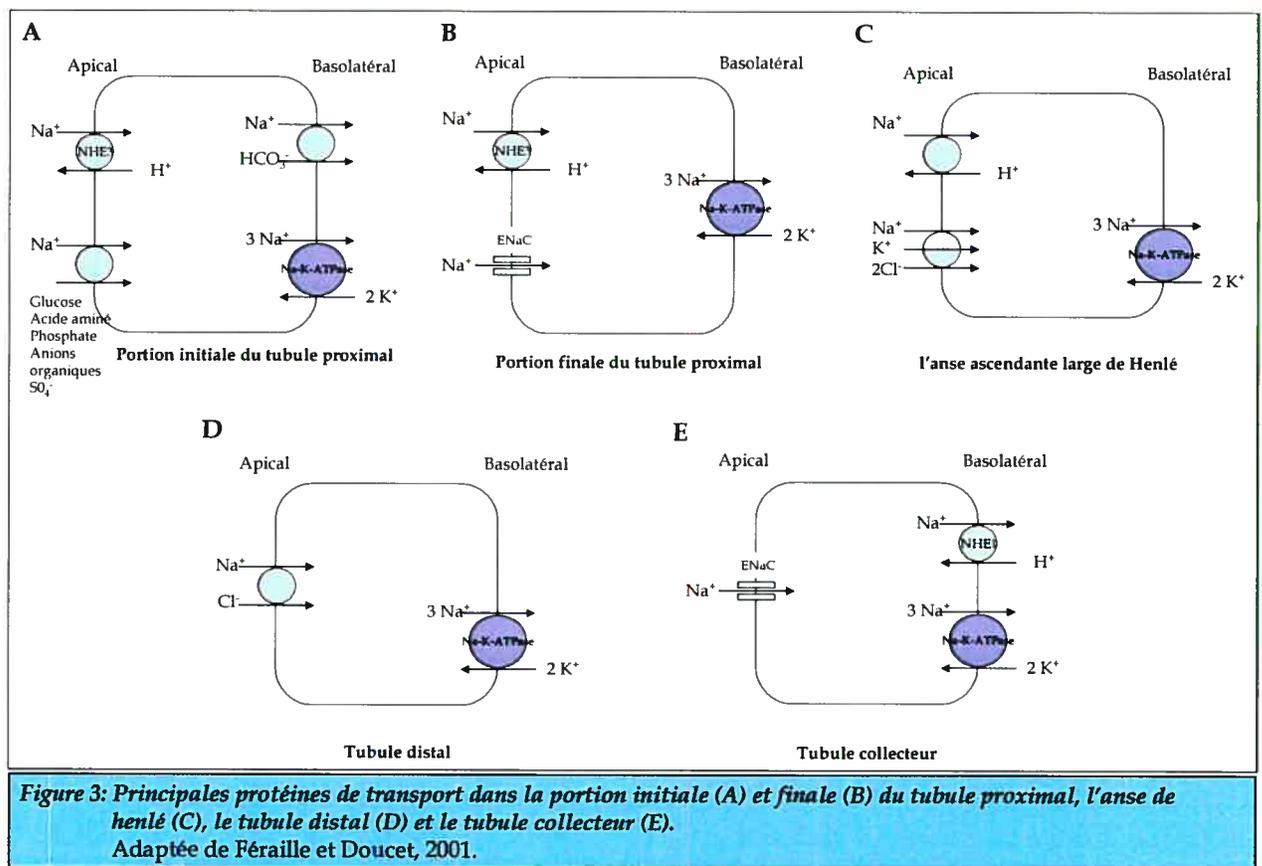
Ce segment du néphron est très imperméable à l'eau mais fortement perméable aux ions Na^+ et aux Cl^- ce qui permet la réabsorption d'environ 25% du sodium. Dans la portion ascendante fine, la réabsorption de sodium s'effectue de façon passive. Cette portion joue un rôle important dans le processus de multiplication à contre-courant qui est responsable de la dilution et de la concentration de l'urine. D'autre part, la portion ascendante large contribue à la réabsorption active de sodium nécessitant l'activité de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ du côté basolatérale. Le co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC) et l'échangeur Na^+-H^+ exprimés du côté apical assurent la réabsorption du sodium (Figure 3C). Une réabsorption passive du sodium et d'autres ions s'effectue aussi au niveau de ce segment du néphron et ce, de façon paracellulaire. Puisque la partie ascendante de l'anse de Henlé est imperméable à l'eau, elle est considérée comme le segment diluteur. Ainsi, l'eau reste dans la lumière du tubule et le liquide tubulaire devient hypotonique. Le site d'action des diurétiques tel que le furosémide, inhibant le co-transporteur NKCC et bloquant ainsi la réabsorption de Cl^- est situé au niveau de l'anse large ⁵.

1.1.1.2.3 TUBULE DISTAL

Le tubule distal contourné est uniquement retrouvé dans le cortex et possède de grandes cellules épithéliales contenant peu de microvillosités et beaucoup de mitochondries assurant une grande production d'ATP nécessaire au fonctionnement de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$. Ce segment du tubule est responsable de la réabsorption active d'environ 8% du sodium filtré qui s'effectue principalement par le cotransporteur apical Na^+-Cl^- sensible au thiazide (Figure 3D). La réabsorption de sodium, par ce cotransporteur, s'effectue selon son gradient électrochimique tandis que celle du Cl^- se fait contre son gradient électrochimique. Le tubule distal est formé par un épithélium serré ce qui lui permet l'établissement d'un fort gradient de concentration chimique entre le milieu tubulaire et interstitiel ⁵.

1.1.1.2.4 TUBULE COLLECTEUR

Environ 2% du sodium filtré est réabsorbé au niveau du tubule collecteur. Ce segment du néphron est constitué de cellules principales et de cellules intercalaires α et β . Les cellules principales assurent la réabsorption du sodium par l'expression de canaux sélectifs ENaC (α - β - γ) qui permettent l'entrée de sodium suivant son gradient de concentration (Figure 3E) ⁹. L'échangeur NHE1 est aussi exprimé dans les cellules principales et est impliqué dans la régulation du pH intracellulaire ainsi que pour l'action des minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone. Il est généralement accepté que le sodium peut être seulement réabsorbé par le néphron et non excrété. Toutefois, il a été démontré que l'excrétion du sodium peut aussi être possible dans ce segment du néphron. En effet, la présence d'un cotransporteur NKCC au niveau de la membrane basolatérale permettrait l'excrétion du sodium via une l'excrétion de l'ion Cl^- ^{5,10}.



1.1.2 FONCTIONS ENDOCRINES DU REIN

Les paragraphes précédents décrivent les reins comme étant des organes responsables de la régulation de l'équilibre volumique. Une attention particulière a été portée sur la régulation de l'homéostasie sodée puisqu'au cours de la grossesse, une augmentation de la rétention sodique est observée et que nous utilisons un supplément sodique afin de développer notre modèle animal. Le rein est un organe multifonctionnel faisant beaucoup plus que réguler l'homéostasie du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme. En fait, le rein possède une fonction endocrine et est capable de synthèse et de sécrétion d'hormones. Par exemple, il est responsable de la sécrétion de la rénine, hormone limitante du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ce système entraîne la production d'un puissant vasoconstricteur l'angiotensine II (ANGII) qui joue rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle. Une diminution de la pression artérielle ou de la concentration plasmatique de sodium est responsable de synthèse et de la relâche de la rénine par les cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire. Le rein est aussi responsable de la production de prostaglandines (PG), notamment la PGI₂ et la PGE₂^{2,3}. Les prostaglandines sont synthétisées suite au métabolisme de l'acide arachidonique, sous l'action des enzymes cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) (discuté dans la section 3.2). L'expression de la COX-2 a été démontré dans plusieurs segments du néphron, notamment au niveau de la macula densa, de l'appareil juxtaglomérulaire et des cellules épithéliales de l'anse de henlé¹¹. Lors d'une hypovolémie, les prostaglandines sont sécrétées afin de favoriser la rétention d'eau et de sodium. Elles peuvent agir de façon autocrine et paracrine et sont aussi impliquées dans la croissance glomérulaire et tubulaire¹².

1.2 SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONÉ

En 1898, Tigerstedt et Bergman obtenaient des extraits d'une substance provenant du cortex rénal de lapins. Cette substance avait des effets presseurs lorsqu'elle était injectée à d'autres lapins. Ils donnèrent le nom de "rénine" à cette substance (pour une revue :¹³). Il fut montré plus tard que la rénine est une enzyme protéolytique et est synthétisée et emmagasinée par les cellules myoépithélioïdes de l'artériole afférente du glomérule rénal. La rénine est le facteur limitant du SRA. Sa sécrétion peut être induite

par une stimulation β -adrénergique, la baisse de pression dans l'artériole et la diminution de NaCl dans la macula densa. En contrepartie, l'augmentation du NaCl dans la macula densa, de même que l'ANGII, diminue la production et la sécrétion de la rénine. La rénine sécrétée diffuse dans les compartiments plasmatique, lymphatique et interstitiel. Son substrat principal est l'angiotensinogène, une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie, qu'elle clivera en angiotensine I (ANGI). L'ANGI est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour produire l'ANGII, composant le plus actif du système rénine-angiotensine (Figure 4). L'ECA est aussi responsable de la dégradation de la bradikinine, vasodilatateur et natriurétique, en métabolites inactifs. De cette façon, l'ECA favorise la vasoconstriction ¹⁴.

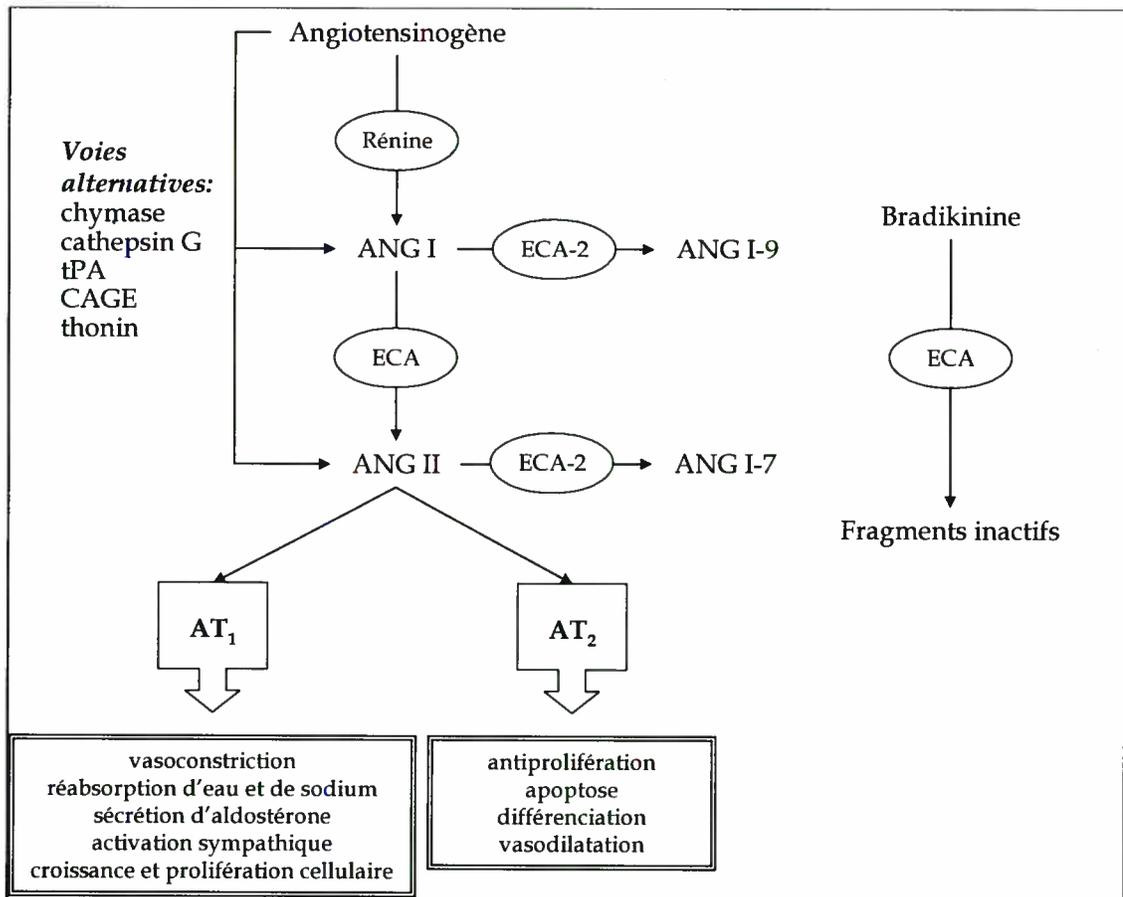


Figure 4: Cascade bioenzymatique du système rénine-angiotensine.

Adaptée de Dinh et al, 2001; Bottari et al, 1993; Lavoie et Sigmund 2003.

1.2.1 ACTIONS DE L'ANGIOTENSINE II

L'ANGII est l'hormone effectrice centrale du SRA, dont le rôle physiologique dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée, de la fonction rénale et de la pression artérielle est bien démontré. Les actions de l'ANGII sont assurées par des récepteurs hautement spécifiques : AT₁ et AT₂. Ces récepteurs font partie de la grande famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G. Le récepteur AT₁ est présent dans différents organes incluant les vaisseaux sanguins, le rein, le cœur, le foie, la surrénale, le placenta et le cerveau. Le récepteur AT₂ est présent de façon ubiquitaire lors du développement fœtal. Chez l'adulte, ce sous-type de récepteur est exprimé dans le rein, la médullosurrénale, le cœur, l'endothélium des vaisseaux ainsi que faiblement dans le placenta ¹⁵. En se liant aux récepteurs AT₁, l'ANGII induit la relâche de diverses hormones telles que les minéralocorticoïdes par la corticosurrénale, les cathécolamines par la médullosurrénale, l'hormone antidiurétique, l'adrénocorticotrophine (ACTH) et la prolactine par l'hypophyse ainsi que l'hormone lactogène placentaire (hPL) par le placenta ¹⁶⁻¹⁸. En général, on peut dire que les récepteurs AT₁ rendent compte de la majorité des effets physiologiques et physiopathologiques de l'angiotensine II, alors que les récepteurs AT₂ semblent s'opposer en miroir aux effets des AT₁. Par exemple, la liaison de l'ANGII aux récepteurs AT₁ permet, au niveau du système nerveux central, la relâche de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses périphériques. L'ANGII stimule aussi le centre de la soif augmentant ainsi l'apport hydrique. Au niveau du rein, l'ANGII induit une vasoconstriction de l'artériole efférente entraînant une diminution du débit de filtration glomérulaire. Elle entraîne la réabsorption de sodium dans les glomérules et les cellules du tubule proximal ¹⁸. Dans la zone glomérulée de la surrénale, l'ANGII stimule la production de l'aldostérone ¹⁹. Le rôle du récepteur AT₂ est encore incertain et certaines études ont démontré que sa liaison à l'ANGII serait responsable d'effets anti-hypertrophiques au niveau du système cardiovasculaire ²⁰.

Des études ont mis en évidence qu'une partie ou la totalité des éléments du SRA peuvent être présents dans de nombreux tissus faisant du SRA un système quasi-ubiquitaire et impliqué dans des régulations paracrines. L'enzyme de conversion est

retrouvée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux et la rénine peut être séquestrée dans la paroi vasculaire. Une multitude de tissus expriment les ARN messagers de l'angiotensinogène, de la rénine et de l'enzyme de conversion tels que les vaisseaux, le cerveau, les reins, le cœur et le placenta ²¹. Il a aussi été démontré que les autres peptides dérivés du SRA tels que l'angiotensine-(1-7) et l'angiotensine IV possèdent des actions physiologiques. Par exemple, l'angiotensine IV induit une vasodilatation au niveau de l'artère pulmonaire porcine ²² et une augmentation du débit sanguin rénal chez le rat ²³. Ces actions seraient assurées par des récepteurs spécifiques à ces peptides.

1.2.2 L'ALDOSTÉRONNE

L'aldostérone est un stéroïde dérivé du cholestérol et est le principal minéralocorticoïde synthétisé par la zone glomérulée de la corticosurrénale. La stéroïdogénèse est assurée par une série de réactions enzymatiques où le cytochrome P450scc (*side-chaine clivage*) ou CYP11A1 est l'enzyme limitante et le P450aldo (ou CYP11B2) est l'enzyme finale et spécifique responsable de la biosynthèse de l'aldostérone. Le gène de la P450aldo a été cloné chez l'humain en 1989 par le groupe de Mornet ²⁴. Jusqu'à tout récemment, on croyait que l'aldostérone était produite exclusivement par la corticosurrénale et libérée au niveau plasmatique. Cependant, l'ARNm de la P450aldo a aussi été caractérisée dans les cellules endothéliales humaines et les vaisseaux mésentériques de rats ²⁵ de même que dans plusieurs zones du cerveau ²⁶⁻²⁸. L'expression du cytochrome P450aldo ainsi que des récepteurs au minéralocorticoïdes (MR) au niveau de ces régions suggèrent une action locale de l'aldostérone.

L'aldostérone agit principalement au niveau du néphron via sa liaison sur les MR et induit une augmentation de la réabsorption de sodium et une excrétion de potassium par le rein. Elle augmente la synthèse et l'expression de la sous-unité α du canal sodique épithéliale (eNAC- α) au niveau de la membrane apicale du tubule rénal distal ²⁹. Elle assure aussi un changement de localisation des sous-unités ENaC- α , β et γ à partir des compartiments intracellulaires vers la membrane apicale. De plus, l'aldostérone favorise la synthèse et l'expression de la pompe Na^+, K^+ -ATPase à la membrane basolatérale du

tubule collecteur (pour une revue : ^{5,30}). L'action de celle-ci sur ces transporteurs et pompes fait partie de ses effets génomiques classiques qui surviennent généralement au-delà de 30 minutes. Cependant, des effets rapides, non-génomiques et non-classiques de l'aldostérone ont été caractérisés depuis une dizaine d'années. Certains groupes ont rapporté que cette hormone était capable d'induire rapidement le recrutement de seconds messagers et la phosphorylation de protéines kinases. Par exemple, il a été démontré que l'aldostérone induit une activation de l'échangeur NHE par la voie de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3)-calcium dans les lymphocytes humains et ce, dans un laps de temps de 1 à 2 minutes ³¹. L'aldostérone serait aussi responsable d'un effet rapide inotropique positif sur des myocytes isolés de rats ³². Des sites de liaison membranaires spécifiques pour l'aldostérone ont été identifiés au niveau de différents types cellulaires tels qu'au niveau du rein de rat et des lymphocytes humains ³³. Cependant, ces récepteurs seraient différents des récepteurs classiques nucléaires. Ces effets non-génomiques de l'aldostérone ont été associés au développement des résistances périphériques et par le fait même pourraient contribuer à l'hypertension et aux maladies cardiovasculaires ³⁰.

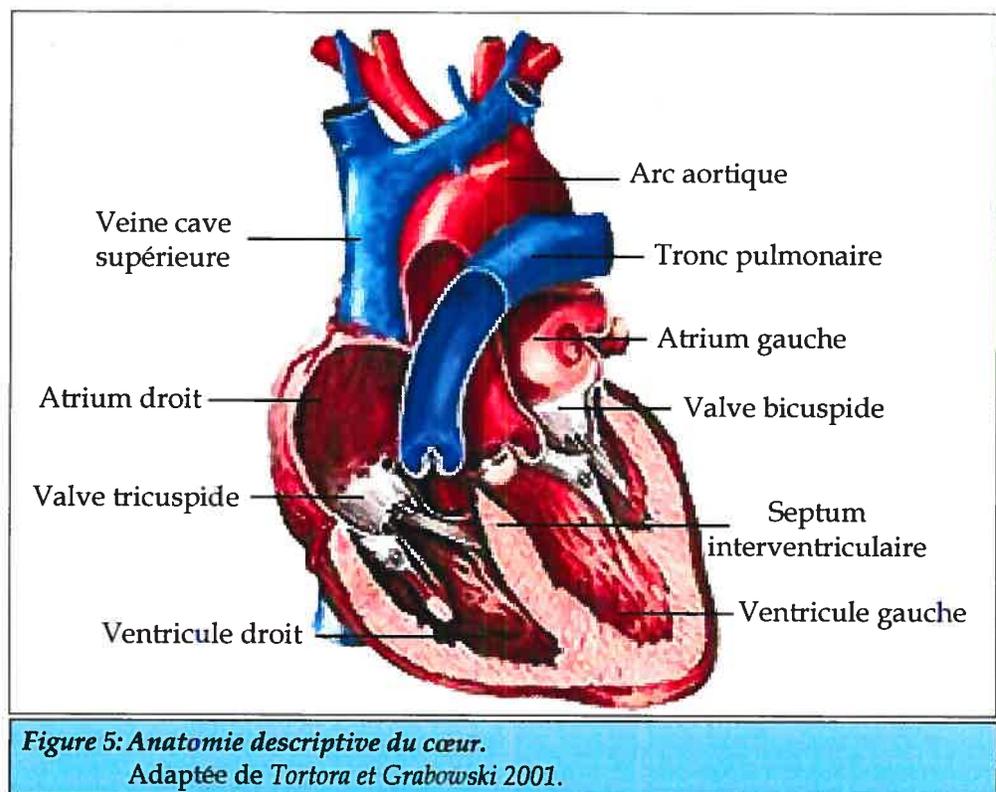
2 PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Du moment où il commence à battre au moment où il s'arrête, le cœur fournit un travail inlassable. En effet, au cours d'une vie, le cœur peut battre près de 2,5 billions de fois sans la moindre pause. Le cœur est la pompe qui conduit le sang dans le système cardiovasculaire par contractions et relaxations périodiques du muscle cardiaque. Anatomiquement, le cœur repose sur le diaphragme près du centre de la cavité thoracique. Sauf sur précision, les références utilisées pour cette section sont les suivantes : ^{3,34}.

2.1 ANATOMIE

Le cœur est formé de quatre chambres (Figure 5) : deux atriums (oreillette) et deux ventricules. Le ventricule gauche est séparé du ventricule droit par une cloison appelée septum interventriculaire et chaque ventricule connecte avec son atrium respectif. Le système cardiovasculaire est composé de deux circuits dont un systémique et l'autre

pulmonaire. Ces circuits sont liés par l'intermédiaire des cavités gauches et droites du cœur. L'atrium droit reçoit de la veine cave supérieure et de la veine cave inférieure le sang veineux périphérique. Par la suite, le sang passe au ventricule droit, qui, en se contractant chasse celui-ci dans l'artère pulmonaire. Le vestibule de l'artère pulmonaire est doté d'un "système anti-reflux " qui est composé de trois valvules sigmoïdes. Par son passage au niveau des poumons, le sang est réoxygéné et débarrassé du CO₂. La valve tricuspide, située entre le ventricule droit et l'atrium droit empêche le reflux du sang au niveau de l'atrium droit. Le sang provenant des poumons, par les veines pulmonaires, est ensuite projeté dans l'atrium gauche et se déverse ensuite dans le ventricule gauche en empruntant la valve bicuspide. Le ventricule gauche cardiaque forme l'apex du cœur. À l'instar du ventricule droit, sa paroi est beaucoup plus dense. Le sang éjecté du ventricule gauche passe par la valve aortique pour aboutir ensuite dans l'aorte, la plus grosse artère du corps qui distribue le sang vers l'organisme.



Les parois cardiaques sont composées de trois couches tissulaires. L'endocarde est une mince membrane qui revêt la face interne des quatre cavités cardiaques. Son

prolongement est l'intima des gros vaisseaux. Le myocarde est le tissu musculaire cardiaque où l'épaisseur dépend de la fonction des cavités. Il est plutôt mince au niveau des atrioms et particulièrement épais dans les ventricules. Le myocarde constitue l'essentiel de la masse du cœur. Il est formé de fibres musculaires striées que l'on nomme myocytes. Bien que ces fibres soient striées comme les fibres musculaires squelettiques, le muscle cardiaque est involontaire tout comme les fibres musculaires lisses. Le péricarde est une enveloppe séreuse externe constituée de deux feuillets: l'un viscéral, adhérent au myocarde ; l'autre pariétal que l'on nomme l'épicarde. L'espace péricardique, située entre les deux feuillets, contient une faible quantité de liquide (50 à 75 ml) ce qui facilite les mouvements du coeur.

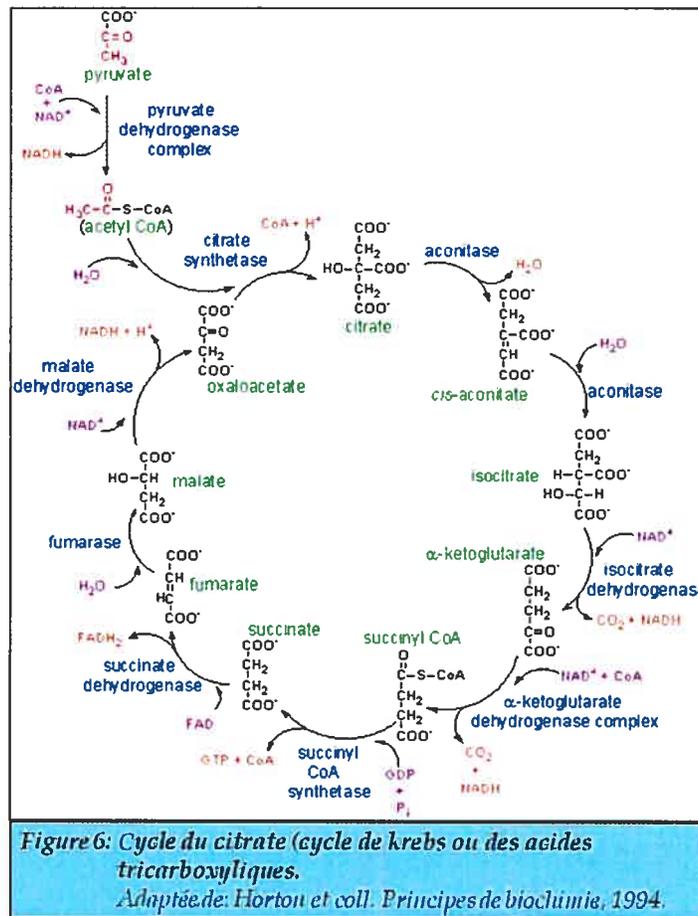
2.2 MÉTABOLISME CARDIAQUE

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui surviennent dans les cellules d'un organisme afin de produire et d'utiliser l'énergie pour maintenir leur intégrité. Chacune de ces réactions est déclenchée, contrôlée ou arrêtée par des enzymes. Sauf lorsque indiqué, les références utilisées pour cette section sont les suivantes ^{35,36}.

L'ATP formée lors de ces réactions métaboliques constitue l'énergie chimique de la cellule. L'hydrolyse des liaisons phosphates de l'ATP lui permet de céder cette énergie transformant ainsi l'adénosine-triphosphate (ATP) en adénosine-diphosphate (ADP) ou en adénosine-monophosphate (AMP). La dégradation des macromolécules en molécules simples est la première étape du métabolisme. Cette étape s'effectue par les voies métaboliques distinctes où les sucres sont dégradés en glucose et en autres « oses », les lipides sont transformés en glycérol et acides gras et les protéines en acides aminés. Ces différentes voies métaboliques mènent à la synthèse de composés carbonés communs tels que l'acétylcoenzyme A (acétyl CoA). L'acétyl CoA est utilisé dans le cycle de l'acide citrique aussi nommé cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques. Ce cycle est responsable d'une mince partie de la production de l'ATP. Toutefois, ce cycle produit des cofacteurs (NADH⁺ et FADH) qui seront ensuite acheminés vers la chaîne de transport d'électrons mitochondriale en vue d'une synthèse massive d'ATP.

2.2.1 LE CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE

En 1937, Sir Hans Krebs a fait la description du cycle de l'acide citrique^{37,38}. Ce cycle implique des enzymes situés sur la membrane interne de la mitochondrie, et d'autres qui se retrouvent dans la matrice mitochondriale. Le cycle de l'acide citrique³⁶ (figure 6) fait intervenir plusieurs enzymes dont la citrate synthase et l'aconitase. Cette première enzyme est limitante et critique dans l'initialisation du cycle et sa fonction doit être irréversible pour permettre la poursuite du cycle. Elle permet la réaction entre l'acétyl CoA et l'oxaloacétate pour former le citrate. L'aconitase, deuxième enzyme du cycle, aussi connue sous le nom d'aconitate hydratase, catalyse la conversion du citrate en isocitrate de façon réversible. L'aconitase est une enzyme particulière puisque sa fonction est directement modulée par des variations du statut oxydant tel que démontré dans des cultures cellulaires de carcinomes pulmonaires et dans la bactérie *E.coli*³⁹⁻⁴². L'aconitase est une enzyme contenant un groupe central fer-souffre sensible à l'oxydation par les radicaux libres. Une attaque radicalaire induit la relâche du fer (Fe^{2+}) et provoque l'inhibition de l'enzyme⁴³. L'attaque oxydative de l'aconitase peut avoir des conséquences majeures sur le statut oxydant cellulaire ainsi que sur le que métabolisme cardiaque. Tout d'abord, la relâche du Fe^{2+} entraîne avec lui la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) étant lui-même considéré comme un agent oxydant⁴⁴. Ainsi, une perte de l'activité de l'aconitase, induite par les radicaux libres est souvent interprétée comme un index des dommages oxydatifs. De plus, l'aconitase étant une enzyme clé du cycle de l'acide citrique, son inhibition peut mener à une perte importante de la production d'ATP par la chaîne de transport d'électrons et par conséquent, à des dérèglements importants de la fonction cardiaque.



3 SIGNALISATION CELLULAIRE

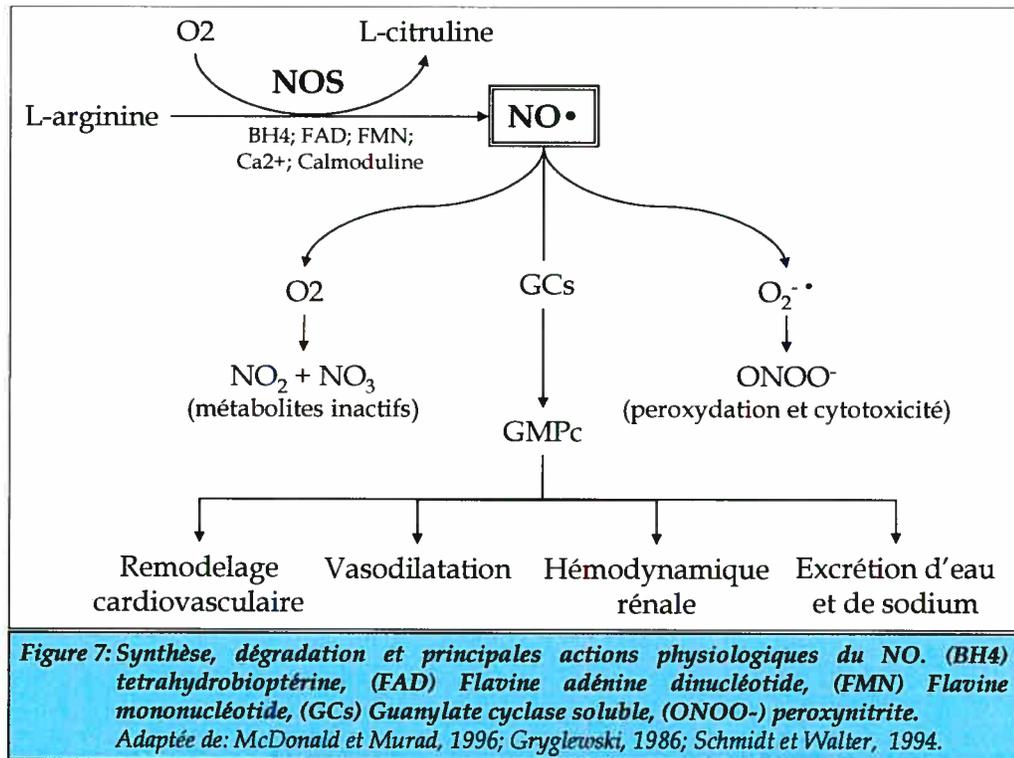
3.1 MONOXYDE D'AZOTE

En 1980, le groupe de Furchgott et Zawadski démontrait qu'un endothélium intact produisait une substance capable de diffuser et d'agir sur les cellules musculaires lisses avoisinantes : le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (*EDRF; endothelial derived relaxing factor*)⁴⁵. En 1987, le groupe de Palmer a démontré qu'il s'agissait du monoxyde d'azote (NO)⁴⁶. Le NO est une molécule ubiquitaire, étant capable de franchir toutes les membranes biologiques faisant de lui un messenger très important dans la signalisation cellulaire^{47,48}.

3.1.1 SYNTHÈSE DU NO

Le NO est produit par les synthases du monoxyde d'azote (NOS). À ce jour, trois principaux isoformes ont été identifiés selon l'ordre et les types cellulaires où ils ont été

premièrement retrouvés : l'isoforme neuronal nNOS (NOS1), inductible iNOS (NOS2) et endothélial eNOS (NOS3). La production du NO nécessite une multitude de cofacteurs tels que l'oxygène, le NADPH, le fer, la tétrahydrobioptérine (BH₄), la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine nucléotide (FAD) (figure 7).



La eNOS est constitutive et associée à la membrane cellulaire par des microdomaines : les calvéolae ⁴⁹. Elle est retrouvée au sein de plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules tubulaires et glomérulaires rénales ^{50,51}, la macula densa ⁵² ainsi que dans les cardiomyocytes ⁵³. La eNOS est aussi exprimée dans les cytotrophoblastes vilieux et les syncytiotrophoblastes du placenta ⁵⁴. La cascade d'activation de la eNOS implique le complexe Ca²⁺/calmoduline ainsi que sa phosphorylation sur le résidu sérine 1179 ^{55,56}. De plus, il a été aussi démontré dans des cellules endothéliales que la protéine Hsp90 stimule l'activité de la eNOS⁵⁷.

L'enzyme nNOS, aussi dépendante du calcium, est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles cardiaques et squelettiques. On retrouve également cet isoforme dans les poumons, l'utérus, l'estomac et le pancréas ⁵⁸. Concernant la présence

de cet isoforme dans le placenta, celle-ci demeure controversée^{59,60}. Quatre sous-types ont été caractérisés : nNOSb, nNOSg, nNOSm et nNOS-2. La phosphorylation de la nNOS par une kinase dépendante de la calmoduline (CAM-K) inhibe son activité. Par contre, elle est activée par une interaction avec la protéine Hsp90^{61,62}.

La iNOS est le seul isoforme inductible. La iNOS est présente dans certaines conditions pathologiques telles que l'obésité et le diabète de type 2⁶³. Son expression est stimulée par certaines molécules du système immunitaire et de l'inflammation comme les cytokines TNF- α , IL-1 et IL-6, interféron- γ ⁶⁴ et par l'endotoxine LPS des bactéries⁶⁵. L'ARN et la protéine de l'enzyme iNOS sont aussi exprimés dans le placenta de rats et au niveau des cytotrophoblastes villeux et extravilleux chez la femme^{54,60}. De plus, l'expression de la iNOS diminue graduellement jusqu'à terme chez la rate où elle demeure toutefois présente^{66,67}.

3.1.2 ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DU NO

On confère au NO de nombreuses fonctions physiologiques assurées par l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs) ce qui entraîne une augmentation de la concentration de GMP cyclique (cGMP) dans les cellules cibles^{68,69}. Au niveau du rein, le NO s'oppose à l'effet vasoconstricteur de l'ANGII et est impliqué dans le contrôle du débit sanguin rénal⁷⁰. De plus, il régule la natriurèse et le débit sanguin dans la médullaire et prévient l'infiltration de leucocytes et la formation de thrombi au niveau des vaisseaux sanguins rénaux⁷¹. Le NO pourrait aussi être responsable de la relâche de la rénine par la macula densa en réponse à une diminution de la concentration de sodium⁷². Au niveau du système vasculaire, le NO est responsable du maintien d'un tonus vasodilatateur impliqué dans le contrôle de la pression artérielle. Le NO possède aussi des propriétés inhibant l'agrégation et l'adhésion des plaquettes et des leucocytes. Le NO agit aussi comme neuromédiateur impliqué dans la mémoire et la douleur⁷³.

Lors des réactions immunitaires, le NO est produit en quantité importante par les macrophages. Cette hausse de NO est associée à la défense de l'organisme face à des

cellules tumorales, des virus et des bactéries ainsi que dans plusieurs pathologies inflammatoires aiguë ou chronique.

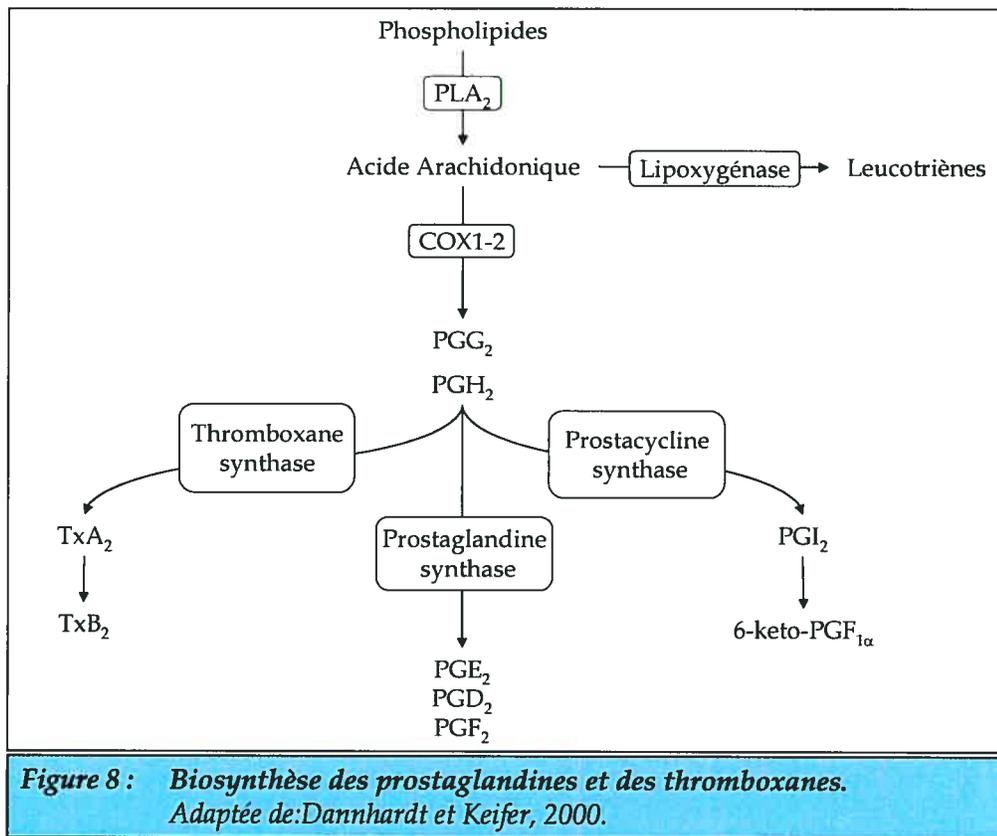
Il a également été démontré que le NO est capable de réguler l'activité des protéines en induisant une réaction de S-nitrosylation des résidus cystéines ^{47,48}. Son interaction avec l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) induit la formation de peroxy-nitrite ($ONOO^-$) favorisant ainsi la nitration des protéines ⁷⁴. La formation du NO est représentée à la figure 7. De plus, cette figure montre d'autres voies découlant du NO, incluant le peroxy-nitrite.

3.2 EICOSANOÏDES

Les eicosanoïdes font partie d'une famille de lipides biologiquement actifs dérivés des acides gras essentiels de 20 carbones. Cette classe comprend les prostaglandines (PG), les prostacyclines, les thromboxanes (Tx) et les leucotriènes. Ces molécules sont impliquées dans les systèmes immunitaire, rénal, gastro-intestinal et placentaire.

3.2.1 BIOSYNTHÈSE DES EICOSANOÏDES

Les eicosanoïdes dérivent de l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé essentiel estérifié et intégré dans les phospholipides membranaires. L'AA se trouve en permanence transféré entre les différents compartiments cellulaires et lipidiques membranaires ⁷⁵. De ce fait, il n'est que très faiblement présent à l'état libre dans le cytoplasme des cellules. La principale voie de libération de l'AA des phospholipides membranaires est assurée par les phospholipases A2 cytosoliques (cPLA₂) ⁷⁵. L'AA libre est ensuite pris en charge par une des deux enzymes : la cyclooxygénase-1 ou la cyclooxygénase-2 (COX-1; constitutif et COX-2; inductible) ⁷⁶. Sous l'action des COX, l'AA est converti en prostaglandine G2 (PGG₂) et cette dernière est ensuite réduite par une peroxydase pour former la prostaglandine H2 (PGH₂). La PGH₂ est un intermédiaire très instable duquel dérive les autres eicosanoïdes par une variété de réactions enzymatiques résumées à la figure 8.



Ainsi, la prostacycline (PGI_2) et les thromboxanes (TxA_2 et TxB_2) sont synthétisées directement de la PGH_2 ⁷⁷. La PGI_2 est désactivée en 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ via une hydrolyse non-enzymatique. D'une manière similaire, la TxA_2 est désactivée en TxB_2 .

3.2.2 ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES EICOSANOÏDES

L'action des eicosanoïdes est assurée via une liaison à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G ⁷⁶. Ces composés sont considérés comme des hormones à action locale. Dans des conditions physiologiques normales, ils ont des fonctions essentielles au niveau du système gastro-entérique et rénal aussi bien que dans des conditions physiologiques particulières telles que la grossesse et l'accouchement ^{11,78-80}. Cependant, ils peuvent aussi être impliqués dans un grand nombre de conditions pathologiques telles que l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et l'hypertension de grossesse ⁸¹⁻⁸⁴.

La PGI₂ est l'eicosanoïde le plus abondant au niveau des vaisseaux sanguins. Elle est synthétisée dans les cellules du muscle lisse ainsi que dans l'endothélium des vaisseaux. Sa synthèse a aussi été démontrée au niveau des cellules trophoblastiques placentaires⁸⁵. La PGI₂ est un puissant vasodilatateur et empêche l'agrégation et l'activation plaquettaire⁸⁶. De plus, elle est un composé instable et sa transformation en 6-kéto-PGF_{1α} s'effectue en moins d'une minute de façon spontanée *in vivo*⁸⁷. C'est d'ailleurs ce composé inactif qui sert de mesure de la PGI₂ tissulaire. Contrairement à la PGI₂, la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) et la prostaglandine E₂ (PGE₂) sont des composés vasoconstricteurs⁸⁸. La PGE₂ est synthétisée par la plupart des cellules et est impliquée dans les processus inflammatoire. Elle est le prostanoloïde le plus retrouvé au niveau du rein et participe à la régulation de la pression artérielle. En fait, il a été démontré qu'une inhibition du récepteur de la PGE₂ (EP2) des souris entraîne le développement d'une hypertension sensible au sel⁸⁹.

Le TxA₂ est un puissant vasoconstricteur et un inducteur de l'agrégation plaquettaire⁷⁶. Il est aussi impliqué lors de la mitose et de l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires^{90,91}. Un déséquilibre dans la production du TxA₂, ou des mutations dans son gène induit une altération du système de coagulation^{92,93}. Il est aussi associé à certaines maladies telles que la pré-éclampsie⁹⁴, l'hypertension⁹⁵ et les glomérulonéphrites⁹⁶. De façon similaire à la PGI₂, le TxA₂ est très instable et dégradé rapidement⁹⁷. En conséquent, le produit de dégradation du TxA₂, le TxB₂, est stable, inactif et utilisé comme mesure du TxA₂⁹⁷. Le TxA₂ est l'antagoniste naturel de la PGI₂⁹⁸ et le ratio de leurs métabolites inactifs (TxB₂/6-kéto-PGF_{1α}) est souvent utilisé lors de conditions hypertensives comme la pré-éclampsie⁹⁹.

3.3 CYTOKINES ET CHÉMOKINES

Les cytokines sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire (5-50kDa) responsables de la réponse inflammatoire et immunitaire ainsi que de la réparation tissulaire¹⁰⁰. La famille de ces molécules englobe les chémokines (action chimiotactique), les interleukines (synthétisée par les leucocytes), les monokines (synthétisée par les monocytes) et les lymphokines (synthétisée par les lymphocytes). Elles sont produites par

une variété de cellules appartenant ou non au système immunitaire et possédant des fonctions pro- ou anti-inflammatoires. Ces médiateurs forment un réseau complexe de molécules synthétisées transitoirement et ayant généralement un faible rayon d'action de façon autocrine et paracrine. Certaines de ces cytokines telles que le TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein*) et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF : *connective tissue growth factor*) ont attiré mon attention dû à leur rôle dans l'apoptose et le stress oxydatif.

3.3.1 FACTEUR DE NÉCROSE TUMORAL

Le TNF- α appartient à une famille de ligands capable d'activer une variété de récepteurs structurellement reliés ^{101,102}. Le TNF- α est produit par une multitude de cellules pro-inflammatoires telles que les macrophages, les monocytes et les fibroblastes. Sa synthèse est aussi observée au niveau des trophoblastes, des cellules de la décidua ¹⁰³ et des cardiomyocytes ¹⁰⁴. Généralement, le TNF- α est synthétisé en réponse à une infection bactérienne ou parasitaire. Cependant, tous stimuli potentiellement délétères (stress chimique, oxydatif et physique) peuvent en augmenter sa production. Cette cytokine stimule la production de NO par les cellules endothéliales ¹⁰⁵ et via sa liaison au récepteur TNF-R1, induit l'apoptose *in vivo* et *in vitro* ^{106,107}. De plus, il semble que le TNF- α est au cœur d'une boucle de rétroaction positive impliquant le stress oxydatif. En fait, il a été démontré qu'il est capable d'induire la génération de radicaux libres, ces derniers étant aussi susceptibles d'induire la production du TNF- α ¹⁰³. De plus, sa synthèse peut aussi être une conséquence de la stimulation par des cytokines incluant le TNF- α lui-même.

3.3.2 FACTEUR DE CROISSANCE DU TISSUS CONJONCTIF

Le CTGF est une chémokine faisant partie de la famille des IGFBP-rp (*insuline growth factor binding protein-related proteins*). Elle a tout d'abord été caractérisée dans une culture de cellules endothéliales vasculaires provenant du cordon ombilical ¹⁰⁸. Depuis, le CTGF a été identifié au niveau de plusieurs tissus incluant le placenta humain ¹⁰⁹, le rein de rats et de femmes ^{110,111} ainsi que les cardiomyocytes murins ¹¹². Cette molécule fait partie intégrante d'une cascade complexe de différenciation et de réparation tissulaire. Le CTGF

est induit par plusieurs facteurs de croissances tels que le TGF- β 1 (*transforming growth factor-1*) et l'EGF (*epidermal growth factor*)¹¹³. Cette cytokine est impliquée dans plusieurs effets biologiques tels que la stimulation de la mitose, la prolifération cellulaire, la production de matrice extracellulaire et l'adhésion cellulaire^{114,115}. Sa participation dans l'apoptose a aussi été rapportée *in vitro* dans des cellules musculaires lisses aortiques¹¹⁶. La détection du CTGF au sein d'un organe est une indication d'un remodelage tissulaire où l'expression de ce facteur de croissance est proportionnellement liée au degré de fibrose d'un tissu¹¹⁷.

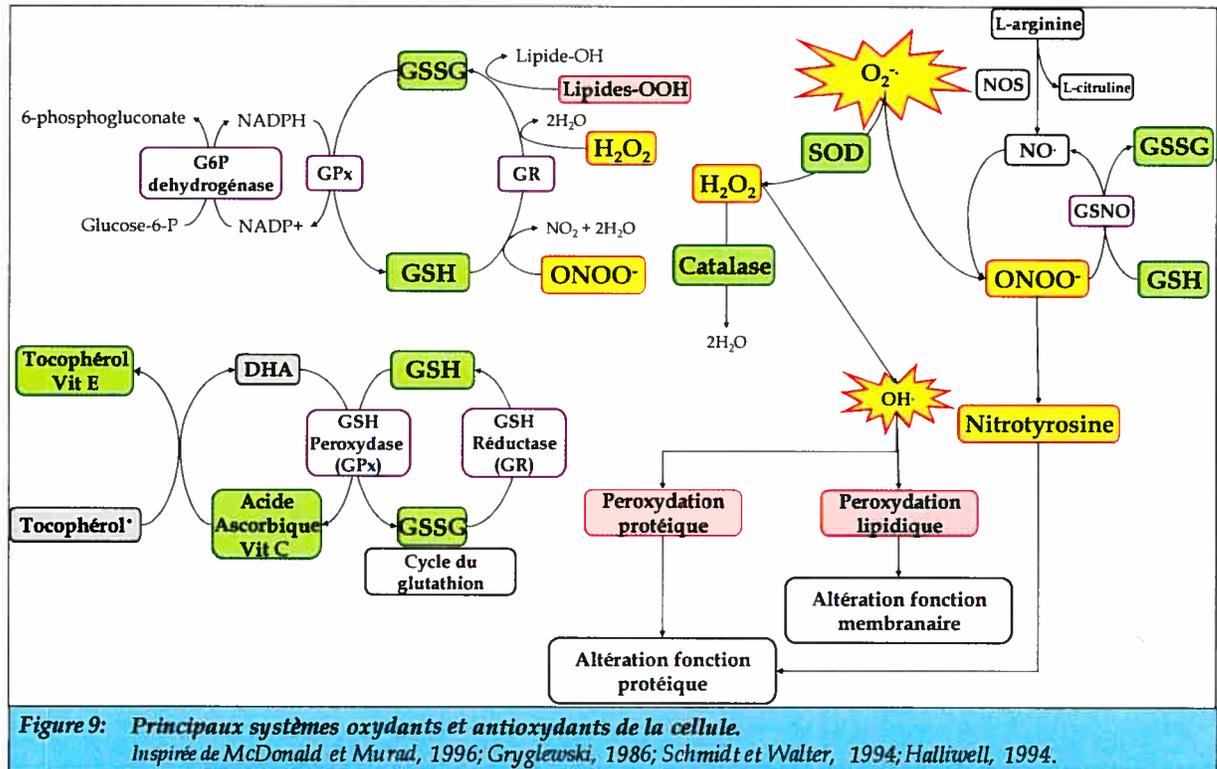
3.3.3 CHÉMOKINE CHIMIOTACTIQUE DES MONOCYTES

Le MCP-1 est une chémokine (*Chemotactic cytokine*) dont le rôle est crucial pour le recrutement des monocytes et des macrophages au cours de processus inflammatoire tels que l'athérosclérose et autres maladies du système cardiovasculaire¹¹⁸. Généralement, le MCP-1 n'est pas exprimé dans les tissus sains. Cependant, le TNF- α et d'autres cytokines peuvent induire sa formation dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes et dans les différentes cellules présentes au niveau du rein entraînant ainsi l'accumulation de cellules immunitaires et le développement possible d'une inflammation chronique^{119,120}. Dans le rein, sa concentration corrèle proportionnellement avec le degré de protéinurie et donc, des dommages glomérulaires¹²¹. Le MCP-1 semble aussi jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose des cardiomyocytes et des cellules endothéliales par l'activation de la caspase 3¹²². La voie de signalisation pro-apoptotique que déclenche cette chémokine peut être dommageable tant au niveau des cardiomyocytes que dans les vaisseaux.

3.4 STRESS OXYDATIF ET NITROSATIF

Afin de définir le stress oxydatif, il faut avant tout décrire ce que sont les radicaux libres. Ce sont des composés chimiques possédant un ou plusieurs électrons célibataires. Cette caractéristique rend les radicaux très instables et leur confère une haute réactivité vis-à-vis d'autres composés¹²³. La plupart des radicaux libres sont des molécules qui découlent de l'oxygène ou de l'azote et sont classés sous l'appellation d'espèce réactives de

l'oxygène (ROS; *reactive oxygen species*) ou espèces réactives de l'azote (RNOS; *reactive nitrated oxygen species*). Ils sont beaucoup plus toxiques que l'oxygène ou le NO lui-même. Le stress oxydant ou nitrosatif est défini comme étant un déséquilibre en faveur de la production de ROS ou RNOS conduisant donc à une oxydation ou nitration accrue des composants cellulaires essentiels. La figure 9 constitue une représentation schématique des principaux systèmes oxydants et antioxydants de la cellule.



3.4.1 DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE

Les ROS englobent les dérivés de l'oxygène qui peuvent être radicalaires ou non-radicalaires et agissent sans apport énergétique. De façon endogène, les ROS peuvent être produites via une panoplie de voies et regroupent, entre autre, l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH[•]).

L'ANION SUPEROXYDE

L'anion superoxyde est un radical libre très instable. La principale source non-enzymatique de O₂^{•-} est la chaîne respiratoire mitochondriale où un électron est transféré

à l'oxygène moléculaire. Sa production est aussi assurée par des enzymes comme la NADPH oxydase¹²⁴, la xantine oxydase, les COXs et les NOS. Le $O_2^{\bullet-}$ peut servir de précurseur pour des ROS très réactifs comme le H_2O_2 .

LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Le H_2O_2 est produit à partir du $O_2^{\bullet-}$ par une action catalytique de la superoxyde dismutase (SOD). Quoique non radicalaire, le H_2O_2 fait partie de la famille des ROS car sa capacité à traverser les membranes (lipophile) peut l'amener loin de son lieu de synthèse où il peut participer à la biosynthèse du radical hydroxyle.

LE RADICAL HYDROXYLE

Le $OH^{\bullet-}$ constitue le ROS le plus instable et le plus réactif, sa demi-vie étant de l'ordre de la nanoseconde. Il est capable de réagir avec une multitude de molécules avoisinantes comme les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN). De plus, il semble avoir une grande responsabilité au niveau de la toxicité cellulaire des radicaux libres¹²⁵. Le radical hydroxyle peut être formé par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition réduits, par exemple, le fer ferreux. Le $OH^{\bullet-}$ peut aussi être formé par la réaction du H_2O_2 et de l'anion superoxyde.

Outre la formation des dérivés réactifs de l'oxygène par des inducteurs endogènes, ces composés peuvent être générés par des facteurs environnementaux. La pollution, l'alcool, les médicaments, le tabagisme et l'exposition prolongée au soleil sont des situations qui peuvent induire une production excessive de ROS dans l'organisme. De plus, des études récentes suggèrent que le sodium semble aussi intervenir dans cette production. Par exemple, chez les rats Dahl résistant au sel, un supplément sodique (8% dans la nourriture) pendant 3 semaines induit une augmentation de la concentration plasmatique ainsi que de l'excrétion des F_2 -isoprostanés¹²⁶. Une augmentation de la production de l'anion superoxyde est aussi observée au niveau du cortex et de la médullaire rénale. Le groupe de Lenda on montré, dans des bains à organe sous perfusion, une augmentation de la synthèse de $O_2^{\bullet-}$ dans l'artériole du muscle

spinotrapèze chez des rats Sprague-Dawley qui ont reçu un supplément sodique (7% dans la nourriture) pendant 4 à 5 semaines. De plus, ces auteurs ont démontré que l'addition d'antioxydants (2,2,6,6-tetamethylpiperidine-N-oxyl; tempo, catalase ou SOD) dans le milieu de perfusion réduit les niveaux de l'anion superoxyde ¹²⁷ produit dans l'artériole. Il a aussi été démontré que le sodium pourrait induire une production accrue de ROS par l'entremise d'une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase ¹²⁸. En effet, le groupe de Kitiyakara a démontré que la prise d'une diète riche en sodium (6g/kg) chez des rats Sprague-Dawley, induit au niveau du cortex rénal, une augmentation de l'expression de gp91^{phox} and p47^{phox}, deux flavoprotéines impliquées dans la composition du NADPH. De plus, cette étude montre une diminution de l'activité de la SOD mitochondriale.

3.4.2 DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'AZOTE

Le NO[•] est un gaz qui réagit très rapidement avec les doublets et triplets moléculaires et, en conséquent, ne peut en aucun cas coexister avec l'oxygène ou ses dérivées tels que l'anion superoxyde; un doublet. Sa colocalisation avec O₂^{•-} induit la formation d'un composé très instable, le peroxynitrite (ONOO⁻) ¹²⁹. Le ONOO⁻ est un oxydant versatile dont la demi-vie est d'environ 1 seconde. Il a le pouvoir de réagir avec l'ADN, les protéines et les lipides menant ainsi à des dommages cellulaires et une cytotoxicité. Sa réaction avec l'ADN mène à une oxydation ou une nitration initiant ainsi une série de transformations menant à un bris des brins d'ADN. La réaction du ONOO⁻ avec les protéines induit la formation des nitrotyrosines ¹³⁰.

3.4.3 CIBLES DES ROS ET RNOS

Les ROS et RNOS s'attaquent aux constituants cellulaires et provoquent une peroxydation lipidique, une inactivation des enzymes et protéines, des mutations de l'ADN et l'oxydation des sucres ¹³¹. Dans des conditions physiologiques, les systèmes antioxydants endogènes captent les ROS et RNOS pour les éliminer. Cependant, il a été démontré que les radicaux peuvent contrôler un grand nombre de processus physiologiques normaux. Par exemple, lorsqu'ils sont présents à faible concentration, ils

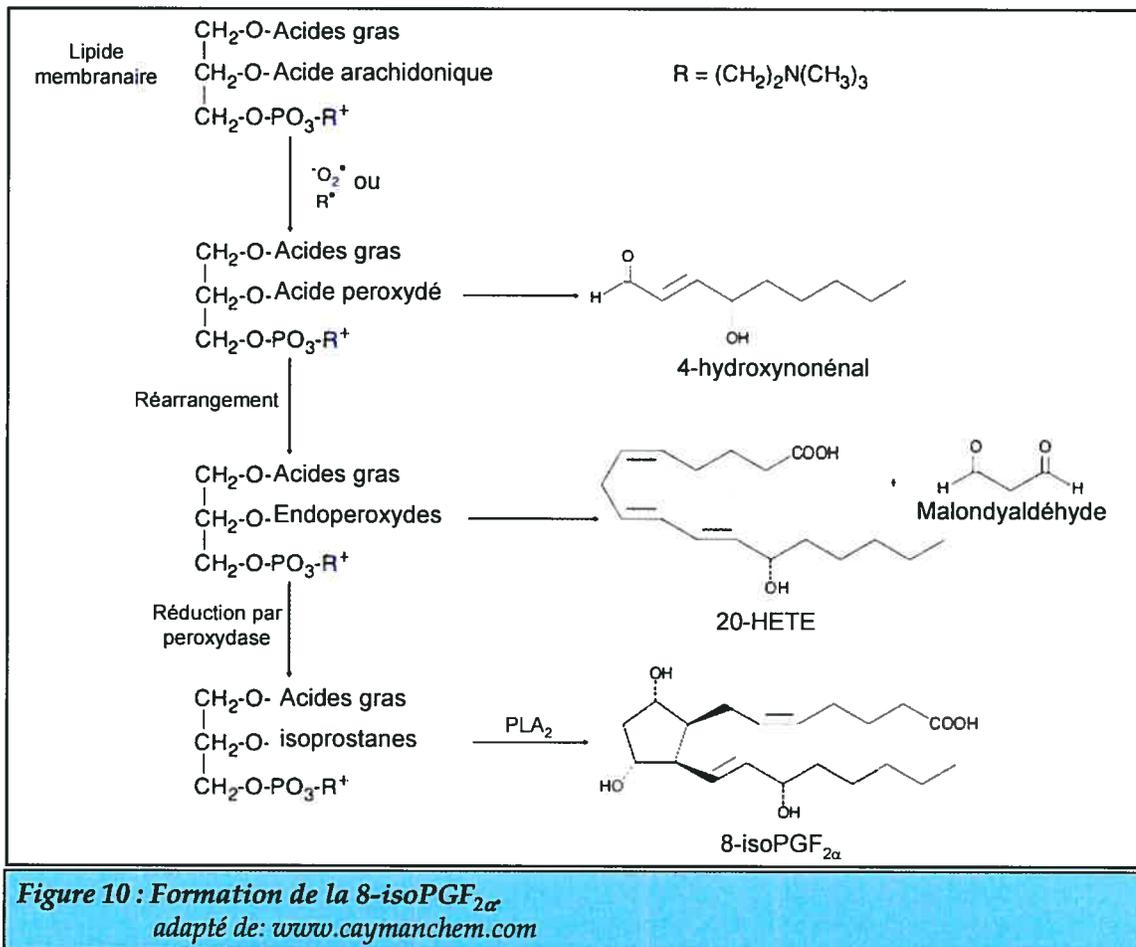
peuvent agir comme seconds messagers dans la régulation de l'apoptose de cellules cancéreuses ¹³². De même, il a été démontré que les ROS jouaient un rôle important dans le fonctionnement des cellules cardiaques et vasculaires ¹³³. Les ROS seraient responsables de l'activation de plusieurs gènes incluant des molécules d'adhésion, des enzymes antioxydantes, des substances vasoactives et des molécules chimiotactiques. Cependant, il semble que ces réponses ne soient que compensatoires à l'augmentation des ROS. Ainsi, les ROS ne sont pas toujours les éléments déclencheurs de situations pathologiques mais ils contribuent aussi aux mécanismes physiologiques normaux de l'organisme. De plus, l'organisme est en constante bataille afin de conserver un équilibre fragile entre la production de ROS et RNOS et leur élimination.

3.4.3.1 PEROXYDATION LIPIDIQUE

Les lipides sont des molécules énergétiques, des molécules de signalisation et font partie intégrante des membranes cellulaires. Ils sont constitués de longues chaînes comprenant entre 14 et 22 carbones que l'on nomme les acides gras. Ceux-ci peuvent être saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés (PUFA; *polyunsaturated fatty acids*). Ils sont présents, entre autre, dans la portion hydrophobe des phosphoglycérolipides, composés les plus abondants de la membrane cellulaire. Les PUFA contenu au sein des phospholipides, sont libérés par la phospholipase A₂. Généralement, l'attaque radicalaire se produit sur le -CH₂- central de ces PUFA, induit une déhydrogénation et par conséquent, une peroxydation lipidique. Ainsi, le OH[•] est capable d'éliminer un atome d'hydrogène de la chaîne carbonée, ce qui rend l'acide gras radicalaire. Telle que montré à la figure 10, la peroxydation non-enzymatique de ces acides gras, par exemple l'acide arachidonique, induit la production d'eicosanoïdes biologiquement très actifs incluant les isoprostanes, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ^{134,135}.

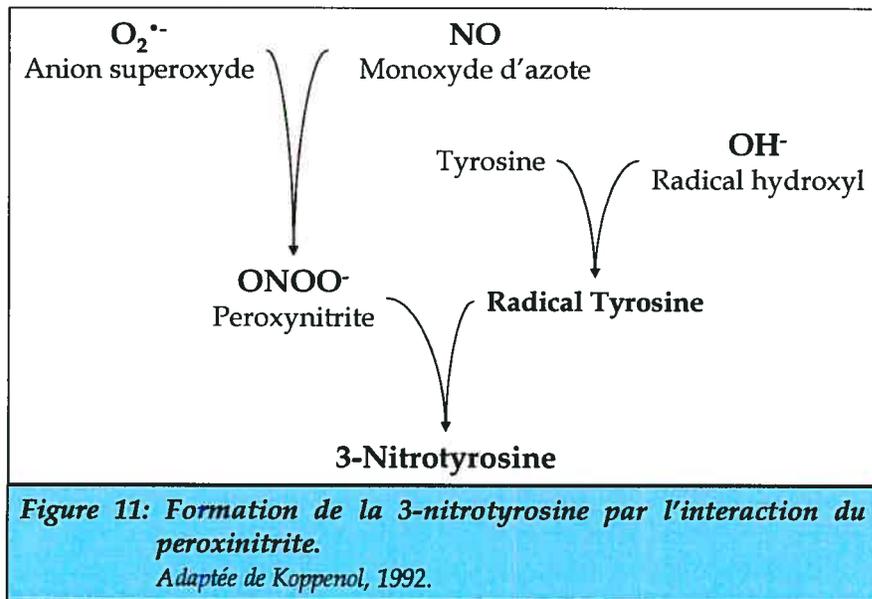
La 8-iso-isoprostane-F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}) fait partie de la famille des isoprostanes et est considérée comme étant un des marqueurs de stress oxydatif et de peroxydation lipidique endogène ¹³⁶. Elle est un puissant vasoconstricteur au niveau du rein, du poumon, du cœur, du cerveau et du placenta ^{81,135,137}. Les isoprostanes peuvent aussi avoir un effet

mitogénique sur les cellules musculaires lisses vasculaires et induire la relâche de l'endothéline par l'endothélium vasculaire ¹³⁸.



3.4.3.2 OXYDATION ET NITRATION PROTÉIQUE

Les réactions oxydatives des protéines sont généralement classées en deux catégories. Il peut s'agir d'une réaction où les liaisons peptidiques sont cassées ou bien d'une introduction de produits de peroxidation lipidique, tel que le 4-HNE, au sein même de la protéine. Les RNOS formés par la cellule peuvent entraîner la nitration des tyrosines, acides aminés présents dans la structure des protéines^{139,140}. Tel que décrit à la figure 11, ce processus implique la formation de peroxynitrite (ONOO⁻) par la combinaison du NO et du O₂^{•-} et l'oxydation de la tyrosine en radical tyrosine par le radical hydroxyl (OH⁻). Par la suite, un lien est créé entre le radical tyrosine et le peroxynitrite formant ainsi le 3-nitrotyrosine ¹⁴¹.



Le peroxynitrite n'est pas la seule voie de formation des nitrotyrosines cependant, il est le mécanisme le plus susceptible de se produire *in vivo*. Cela conduit généralement à une perte des fonctions catalytiques ou structurelles des protéines oxydées affectant ainsi leur fonction cellulaire¹⁴². Le tableau 1 présente les principales protéines sujettes à la nitration. D'autres protéines peuvent aussi subir ce phénomène cependant, la pertinence physiologique de ces découvertes faites *in vitro* reste à éclaircir.

Tableau 1: Principales protéines affectées par la nitration.
Adapté de Hanafy et coll. 2001.

Cibles	Effet de la nitration
Prostacycline Synthase	Inhibition
Superoxyde dismutase (MnSOD)	Inhibition
Neurofilament	Agrégation
Prostaglandine H Synthase	Activation

3.4.4 SYSTÈMES ANTIOXYDANTS

Afin de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS et de RNOS, la cellule possède une multitude de molécules et enzymes que l'on nomme anti-oxydants. Par définition, un anti-oxydant est toute substance capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme ¹⁴³. Les systèmes anti-oxydants cellulaires se regroupent en deux classes soient les anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques. On retrouve en figure 9 les principales voies antioxydantes de la cellule.

Les flavonoïdes, la bêta-carotène et le lycopène constituent une part de la défense anti-oxydante non-enzymatique. Ils sont des chélateurs du fer, inhibent la peroxydation lipidique, abaissent le taux des molécules d'adhésion et trappent les radicaux libres tels que le peroxy-nitrite (pour une revue ¹⁴⁴). Toutefois, la voie des antioxydants non-enzymatiques la plus commune implique l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E) et le glutathion (GSH).

3.4.4.1 LES VITAMINES

Le terme « vitamine E » englobe 4 tocophérol (α , β , γ et δ) dont la forme alpha est la plus abondante et possède les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (pour une revue ¹⁴⁵). Le caractère hydrophobe de cette vitamine lui permet de s'introduire à même les acides gras de la membrane cellulaire ainsi qu'au niveau des lipoprotéines où, en se liant au radical peroxy (ROO^\bullet), elle brise la chaîne de peroxydation lipidique ¹²³. Au cours de cette réaction, la vitamine E devient elle-même un radical libre réactif (radical α -tocophérol) qui sera ensuite régénéré en anti-oxydant par la vitamine C (figure 9).

La vitamine C, un réducteur potentiel et piègeur des ROS, est un micronutriment hydrosoluble dont certaines espèces, dont l'humain et le cobaye, n'assurent pas la synthèse. L'apport alimentaire ainsi que le métabolisme hépatique sont donc des déterminants importants de sa concentration plasmatique qui normalement est d'environ $60\mu\text{M}$ ¹⁴⁶. À ces concentrations, elle intervient dans la peroxydation lipidique. Suite à son action détoxifiante des ROS, la vitamine C passe par un métabolite radicalaire

intermédiaire, le radical ascorbyl avant de devenir l'acide dehydroascorbique (DHA). Le radical ascorbyl est toutefois beaucoup moins réactif que le radical α -tocophérol et que tous les autres radicaux libres présents dans l'organisme. Le DHA est recyclé en vitamine C par une réductase dépendante du NADPH ou par le glutathion ^{123,146}.

3.4.4.2 LE GLUTATHION ET LA GLUTATHION PEROXYDASE

Le glutathion est le thiol non-protéique le plus abondant au niveau cellulaire. Il est présent à des concentrations de l'ordre du millimolaire ce qui en fait l'anti-oxydant le plus concentré dans l'organisme ^{147,148}. Le glutathion est synthétisé à partir de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. La γ -glutamylcystéine ligase est l'enzyme limitante de la production du glutathion. Elle assure la combinaison de l'acide glutamique et de la cystéine en L- γ -glutamyl-L-cystéine. Par la suite, la glutathion synthase induit la réaction de ce composé avec la glycine produisant ainsi le glutathion. Le glutathion peut exister sous une forme réduite (GSH) ou sous une forme oxydée dans laquelle un pont disulfure relie deux molécules de glutathion (GSSG). Le cycle du glutathion englobe le GSH, la glutathion peroxydase (GPx), le GSSG et la glutathion réductase (GR) ¹⁴⁹. En combinaison avec la GPx, le GSH agit comme un donneur d'électron et détoxifie la cellule, entre autre, du H₂O₂ et des lipides peroxydés. Le GSSG ainsi produit est à nouveau réduit par la GR utilisant le NADPH comme donneur d'électron refermant ainsi la boucle du glutathion.

Au niveau cellulaire, le rapport GSH/GSSG représente un indice de l'état d'oxydation. De plus, la mesure du glutathion total (GSH+GSSG) est aussi utilisée. D'ailleurs, une déplétion des thiols tels que le glutathion induit un stress oxydatif pouvant jouer un rôle dans la pathogénèse des maladies cardiovasculaires. En effet, il a été démontré qu'une inhibition de la synthèse du glutathion chez le rat provoque une augmentation de la pression artérielle et de la production d'anion superoxyde et de TxA₂ plasmatique. Une diminution de la prostacycline et du NO au niveau plasmatique est aussi observée chez ces rats ^{150,151}.

3.4.4.3 LA SUPEROXYDE DISMUTASE ET LA CATALASE

Les superoxydes dismutases (SOD) font partie d'un groupe de métalloenzymes. Les SODs sont responsables de la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en O_2^- ¹⁵². Ce processus est une réaction d'oxydoréduction entre deux molécules de même nature ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2^-$). La SOD est présente sous trois formes : la CuZnSOD cytosolique et extracellulaire ainsi que la MnSOD, retrouvée dans les mitochondries ¹⁵². Puisque la chaîne respiratoire consomme environ 90% de l'oxygène et est le site majeur de production d'anion superoxyde, la MnSOD est de grande importance ¹⁵³. Le H_2O_2 formé par la SOD sera pris en charge par la catalase (CAT). Cette enzyme est un tétramère omniprésent exprimé au niveau du foie, des reins et des érythrocytes ¹⁵³. Elle est responsable de la réduction du H_2O_2 en O_2^- et en H_2O ¹⁵². Son action permet de limiter les effets indésirables du H_2O_2 au niveau cellulaire. Conjointement, la catalase, la SOD et la GPx représentent les enzymes anti-oxydantes de première ligne de défense lors de la présence d'un stress oxydatif.

3.5 MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE

La description de la mort cellulaire programmée remonte en 1972, par le groupe de Kerr. Ces auteurs ont montré que les cellules qui entraient dans ce processus avaient des caractéristiques morphologiques similaires qui étaient différentes de celles retrouvées lors de la nécrose ¹⁵⁴. Ils ont alors nommé cette mort cellulaire « apoptose » qui signifie, en grec, la chute des pétales ou des feuilles à l'automne. L'apoptose est un phénomène généralisé, qui est conservé à travers toutes les espèces ^{155,156}. Ce processus est utilisé pour éliminer les cellules altérées, infectées ou en excès. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige et programme sa propre mort.

L'apoptose est impliquée dès la formation de l'embryon. En fait, lors de la morphogenèse des doigts, les cellules de l'espace interdigital subissent le processus apoptotique ¹⁵⁷. L'apoptose intervient aussi lors du développement placentaire normal. Le placenta subit un remodelage constant caractérisé par le renouvellement des

syncytiotrophoblastes. Ce phénomène est assuré par une balance apoptotique des cytotrophoblastes villosités. Ces derniers se différencient, jouant donc le rôle de cellules souches au sein des villosités placentaire. Ainsi, après la prolifération et la différenciation en sous-types cellulaires spécifiques, les cellules âgées sont sélectivement enlevées et remplacées par une population plus jeune de trophoblastes sans affecter les cellules environnantes. De plus, la mort cellulaire programmée semble aussi jouer un rôle dans la tolérance immunitaire maternelle aux antigènes paternels qui sont exprimés sur les trophoblastes (pour une revue ¹⁵⁸). En fait, le placenta étant d'origine maternelle et fœtale est aussi, par conséquent, sous l'influence des gènes paternels. Lors de son développement, les trophoblastes acquièrent à leur surface des antigènes provenant du père pouvant être reconnus comme du non-soi par le système immunitaire maternel. Elles expriment aussi à leur surface le « Fas-ligand » (FasL) ¹⁵⁹. Cette molécule appartient à la famille du TNF. L'expression du FasL à la surface des cellules est retrouvée au niveau de sites immunoprivilégiés tel que les testicules où des barrières physiologiques diminuent les actions du système immunitaire ¹⁶⁰. Le FasL induit l'apoptose de la cellule porteuse de son récepteur (FasR). Le FasR est exprimé abondamment à la surface des lymphocytes T, cellules actives du système immunitaire. L'apoptose de ces cellules est alors enclenchée de façon à prévenir la réaction immunitaire subséquente aux antigènes paternels. L'apoptose est aussi présente chez l'adulte afin de maintenir l'homéostasie cellulaire résultat d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire permettant le contrôle de la taille des tissus par exemple, lors du renouvellement des kératinocytes de la peau ¹⁶¹.

L'apoptose est donc un mécanisme physiologique déterminant puisque, des dérèglements de son processus ou de son contrôle peuvent engendrer une mort cellulaire exagérée ou insuffisante pouvant être à l'origine de certaines pathologies et de quelques anomalies développementales¹⁶².

3.5.1 CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

Un des premiers changements est la réduction du volume cellulaire ¹⁶³ induite par la déshydratation de la cellule. Pendant cette étape, le contact avec les cellules

avoisinentes est perdu. Au cours de cette déshydratation, les organites cellulaires demeurent intacts et ce, jusqu'à la dernière étape de l'apoptose. Le matériel nucléaire subit aussi quelques modifications. Premièrement, la chromatine se condense et se fragmente en petites masses. Par la suite, sur la surface de la cellule apoptotique de petites vésicules se forment, composées de membranes plasmiques et comprenant la chromatine condensée et des composantes du cytoplasme. Ces vésicules, en se détachant de la cellule, sont responsables de la formation des corps apoptotiques. Les cellules avoisinantes ou les macrophages phagocytent les corps apoptotiques sans induction du processus inflammatoire puisque le contenu intracellulaire n'est pas relâché. Ceci permet de différencier l'apoptose de la nécrose où l'éclatement de la cellule mène à une réaction inflammatoire ¹⁶⁴. En plus des changements morphologiques cellulaires qui surviennent dans le processus apoptotique, des altérations biochimiques sont aussi présentes. Tout d'abord, une fragmentation de l'ADN ainsi qu'une perte de la fonction de la cellule survient. Par la suite, une perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane cellulaire est observée au cours de laquelle les phospholipides présents exclusivement dans la couche interne de la membrane, migrent au niveau de la couche externe. Ce processus externalise les lipides et permet aux macrophages de reconnaître les cellules en apoptose ¹⁶⁵.

3.5.2 EFFECTEURS DE L'APOPTOSE

L'étude des gènes impliqués au cours de ces processus ont été caractérisés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, (*c. elegans*) où, au cours de son développement, une partie des cellules est éliminée par apoptose. Les gènes suivants ont été mis en évidence et sont directement impliqués dans le processus apoptotique : CED-3, CED-4 et CED-9 (CED ; *C. elegans death*) ¹⁶⁶. Des homologues des protéines codés par ces gènes ont été identifiés chez les mammifères. Ainsi, la protéine codée par CED-3 possède une homologie avec l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β ¹⁶⁷. Cette enzyme ne semble pas jouer de rôle primordial dans l'apoptose, son rôle chez les mammifères étant plutôt réservé au système immunitaire. Toutefois, elle a permis d'identifier la famille des caspases. Les gènes CED-9

et CED-4 ont conduit respectivement à l'identification de la famille Bcl-2 et Apaf-1. Cette dernière intervenant dans l'initiation des caspases ^{168,169}.

3.5.2.1 LA FAMILLE BCL-2

Tout d'abord, la protéine Bcl-2 était considérée comme un proto-oncogène. Par la suite, le groupe de Adams a démontré que Bcl-2 inhibait l'apoptose plutôt que d'activer la prolifération cellulaire ¹⁷⁰. L'importance de cette protéine comme régulateur de la mort cellulaire a été confirmée par les souris déficientes en Bcl-2 qui sont caractérisées par une mort programmée massive des lymphocytes, des cellules rénales et des mélanocytes ¹⁷¹. La découverte de protéines homologues de Bcl-2 a permis l'identification d'une famille de protéines pro- ou anti-apoptotiques ¹⁷². Cette famille compte près de vingt membres possédant au moins un des quatre domaines BH : BH1 à BH4 (*BCL-2 Homology domain*). La sous-famille nommée Bcl-2 comprend les protéines anti-apoptotiques tandis que les sous-familles Bax et BH3 contiennent les protéines pro-apoptotiques. Le ratio entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 régule la réponse cellulaire suite à un stimulus apoptotique.

La sous-famille Bcl-2 est formée, entre autre, de : Bcl-2, Bcl-W et Bcl-XL. Les protéines de cette famille possèdent un domaine transmembranaire qui permet leur ancrage au niveau de la membrane externe des mitochondries, du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire. Alors que Bcl-2 est liée en permanence à la membrane, Bcl-W et Bcl-XL s'y associent seulement lorsque l'apoptose est enclenchée. Ces protéines interviennent dans le processus apoptotique de façon spécifique à un type cellulaire ¹⁷³. Par exemple, Bcl-2 est exprimé au niveau des lymphocytes, des cardiomyocytes, des cellules rénales et placentaires ^{158,171,174} tandis que Bcl-W et Bcl-XL sont respectivement retrouvées dans les cellules germinales et neuronales ^{175,176}. La protéine Bcl-2 est la plus connue de nos jours. Elle contrôle négativement l'initiation de la caspase-2, première caspase impliquée dans la cascade apoptotique. Par son effet anti-apoptotique, Bcl-2 participe au maintien de l'intégrité de la mitochondrie en empêchant l'association des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.

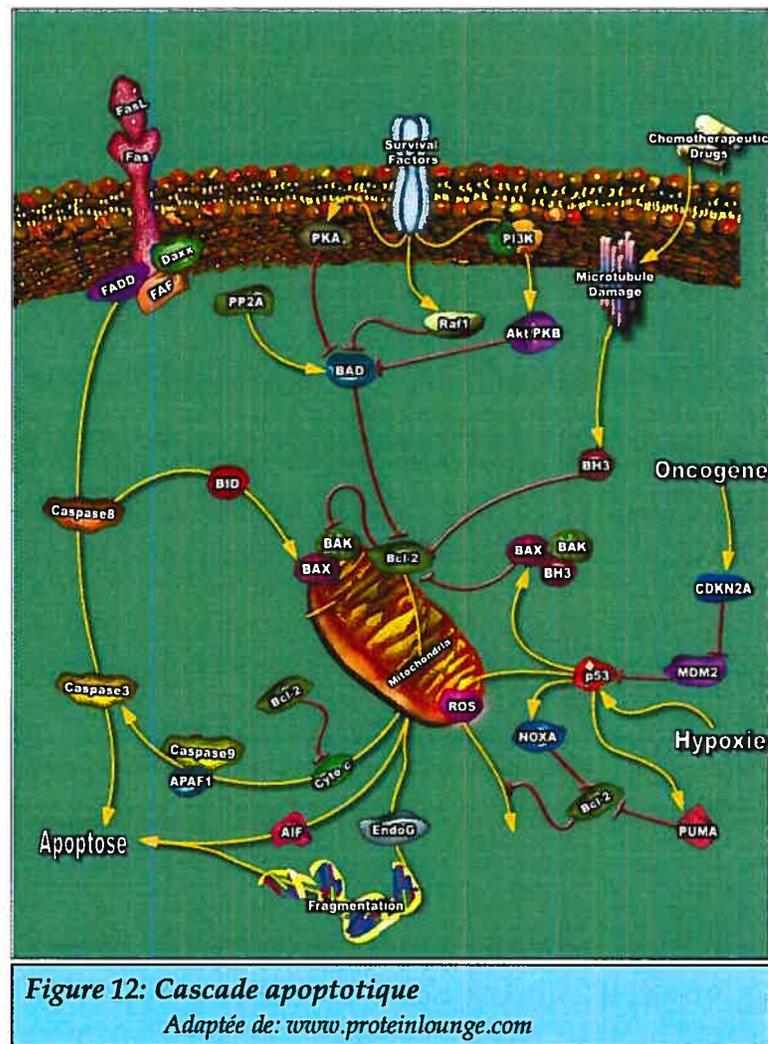
La sous-famille Bax est composée de trois membres pro-apoptotique : Bax, Bak et Mtd/Bok ¹⁷⁷. Les protéines Bax et Bak sont retrouvées au niveau de plusieurs organes alors que l'expression de Bok est limitée dans certains tissus reproducteurs tels que l'ovaire, l'utérus et les testicules ¹⁷⁸. En condition non-apoptotique, Bax est un monomère librement exprimé au niveau du cytoplasme de la cellule. Lors d'un signal d'apoptose, plusieurs molécules de Bax forment un complexe et s'insèrent au niveau de la membrane externe des mitochondries ¹⁷⁹. Agissant de concert, Bax et Bak participent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale amenant la relâche du cytochrome c, molécule impliquée dans l'activation des caspases (Figure 12). Elles sont aussi responsables de la perte du potentiel mitochondrial ¹⁸⁰. De plus, ces deux protéines pro-apoptotiques permettent l'induction des caspases par la libération du calcium intraréticulum endoplasmique ¹⁸¹.

La sous-famille BH3 est constituée de plus de huit membres dont les plus connues sont Bid, Bad, Bik, Brk et Bim. Ces protéines, comme celles de la sous-famille BAX, ont une fonction pro-apoptotique. Certaines de ces protéines sont impliquées pendant le développement embryonnaire et au cours des maladies dégénératives ¹⁸². Les protéines de la sous-famille BH3 s'opposent aux effets anti-apoptotiques de Bcl-2. Par exemple, Bcl-2 assure la survie cellulaire dans les cellules épithéliales du rein, les myélocytes et les mélanocytes. En son absence, la protéine pro-apoptotique Bim induit l'apoptose de ces cellules ¹⁸³.

3.5.2.2 LES CASPASES

Les caspases font partie d'une famille de protéases à cystéines et sont essentiellement retrouvées au sein de plusieurs voies menant à l'apoptose. Cette famille de protéines compte, à ce jour, 14 membres qui sont constitutivement présents dans la cellule et très conservés à travers les espèces ¹⁸⁴. Les caspases-1 à -10 de même que la caspase-14 ont été identifiées chez les mammifères. Les caspases-11 et -12 exprimées chez la souris sont des homologues des caspases-4 et -5 de l'homme, tandis que la caspase-13 bovine est un homologue de la caspase-4 humaine ¹⁸⁵. La présence d'une pseudo caspase-12 a aussi été

identifiée chez l'humain ¹⁸⁶. Selon leur fonction apoptotique ou non, les caspases sont réparties en trois groupes. Le premier groupe inclut des protéines pouvant être ou non impliquées dans la cascade apoptotique. Par exemple, chez l'humain, les caspases -1, -4 et -5 jouent aussi un rôle dans l'activation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 et -18 tandis que la caspase-14 est une protéine non-apoptotique participant à la différenciation des kératinocytes ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Les caspases impliquées dans les processus apoptotiques se subdivisent en deux catégories, initiatrices (caspases-8, -9 et 10) ou effectrices (caspases-3, -4 et -7). En condition non-apoptotique, toutes les caspases présentes dans la cellule sont inactives. Suite à un signal apoptotique, les caspases initiatrices sont auto-activées. Par exemple, l'activation de la caspase-8 se produit lorsque FasL se lie à son récepteur et celle de la caspase-9 est facilitée par la relâche du cytochrome c mitochondrial et de Apaf1 (figure 12). Ensuite, les caspases initiatrices activées clivent les caspases effectrices sur les résidus aspartate (Asp), les rendant à leur tour active. Ainsi, la caspase-9 sera responsable de l'activation des caspases-3 ou -7. Une fois activées, les caspases effectrices agissent de façon protéolytique sur une variété de cible cellulaire telles que l'actine et les protéines régulatrices de l'intégrité de l'ADN. Ce processus induit sa fragmentation et, par conséquent, conduit à la mort cellulaire (pour une revue ¹⁸⁸).



4 LA GROSSESSE

La grossesse est une condition particulière où la morphologie et physiologie de la femme se transforment afin de permettre le développement d'un fœtus normal. La grossesse est unique puisque les altérations des différents systèmes tel qu'endocrinien, cardiovasculaire et rénal reviennent à la normale après l'accouchement. Malheureusement, plusieurs pathologies peuvent survenir au cours de la grossesse et entraver le développement et la croissance fœtale ainsi que le bien-être maternel. Une revue des changements et mécanismes de la grossesse normale nous permettra de mieux comprendre les altérations et le comportement de l'organisme qui surviennent lors de pathologies obstétricales.

4.1 SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

Au cours de la grossesse, le volume circulant hausse progressivement à partir de la 6^{ème} semaine pour atteindre un maximum vers la 30^{ème} semaine de grossesse. À ce stade, le volume circulant a augmenté de 40% comparativement à une nullipare et restera stable jusqu'à terme ¹⁹⁰. Cette élévation du volume plasmatique est relativement plus importante que l'augmentation de la masse d'érythrocytes résultant en une hémodilution et une diminution de la concentration en hémoglobine ^{191,192}. Cette hausse de volume facilite l'échange foeto-maternel en nutriments, métabolites et gaz et aide à palier à l'importante perte de sang lors de l'accouchement. Le débit cardiaque augmente à un degré similaire au volume circulant. Au cours du premier trimestre, le débit cardiaque est 30-40% plus important que chez la femme non-enceinte ¹⁹³. Par échographie Doppler, le débit cardiaque passe d'une moyenne de 6.7 litres/minute à 8-11 semaines à environ 8.7 litres/minute à 36-39 semaines. Cette hausse est due principalement à une augmentation du volume systolique (35%) et, à un moindre degré, une élévation de la fréquence cardiaque (15%) ¹⁹⁴. Chez la rate gestante, près de 50% de l'augmentation du volume est atteinte durant la dernière semaine de gestation ^{195,196}. Cette hausse est également accompagnée d'une hémodilution ainsi que d'une élévation du débit cardiaque ^{197,198}. Une diminution de la réactivité aux agents vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, la vasopressine et la norépinéphrine est aussi observée au cours de la grossesse normale. Cette baisse de réactivité est observée au niveau des artères de résistance tels que dans les artères mésentériques et les artères de conduit comme l'aorte ¹⁹⁹⁻²⁰¹. Cette diminution de réactivité semble importante au déroulement de la grossesse normale puisque dans des cas d'hypertension de grossesse et de pré-éclampsie, elle ne se manifeste pas ²⁰².

La grossesse amène aussi des changements au niveau de la pression artérielle. Bien que le volume circulant et l'activité du SRAA soient augmentés, une diminution de pression artérielle est observée vers la 20^{ème} semaine chez la femme et vers le jour 18 chez la rate ^{203,204}. La courbe de pression artérielle dans le temps est différente entre les espèces. Chez la femme, la baisse de pression artérielle survient au premier trimestre et atteint son

seuil le plus bas pendant le second trimestre pour ensuite revenir à des valeurs pré-gestationnelles à la fin de la grossesse ²⁰⁵. Chez la rate gestante, la baisse de pression artérielle est amorcée vers le 17-18^{ième} jour et diminue jusqu'à terme soit au jour 23 ²⁰⁴. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer cette baisse paradoxale de pression artérielle au cours de la grossesse. Par exemple, un changement de la réponse aux agents vasoconstricteurs tels que l'ANGII ^{202,206}, une diminution fonctionnelle de l'activité des canaux calciques dépendants du voltage ²⁰⁷ ainsi qu'une augmentation des vasodilatateurs endogènes comme le NO ^{202,208}. Certaines études suggèrent aussi que la pression pourrait être régulée sous l'action des hormones stéroïdiennes placentaires et ovariennes. Chez la rate gestante, la baisse de pression artérielle coïncide avec l'augmentation de la concentration plasmatique de l'estradiol ²⁰⁹. Il semble aussi que la relaxine, hormone présente à la mi-gestation ²¹⁰, pourrait aussi être impliquée dans la régulation de la pression artérielle chez la rate puisqu'elle induit une baisse de pression artérielle lorsque donnée à des rates non-gestantes ²⁰⁴. La régulation de la pression artérielle au cours de la grossesse semble être soumise à plusieurs mécanismes et d'autres études sont nécessaires afin de bien les comprendre.

4.2 SYSTÈME RÉNAL

D'importants changements ont lieu au niveau de l'homéostasie des liquides et du sodium corporel afin de maintenir un flot utéro-placentaire adéquat. Pour ce faire, le rein maintient l'équilibre hydrique et retient le sodium. Pendant la gestation, une augmentation du débit de filtration glomérulaire (DFG) ainsi que du débit sanguin rénal a lieu tant chez la femme que chez la rate ^{211,212}. En fait, chez la femme, à la fin du premier trimestre, le DFG augmente de près de 40 à 50% au dessus des valeurs pré-gestationnelles ²¹³. Chez la rate gestante, une augmentation de 20 à 30% du DFG a lieu ²¹⁴. Cependant, le moment où cette hausse survient reste encore controversé entre la mi-gestation et la fin de celle-ci ^{212,215}. Au cours de la grossesse normale chez la femme, cette augmentation de la filtration glomérulaire mène à une élévation de la fraction d'excrétion de l'albumine. Cette protéinurie physiologique ne dépasse que rarement 250mg d'albumine/24h et est considérée non dommageable pour l'équilibre rénal de la mère. Une valeur supérieure à

500mg d'albumine/24h est considérée pathologique. Chez la rate gestante, les valeurs normales de protéinurie sont controversées²¹⁶⁻²¹⁸. Cette différence entre les études semble être due à la méthode de prélèvement et de mesure des protéines dans les urines. Cependant, avec des augmentations entre 40 et 80% de la quantité de protéines dans les urines, comparativement aux groupes témoins, les auteurs ont conclu à une protéinurie pathologique.

Le débit de filtration glomérulaire est le principal facteur régulant l'équilibre du sodium. Afin de prévenir une trop grande perte d'eau et de solutés, la réabsorption rénale est aussi modifiée au cours de la grossesse²¹⁹. La grossesse induit une augmentation de la rétention de 900mmol de sodium et de 7,5litres d'eau²²⁰. Puisque la rétention d'eau et proportionnellement plus importante que celle du Na⁺, sa concentration plasmatique s'en trouve diminuée. En fait, chez la femme non-enceinte, cette concentration est de 140mEq/L et diminue à des valeurs de 137mEq/L lors de la grossesse. Elle est ainsi maintenue rigoureusement par les reins. Cette dilution constitue la plus importante modification rénale. Cette augmentation de la rétention sodique se produit aussi pendant la dernière semaine de gestation chez la rate²²¹.

4.2.1 SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE

Au cours de la grossesse humaine et murine, on observe une activation du SRAA, tel que démontré par l'augmentation de l'activité rénine (PRA) et de la concentration d'aldostérone plasmatique^{196,216,222}. Le SRAA est régulé différemment au cours de la grossesse puisque la concentration d'ANGII plasmatique ne corrèle pas avec celle de l'aldostérone²²³. Chez l'humain non-enceinte, une augmentation de l'axe rénine-angiotensine-aldostérone mène généralement à une hausse de pression artérielle. La relation pression artérielle-SRAA au cours de la grossesse est paradoxale puisque une hausse du SRAA est accompagnée d'une diminution de la pression artérielle. Cette relation paradoxale est aussi présente chez les femmes souffrant de pré-éclampsie où l'activation du SRAA est beaucoup plus faible et la pression artérielle est augmentée comparativement à la grossesse normale. On observe aussi ce phénomène chez la rate

gestante où une augmentation de la PRA précède la diminution de la pression artérielle ²²⁴.

Le groupe de Bird, a démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur AT₁ au niveau de l'endothélium et des muscles lisses des artères utérines chez la brebis gestante. Cependant, aucun changement n'a été observé dans les muscles lisses des vaisseaux systémiques ²²⁵. La gestation chez la rate entraîne une diminution de l'expression des AT₁ dans le lit vasculaire utérin ²²⁶. Au niveau de la surrénale, l'affinité, le nombre et la transcription de l'ARNm des AT₁ ne semblent pas modifiés par la gestation chez la rate ²²⁷. Toutefois, il a été démontré récemment que l'expression de l'ARNm et de la protéine du récepteur AT₂ était diminuée pendant la gestation chez la rate. Lorsque l'expression des AT₂ diminue, le ratio AT₁/AT₂ augmente favorisant ainsi les récepteurs AT₁ ²²⁸.

4.3 SYSTÈME ENDOCRINIEN

Chez l'humain, au cours du premier trimestre, le corps jaune est responsable de la sécrétion de progestérone jusqu'à la 10^{ème} semaine de grossesse. À la fin du premier trimestre, la sécrétion de progestérone est prise en charge par les cellules du syncytiotrophoblaste placentaire jusqu'à la fin de la grossesse ²²⁹. Les concentrations plasmatiques de progestérone continue d'augmenter tout au long de la grossesse. Cependant, certaines études ont démontré que ces concentrations diminuaient à l'approche de l'accouchement afin de favoriser les contractions utérines. L'enzyme responsable de la conversion de la prégnénolone (*3β-hydroxystéroïde déshydrogénase*) en progestérone n'est pas exprimée par la surrénale fœtale ²³⁰, la progestérone placentaire constitue donc le substrat nécessaire à la production de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes par la surrénale fœtale. Chez la rate gestante, le corps jaune assure la production de la progestérone tout au long de la gestation ²³¹.

Les œstrogènes participent à l'implantation, au développement de la glande mammaire ainsi qu'à la production de prolactine lors de l'accouchement. La production

d'oestrogènes est assurée par le corps jaune jusqu'à la 6^{ème} semaine de grossesse chez l'humain. Par la suite, tout comme pour la progestérone, le placenta prend la relève. Le placenta humain n'exprime pas l'enzyme requise (*17- α hydroxylase*) pour la synthèse des androgènes (*DHEA : Dehydroepiandrosterone*), précurseurs des oestrogènes. Les surrénales et le foie fœtaux fournissent les précurseurs (DHEA et DHEA-Sulfate) nécessaires pour la synthèse d'œstriol, d'œstradiol et d'œstrone ²³². Cette interaction foeto-maternel est essentielle pour accomplir la stéroïdogénèse. Chez la rate gestante, le placenta exprime la *17- α hydroxylase* au niveau des trophoblastes géants assurant ainsi sa propre production d'androgènes.

4.4 ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES

La grossesse est caractérisée par des changements au niveau du métabolisme des carbohydrates et des lipides afin d'assurer un apport continu en nutriments au fœtus ²³³. Il existe deux étapes importantes pendant la grossesse où le métabolisme s'adapte à la croissance fœtale. Ainsi, la première correspond au 6 premiers mois. Cette période est caractérisée par une croissance limitée du fœtus. Au cours de cette phase, une augmentation de l'emmagasinage des lipides se produit. Ce phénomène est observé chez la femme ²³⁴ et chez la rate ²³⁵ et semble être favorisé par l'augmentation des oestrogènes, de la progestérone et de l'insuline lors de la grossesse ²³⁶. Dans le dernier tiers de la grossesse, la demande énergétique du fœtus se fait de plus en plus grande. Ainsi, le métabolisme de la mère devient catabolique et induit la dégradation des graisses par lipolyse ²³⁷. Vers la fin de la grossesse, on observe une hypoglycémie consécutive à l'utilisation grandissante du glucose par l'unité foeto-placentaire et à une diminution de la gluconéogénèse. Bien que durant cette période la lipolyse soit augmentée, le transfert placentaire des acides gras est relativement faible. Ces acides gras sont utilisés comme combustible alternatif de premier choix dans la β -oxydation pour produire des corps cétoniques, directement acheminés vers le fœtus et de l'acétyl-CoA, substrat du cycle de Krebs ²³⁸. Le métabolisme des lipides par la β -oxydation peut générer, de façon négligeable, la production de ROS suite à la respiration cellulaire.

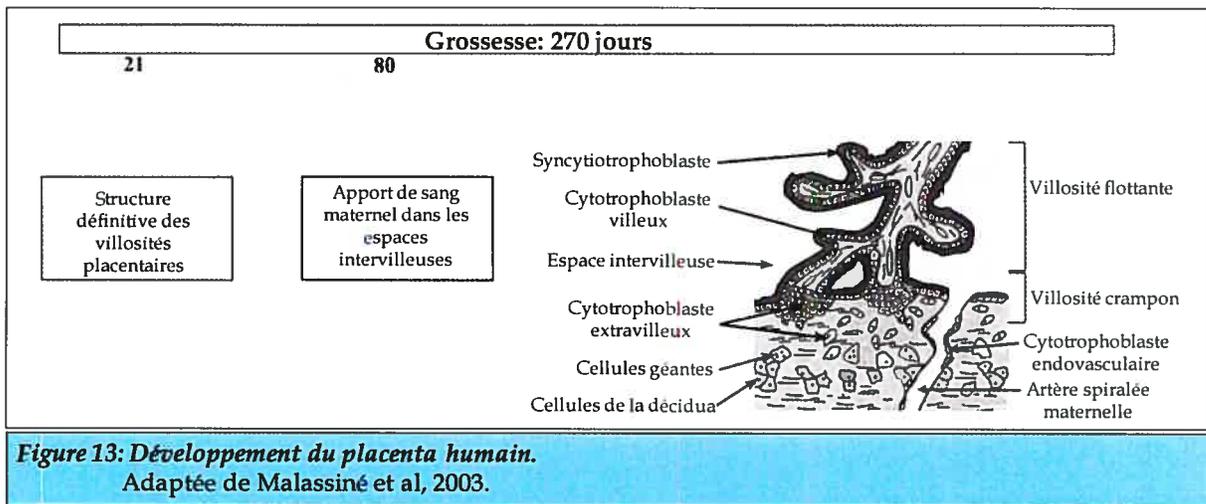
4.5 LE PLACENTA

Le placenta est un organe complexe, fonctionnellement diversifié et autonome. Il fournit, pour le fœtus en développement, le système respiratoire, rénal, intestinal et endocrinien. La section suivante sera axée sur la formation du placenta chez l'humain et chez la rate ainsi que sur l'endocrinologie du placenta dans le déroulement normal de la grossesse.

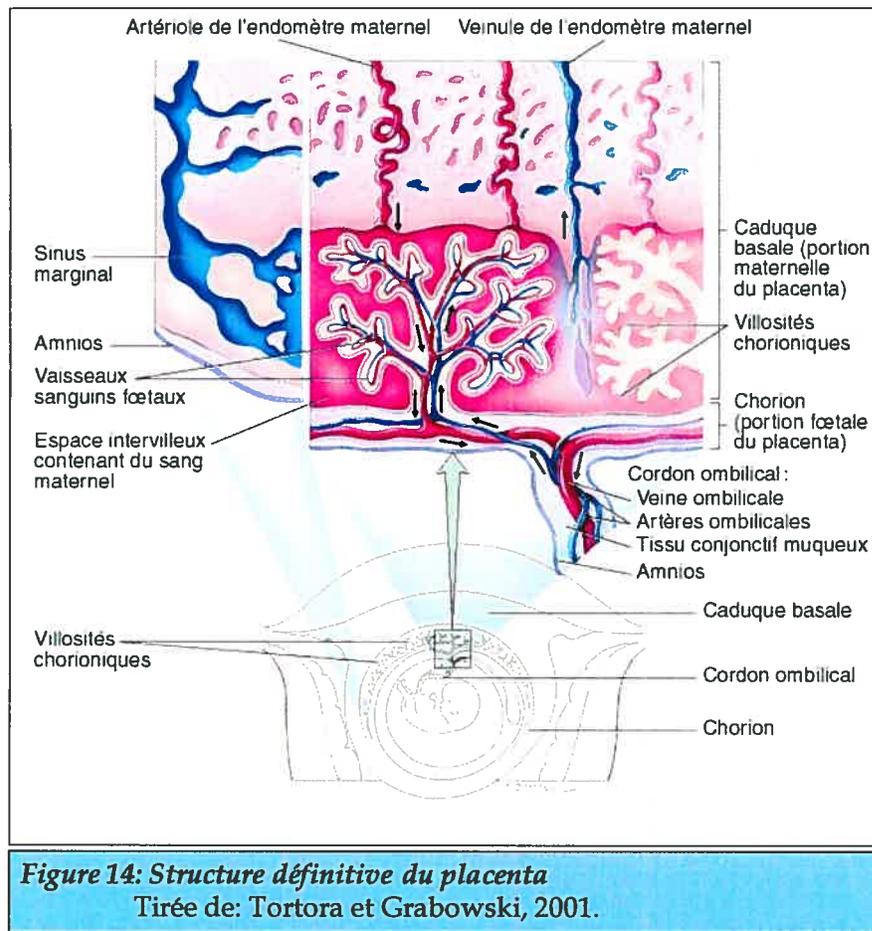
4.5.1 LE DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA

CHEZ LA FEMME

La formation du placenta débute par l'implantation du blastocyste, embryon âgé de 5 à 10 jours, dans la paroi utérine. La forme définitive du placenta humain est établie dès le 21^{ème} jour de grossesse. À la suite de la fécondation, le blastocyste adhère donc à la paroi utérine afin de s'y implanter et le développement des villosités choriales, unités fonctionnelles du placenta, est amorcé. Ce processus implique la participation des cytotrophoblastes. Ces cellules se différencient en suivant deux voies : les cytotrophoblastes villeux et extravilleux. D'abord, les cytotrophoblastes villeux, cellules qui entourent le blastocyste, s'accolent à l'épithélium utérin. La prolifération rapide et la fusion de ces cytotrophoblastes induisent la formation d'un syncytium multinuclé, le syncytiotrophoblaste. Celui-ci, au caractère très envahissant va permettre l'intégration complète du blastocyste dans la paroi utérine. Des colonnes de trophoblastes en prolifération vont par la suite pénétrées à l'intérieur du stroma utérin pour induire la formation des villosités placentaires. Ces villosités se divisent en deux types : les villosités flottantes, situées dans l'espace intervillieuse et les villosités crampons, ancrées au sein de l'utérus. Ces villosités sont complètement entourées par le syncytiotrophoblaste (Figure 13). Ce dernier possède de multiples propriétés dont une fonction hormonale et des fonctions d'échanges et d'absorption ²³⁹⁻²⁴³.



Les cytotrophoblastes extravilloux sont situés au niveau des villosités crampons, villosités directement en contact avec la paroi utérine (Figure 13). Ces cytotrophoblastes forment des colonnes cellulaires et possèdent des propriétés envahissantes. Ces cellules sont ainsi responsables de l'invasion trophoblastique. Cette invasion implique deux processus. D'abord, les cytotrophoblastes extravilloux prolifèrent et migrent dans l'endomètre maternel où ils se différencient en cellules géantes multinucléées. Toutefois, les cytotrophoblastes extravilloux vont surtout envahir l'utérus jusqu'au myomètre utérin. Lors de cet envahissement, ceux-ci érodent les artères utéro-placentaires maternelles et se substituent, à quelques endroits, aux cellules endothéliales²³⁹. Ce processus confère à ces vaisseaux une faible impédance et les rend insensibles aux différentes stimulations vasomotrices²⁴⁴. Cette nouvelle condition vasculaire permet l'augmentation du flux sanguin afin de répondre aux demandes métaboliques fœtales. De plus, elle permet l'irrigation constante des espaces intervillouxes, réservoir de sang maternel. Ainsi, au début du deuxième trimestre, le placenta est constitué de plusieurs villosités choriales, chacune d'elle étant composée d'un vaste et profond réseau de vaisseaux fœtaux au sein même du tissu maternel. Ces villosités sont le lieu des échanges foeto-maternels. Au fur et à mesure que le terme de la grossesse approche, le nombre des cytotrophoblastes décroît tandis que celui des syncytiotrophoblastes augmente favorisant la formation des villosités choriales (Figure 14). Le placenta humain est dit hémomonochorial puisqu'une seule couche de syncytiotrophoblastes sépare la circulation maternelle des vaisseaux fœtaux⁸⁰.



CHEZ LES RONGEURS

Le placenta des rongeurs diffère du placenta humain au niveau de sa morphologie et de son rôle endocrinien. Cependant, le placenta des rongeurs se développe de façon discoïde et invasive tout comme chez la femme. Chez la rate, les embryons sont distribués dans la corne utérine par des contractions de l'utérus et sont implantés sur le côté anti-mésométrial¹⁹⁸. Cependant, la structure placentaire est formée du côté mésométrial (Figure 15-A). Suite à l'implantation du blastocyste à la paroi utérine, un cône pré-placentaire constitué de petits trophoblastes se crée. C'est à partir de cette structure que le placenta est formé. Tout comme chez la femme, l'invasion trophoblastique est présente et survient en deux voies : une invasion interstitielle et une invasion endovasculaire. Toutefois, chez l'humain, l'invasion interstitielle précède l'invasion endovasculaire tandis que chez la rate ces deux phénomènes semblent survenir dans un même temps²⁴⁵. Chez la rate, l'invasion trophoblastique débute entre les jours 15 et 17 pour se terminer au jour

foetaux sont entrelacés par les capillaires maternels. Au pourtour de ces labyrinthes, une dernière couche de cellules est présente faisant face au myomètre utérin. Ces cellules comprennent des trophospongium et des trophoblastes géants. Ces dernières, qui sont responsables de l'invasion trophoblastique au début de la formation du placenta, possèdent des caractéristiques nécrotiques à la fin de la gestation. ¹⁹⁸.

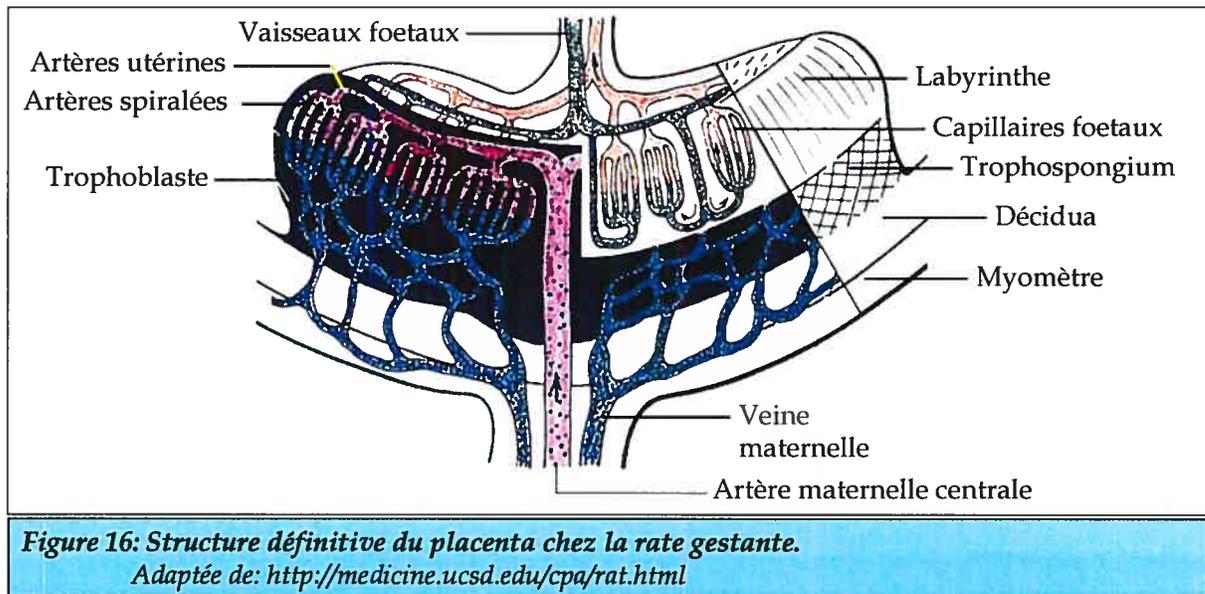


Figure 16: Structure définitive du placenta chez la rate gestante.
Adaptée de: <http://medicine.ucsd.edu/cpa/rat.html>

4.5.2 CIRCULATION FOETO-MATERNELLE

La formation du placenta tant chez la femme que chez les rongeurs induit la mise en place de la circulation foeto-maternelle. La circulation utérine subit un remodelage important au cours de la grossesse afin de faire face à l'importante augmentation du débit sanguin. Cette élévation du flot sanguin permet d'une part l'apport en nutriment nécessaire au fœtus et d'autre part, l'élimination des déchets métaboliques foetaux. Des études menées chez la rate gestante ont montré que la vascularisation utérine subit une hypertrophie et une hyperplasie ²⁴⁸. De plus, il a été démontré que le diamètre ainsi que la résistance à l'étirement des vaisseaux utérins augmentent de près du double au cours de la gestation chez le rat ²⁴⁹. Ce remodelage s'effectue aussi au niveau des veines. En effet, une augmentation du diamètre des veines utérines est aussi observée ²⁵⁰.

4.5.3 FONCTIONS ENDOCRINES DU PLACENTA

Outre les fonctions stéroïdogéniques discutées dans la section 4.3, le placenta est capable de synthèse de diverses autres hormones ayant des propriétés vasoactives ou non.

HORMONES VASOACTIVES

Le placenta humain possède toute la machinerie cellulaire nécessaire à l'élaboration d'un système rénine-angiotensine local. La rénine et l'angiotensinogène sont exprimés au niveau du chorion, de la décidua et des villosités choriales^{251,252}. De plus, la rénine semble présente en plus grande quantité pendant le premier trimestre²⁵³. L'enzyme de conversion de l'ANG est aussi présent dans le placenta assurant la synthèse d'ANGII placentaire et ainsi une mécanique cellulaire du SRA complète. Des cytokines et l'endothéline sont aussi produites dans le placenta et sont capables de moduler la relâche de rénine^{254,255}. L'ANGII placentaire est capable d'induire la relâche de précurseurs dans la synthèse des oestrogènes²⁵⁶. Chez la rate, peu d'études ont été effectuées concernant la présence d'un SRA locale. Cependant, il a été démontré que les placentas expriment peu ou pas de rénine²⁵⁷.

Au cours de la grossesse, les prostaglandines, la thromboxane et les isoprostanes sont impliquées lors de l'implantation. De plus ces hormones participent au développement et à la fonction vasculaire placentaire ainsi qu'aux contractions utérines lors de l'accouchement. La cascade de l'acide arachidonique semble être présente au sein de placenta. Dès le premier trimestre, la PLA₂ est exprimée dans les cytotrophoblastes villex. La synthèse de la PGH (PGHS) est aussi exprimée dans ces cellules ainsi que dans les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes extra-villex. La synthèse de la PGE₂ (PGES) a été, tant qu'à elle, localisée par immunohistochimie dans les cytotrophoblastes villex et extra-villex²⁵⁸. Il a été démontré que le placenta produit et sécrète de la prostacycline, de la thromboxane et des isoprostanes^{81,85,259}. Chez la rate, le placenta produit aussi des prostanoides²⁶⁰. Au cours de la grossesse normale, une balance est maintenue entre ces différents agents vasoactifs de sorte que l'environnement placentaire demeure dans un état d'homéostasie. En cas pathologique, il arrive que l'équilibre des

prostanoides soit compromis et ils peuvent être utilisés comme marqueurs de stress oxydatif et de dysfonctionnement placentaire ^{82,261}.

HORMONES DE CROISSANCES ET HORMONE LACTOGÈNE PLACENTAIRE

L'hormone lactogène placentaire (hPL) et l'hormone de croissance humaine (hGH) sont toutes deux, au cours de la grossesse, des régulateurs importants du métabolisme de la mère et du fœtus (pour une revue ²⁶²). De plus, ils participent activement à la croissance de ce dernier. L'axe hypophysaire maternel, responsable de la synthèse du hGH, est progressivement inhibé pendant la grossesse. En fait, le placenta produit un variant moléculaire, le hGH-V, qui remplace peu à peu le hGH et devient l'hormone de croissance prédominante chez la mère. La production du hGH-V est assurée par les syncytiotrophoblastes. Cette hormone est détectée dans le sang maternel vers la 21^{ème} semaine et sa production augmente jusqu'à la semaine 36 pour ensuite rester stable jusqu'au terme ²⁶³. Le hPL est principalement synthétisé dans les syncytiotrophoblastes après la 5^{ème} semaine de grossesse et augmente jusqu'au terme ²⁶⁴. Conjointement, le hPL et le hGH stimulent la production du facteur de croissance de l'insuline (*IGF ; insulin-like growth factor*) ²⁶³. L'IGF augmente la disponibilité du glucose et des acides aminés pour le fœtus répondant ainsi sa demande métabolique.

HORMONE ADRÉNO-CORTICOTROPHINE

Au niveau systémique, la corticolibérine ou CRH (*corticotrophine releasing hormone*) est une hormone produite par l'hypothalamus et agit sur l'hypophyse afin d'induire la synthèse de l'adrénocorticotrophine (ACTH). L'ACTH intervient au niveau du cortex surrénalien et provoque la relâche du cortisol dans la circulation sanguine. Au sein du placenta, le CRH est exprimé dans les cellules cytotrophoblastiques et selon une action paracrine sur le syncytiotrophoblaste, il induit la production de l'ACTH placentaire. L'ACTH ainsi formée pourrait contribuer à l'augmentation du cortisol plasmatique observé pendant la grossesse. De plus, il semble que le CRH possède une propriété vasodilatatrice utéroplacentaire ²⁶⁴.

HORMONES GONADOTROPHINE CHORIONIQUE

Le GnRH (*Gonadotrophin releasing hormone*) retrouvé dans les cytotrophoblastes stimule la synthèse de la gonadotrophine chorionique (CG) par le syncytiotrophoblaste ²⁶⁵. Le hCG est détecté dans le plasma maternel vers le 8^{ème} jour de grossesse pour atteindre un maximum à 16 semaines ²⁶⁴. Puis, sa concentration diminue et reste à de bas niveaux jusqu'à terme. Le hCG jouerait un rôle dans le maintien du corps jaune en début de la grossesse par une action luthéotrope. Il est aussi impliqué dans la stéroïdogénèse fœtale ainsi que dans la croissance du placenta. L'inhibine et l'activine produite par le placenta semble agir de façon paracrine et induisent respectivement une diminution et une augmentation de la production du hCG ²⁶⁴

Chez la rate, la présence du CG reste controversée. Certains n'ont pas détecté sa présence ²⁶⁶. Cependant, il a été suggéré que le placenta murin possédait une activité similaire à cette hormone. En fait, dans les années 1980, la présence d'une protéine ayant des propriétés structurelles ou conformationnelles semblables au CG a été suggérée ²⁶⁷. De plus, le groupe de Tepper a observé une activité comparable au CG dans les placentas de rates ²⁶⁸. Plus récemment, la littérature semble appuyer l'absence de cette hormone chez les rongeurs ²⁴⁰.

5 CONDITIONS HYPERTENSIVES DE LA GROSSESSE

Généralement, on considère la grossesse comme une condition anti-hypertensive puisque chez la femme gravide normotendue ou souffrant d'hypertension chronique, la pression artérielle diminue ²⁰³. Toutefois, il existe des cas où la grossesse induit une hypertension chez les femmes normotendues, ou aggrave l'hypertension chronique. Même avec des décennies de recherches intensives, les mécanismes inducteurs impliqués dans l'étiologie des pathologies hypertensives de la grossesse demeurent encore, à ce jour, non résolues.

5.1 CLASSIFICATION

Les pathologies hypertensives de la grossesse représentent une cause majeure de morbidité et mortalité foétale et maternelle. Entre 7 à 10% des femmes enceintes en souffrent ²⁶⁹. La classification des pathologies hypertensive de la grossesse a été déterminée dans les années 90 par le « Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy » ²⁷⁰. Cette classification regroupe cinq types d'hypertension comprenant l'hypertension gestationnelle, la pré-éclampsie, l'éclampsie, la pré-éclampsie superposée à l'hypertension chronique et l'hypertension chronique. L'hypertension gestationnelle est définie par une pression artérielle est supérieure ou égale à 140/90mmHg en absence de protéinurie. Le diagnostique de pré-éclampsie est déterminé lorsque la femme présente des critères minima soit une pression artérielle \geq à 140/90mmHg après la 20^{ième} semaine de grossesse ainsi qu'une protéinurie. La pré-éclampsie est diagnostiquée de façon plus efficace lorsque la femme présente, en plus des critères minimum, une augmentation de la créatinine plasmatique, une diminution du nombre de plaquettes, une augmentation de l'hémolyse microangiopathique et des maux de tête persistants. L'éclampsie correspond à la pré-éclampsie mais accompagnée de convulsions qui ne peuvent pas être conférées à autre chose que la pré-éclampsie. L'hypertension chronique est définie par une pression artérielle \geq à 140/90mmHg après la 20^{ième} semaine de grossesse qui persiste environ 12 semaines après l'accouchement. La pré-éclampsie superposée est ainsi appelée lorsqu'elle survient chez des femmes souffrant déjà d'hypertension chronique.

5.1.1 PRÉ-ÉCLAMPSIE : HYPOTHÈSES POSTULÉES

En plus des caractéristiques mentionnées ci-haut décrivant la pré-éclampsie, cette maladie se caractérise aussi par plusieurs changements physiologiques et moléculaires. On observe, entre autre, au niveau maternel, une diminution de l'activité rénine et des concentrations d'ANGII et d'aldostérone plasmatique ²⁷¹, une augmentation de la réponse aux vasoconstricteurs tels que l'ANGII ²⁷², une diminution du volume circulant et du débit sanguin cérébrale et utéro-placentaire ainsi qu'une diminution de la filtration glomérulaire comparativement à une grossesse normale. Au niveau foetal, une restriction de croissance intra-utérine est parfois observée ²⁷³. Les différents symptômes maternels

présents au cours de la pré-éclampsie suggèrent que les adaptations physiologiques et moléculaires à la grossesse normale ne surviennent pas chez les femmes souffrant de ce désordre. L'étiologie de la pré-éclampsie n'est pas encore connue et sur le plan physiopathologique, de nombreuses hypothèses ont été proposées. Par exemple, un défaut de la placentation et une ischémie placentaire, la toxicité des radicaux libres ou une mauvaise réponse immunologique. La section suivante portera sur les différentes hypothèses et théories proposées au fil des ans.

5.1.1.1 DÉFAUT DE PLACENTATION

L'hypothèse d'un défaut de la placentation est fondée, d'une part, par le fait que le seul traitement véritablement efficace pour la pré-éclampsie est l'accouchement, soit l'expulsion du placenta. Cette supposition est appuyée par une incidence élevée de pré-éclampsie chez des patientes présentant une môle hydatiforme complète, problème correspondant au développement d'un placenta sans la présence d'un fœtus ²⁷⁴. Selon cette hypothèse, un défaut de l'invasion trophoblastique serait la cause de la maladie. Au cours de la grossesse normale, les cytotrophoblastes extra-villeux envahissent l'endomètre maternel en un premier temps et atteignent les artères spiralées en un deuxième temps. Cet envahissement induit un remodelage de ces artères, ce qui les rend insensibles aux agents vasoconstricteurs ²⁴⁴. Lors d'une invasion absente ou incomplète, les vaisseaux restent sensibles aux hormones vasoconstrictrices conduisant à un débit sanguin insuffisant et en conséquence, une ischémie placentaire ²⁷⁵. Ce phénomène est retrouvé lors de la pré-éclampsie. En effet, l'invasion trophoblastique est peu profonde et la vascularisation maternelle est pauvre ²⁷⁶. Les mécanismes normaux qui assurent la vasodilatation ne sont pas présents, l'endothélium de ces vaisseaux étant lésé. En conséquence, la résistance vasculaire utéro-placentaire est plus élevée et est associée à une diminution de la perfusion utéro-placentaire menant à une ischémie placentaire ²⁷⁵. Cette ischémie, bien que localisée dans le placenta, aurait un impact sur l'organisme maternel et fœtal, dont une dysfonction endothéliale secondaire.

5.1.1.2 RÉPONSE INFLAMMATOIRE NON CONTRÔLÉE

Une hypothèse conjointe à la dysfonction endothéliale a été proposée. La grossesse normale est caractérisée par une réaction inflammatoire généralisée non dommageable pour la mère et le fœtus en développement. Au cours de la pré-éclampsie, cette réponse serait exagérée et pourrait participer aux multiples symptômes ²⁷⁷. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer cette réponse inflammatoire. Tout d'abord, des cytokines telle que le TNF- α , le facteur de croissance de l'endothélium (*VEGF; vascular endothelial growth factor*) et l'interleukine-6 sont synthétisées en plus grande quantité dans la circulation maternelle et dans le placenta ^{278,279}. De plus, une plus grande activation des différents leucocytes est observée ²⁷⁷. Une autre alternative suggère la présence de microfragments provenant des syncytiotrophoblastes dans la circulation maternelle ²⁸⁰. Ces fragments sont observés lors de la grossesse normale mais en quantité moindre que dans la pré-éclampsie. Ces microfragments, relâchés dès le début de la grossesse, seraient pro-inflammatoires et porteraient atteinte à l'endothélium des vaisseaux ²⁸¹.

5.1.1.3 HYPOTHÈSE DE NATURE GÉNÉTIQUE

Une composante génétique semble être impliquée dans le développement de la pré-éclampsie. L'étude familiale incluant 600 participantes sœurs, filles et petites filles de femmes ayant souffert de pré-éclampsie a démontré que le risque d'être atteint de cette maladie est augmenté, suggérant ainsi un caractère héréditaire ²⁸². Le groupe de Salonen a, quant à lui, démontré une augmentation de l'incidence de la maladie chez des jumelles monozygotiques. Dans un groupe de 916 patientes, 63 ont développés la pré-éclampsie et 32 d'entre elles étaient des jumelles ²⁸³. Plusieurs gènes ont été proposés pour expliquer le développement de la pré-éclampsie. Par exemple, la fréquence de l'expression d'un variant moléculaire de l'angiotensinogène est augmentée chez les femmes souffrant de ce désordre ²⁸⁴. Ce gène a aussi été caractérisé lors de l'hypertension essentielle ²⁸⁵. Plusieurs autres études ont démontré une association entre cette pathologie et le polymorphisme d'un certain nombre de gènes tels que le TNF- α ²⁸⁶, la méthylentétrahydrofolate réductase ²⁸⁷ et les synthases du NO ^{288,289}. Cependant, ces études ont été effectuées sur un nombre limité de patientes. La complexité de la pré-éclampsie ainsi que les différents

phénotypes présents nécessitent donc une approche plus large afin de valider ces informations.

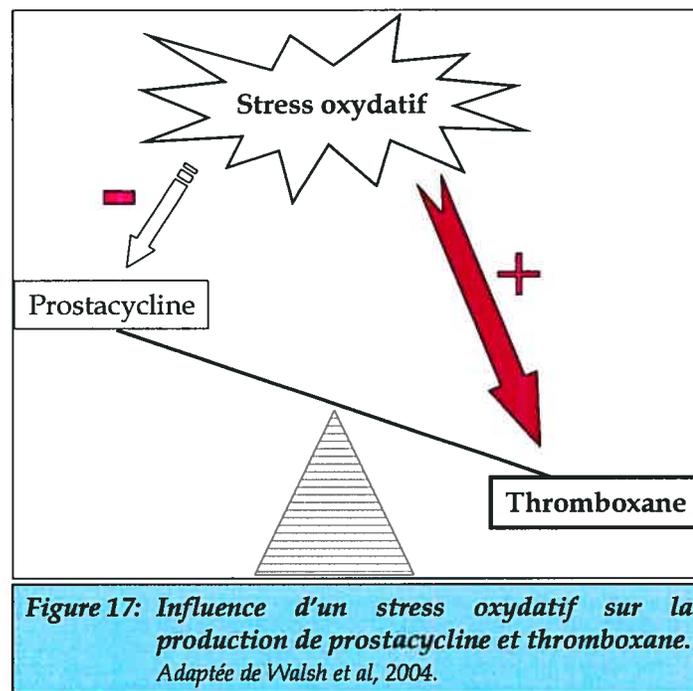
5.1.1.4 HYPOTHÈSE À CARACTÈRE IMMUNOLOGIQUE

Le risque de développer une pré-éclampsie est particulièrement important lors d'une première grossesse. Ce concept met en cause la participation des antigènes paternels. Plusieurs études épidémiologiques ont donc été entreprises. En utilisant près de 5000 patients nullipares et multipares, le groupe de Trupin démontre qu'une grossesse précédente avec le même père diminue le risque de développer la pré-éclampsie chez les multipares ²⁹⁰. Ceci serait expliqué par une reconnaissance maternelle des antigènes paternels. De plus, le groupe de Robillard montre qu'une plus longue période de cohabitation sexuelle avec le père et ce, avant la conception, protège contre le développement de la maladie ²⁹¹. Ces auteurs suggèrent que la pré-éclampsie serait, en fait, une pathologie de primiparternité plutôt que de primigravité. Dans le même sens, Uzan et ses collaborateurs ont démontré que l'incidence de la pré-éclampsie est plus élevée chez des femmes multipares ayant changé de conjoint ainsi que lors d'utilisation de contraceptions mécaniques empêchant le contact avec les antigènes paternels ²⁹².

5.1.1.5 DÉSÉQUILIBRE ENTRE LES FORCES OXYDANTES ET ANTI-OXYDANTES

Les ROS et RNOS, en particulier l'anion superoxyde, le NO et ses dérivés peuvent être responsables de l'activation des cellules endothéliales, du désordre hypertensif ainsi que l'atteinte des organes tels que les reins et le cœur survenant au cours de la pré-éclampsie ²⁹³. Bien que le stress oxydatif peut être considéré comme étant la cause ou la conséquence de l'hypertension de grossesse, il n'en demeure pas moins que l'étude de ce phénomène est très vaste et implique une multitude de cascades, mécanismes et molécules. Les études sont donc concentrées sur certains marqueurs lipidiques et protéiques présents au niveau de la cellule, du sang ou des organes. Au niveau plasmatique et placentaire, plusieurs marqueurs suggèrent un déséquilibre entre les forces anti-oxydantes et oxydantes. Par exemple, une augmentation de la production du 8-iso-PGF_{2α} est détectée dans des placentas à terme de femmes pré-éclamptiques ⁸¹ ainsi qu'une élévation du

malondyaldéhyde des fractions mitochondriales placentaires de femmes pré-éclamptiques comparativement à celles de femmes ayant une grossesse normale ²⁹⁴. Ces résultats suggèrent la présence d'une peroxydation lipidique placentaire. La présence des résidus nitrotyrosines dans le tissu placentaire est élevée au cours de la pré-éclampsie comparé à la grossesse normale suggérant aussi la présence d'un stress nitrosatif ²⁹⁵. De plus, le groupe de Hubel a démontré une augmentation de près de 50% de la concentration plasmatique du malondyaldéhyde chez les femmes pré-éclamptiques ²⁹⁶. Concernant les antioxydants, il a été démontré récemment qu'une diminution des concentrations de vitamine C et E, de superoxyde dismutase ainsi que de glutathion peroxydase est présente dans le plasma de femmes souffrant de ce désordre ^{297,298}. On a rapporté une augmentation des vitamines radicalaires plasmatiques telles que le radical ascorbyl au cours de la pré-éclampsie ²⁹⁹. La présence d'un environnement oxydant lors de cette maladie semble aussi jouer un rôle dans la production des eicosanoïdes. Au cours de la grossesse normale, le placenta produit des quantités équivalentes de TxA₂ et de PGI₂. Lors de la pré-éclampsie, le placenta produit environ 7 fois plus de tromboxane que de PGI₂. Ceci engendre un déséquilibre entre la production de la prostacycline et de la TxA₂ en faveur de la vasoconstriction, de l'agrégation plaquettaire ainsi que d'un état inflammatoire (Figure 17) (pour une revue ³⁰⁰). La cause de ce phénomène n'est pas connue. Cependant, ce déséquilibre pourrait être modulé par le stress oxydatif. En fait, il a été démontré que les lipides peroxydés entraînent une augmentation de la production *in vitro* de TxA₂ placentaire par stimulation des COXs ²⁵⁹. De plus, il a été démontré que le plasma de femmes pré-éclamptiques, contenant des lipides peroxydés, est capable d'inhiber l'activité de la prostacycline synthase dans des cellules endothéliales ³⁰¹. Ces mécanismes pourraient être, en partie, responsables de la dysfonction endothéliale, la réponse inflammatoire exagérée et la coagulation observée lors de la pré-éclampsie.



6 MODÈLE ANIMAL DE PRÉÉCLAMPSIE

Tout comme la plupart des maladies qui surviennent chez l'humain, la pré-éclampsie demeure difficile à étudier sur le plan organique pour en comprendre les mécanismes qui dictent son étiologie. Plusieurs modèles animaux de pré-éclampsie ont été élaborés au fil des ans. Toutefois, certains de ces modèles sont invasifs ou ne représentent que quelques caractéristiques de la maladie. Au cours de ma maîtrise en Sciences Biomédicales, un modèle animal de pré-éclampsie expérimentale a été créé au sein du laboratoire d'accueil²¹⁶. Ce modèle a été élaboré, discuté et décrit au niveau physiologique dans mon mémoire de maîtrise. En bref, un supplément sodique 0.9% donné à des rates gestantes pendant la dernière semaine de gestation induit une diminution du SRAA et empêche la baisse de pression qui survient au cours de la gestation normale. La pression reste similaire à celle des rates non-gestantes témoins. La quantité de protéines urinaires et les concentrations des électrolytes urinaires et plasmatiques ne diffèrent pas de celles des rates gestantes témoins. Par contre, si un supplément de 1.8% NaCl est donné, les rates gestantes développent une hausse de pression artérielle, une diminution de l'activité du SRAA qui rejoint les valeurs des rates non-gestantes témoins, une protéinurie, une diminution du volume circulant ainsi qu'une restriction de croissance fœtale. De plus, ces rates

démontrent une diminution du diamètre des artères utérines ³⁰² et une augmentation de la réactivité vasculaire ³⁰³. Les caractéristiques observées dans ce modèle représentent les signes cliniques retrouvés lors des cas de pré-éclampsie chez la femme. Les rates non-gestantes recevant le supplément sodique 0.9% ou 1.8% ne montrent aucun changement au niveau de la pression artérielle et au niveau des concentrations plasmatiques et urinaires de sodium et potassium suggérant que l'homéostasie générale est conservée chez ces rates. Ainsi, le modèle animal de pré-éclampsie décrit ci-haut est à l'origine de mes travaux de doctorat et de la présente thèse.

7 HYPOTHÈSE

La pré-éclampsie est une maladie multisystémique hypertensive dont l'étiologie n'est pas encore élucidée. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer son développement dont une étant liée à la présence d'un stress oxydatif/nitrosatif au niveau plasmatique et placentaire chez la femme ^{81,304-306}. Dans le laboratoire, nous avons développé un modèle animal de pré-éclampsie expérimentale en donnant un supplément sodique pendant la dernière semaine de gestation chez la rate. Au cours de la grossesse normale, l'organisme maternel subit plusieurs changements physiologiques et moléculaires afin de s'adapter au fœtus et lui fournir les nutriments nécessaires à sa croissance. Cependant, nous avons démontré que le nouvel équilibre qui se met en place pendant cette condition peut être fragile. En effet, un apport riche en sodium empêche la baisse normale de pression artérielle et induit une restriction de croissance intrautérine. Nous émettons l'hypothèse qu'un supplément sodique induit un stress oxydatif au sein des organes cibles responsables de la nutrition fœtale et de la régulation de la pression artérielle. Ainsi, le premier objectif de cette thèse était de déterminer si, dans notre modèle animal, la présence d'un déséquilibre entre les forces oxydantes et anti-oxydantes était retrouvée dans le placenta. Le second objectif de mes travaux était d'analyser des paramètres selon leur implication dans le stress oxydatif/nitrosatif, l'apoptose, l'inflammation, le transport du sodium et le métabolisme du glucose dans le rein et le cœur. Ces travaux nous apporteront une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse inappropriée de la grossesse suivant une perturbation maternelle. De plus, ceci nous donnera une image précise de l'atteinte cellulaire qui peut être présente à la fin de la gestation, au sein des organes ciblés.

Les chapitres suivants comportent les deux manuscrits qui ont été écrits suite à la réalisation de mes études de doctorat.

CHAPITRE 2

PLACENTAL OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF PREECLAMPSIA

Annie Beauséjour, Karine Bibeau, Jean-Claude Lavoie, Jean St-Louis et Michèle Brochu
Placenta. 2007 Jan;28(1):52-8. Epub 2006 Feb 8.

PLACENTAL OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF PREECLAMPSIA

Le développement de la pré-éclampsie est associé à une insulte maternelle pouvant être lié à un défaut de la fonction placentaire. En donnant un supplément sodique (0.9% ou 1.8% NaCl dans l'eau de breuvage) pendant la dernière semaine de gestation chez la rate, nous avons développé un modèle animal où plusieurs caractéristiques de la pré-éclampsie sont rencontrées telles qu'une augmentation de la pression artérielle, une diminution du volume circulant et de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone. Le but de la présente était de déterminer, dans ce modèle, si une perturbation maternelle mène à un stress oxydatif placentaire. Pour ce faire, des rates gestantes Sprague-Dawley recevant l'eau salée ont été comparées à des rates gestantes recevant l'eau du robinet. Des marqueurs de stress oxydatif, d'apoptose, la production d'hormones vasoactives (thromboxane, TxB₂; et prostacyclin, PGF_{1α}) ainsi que l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire (tumeur necrosis factor-alpha; TNF-α) ont été mesurés dans les placentas. Chez les rates recevant le supplément 1.8% NaCl, les niveaux de 8-iso-PGF_{2α}, le ratio TxB₂/6-keto-PGF_{1α}, l'expression de l'ARN total du TNF-α, ainsi que l'index apoptotique (ratio Bax/Bcl-2) et l'expression de la synthase du NO endothéliale (eNOS) sont augmentées alors que le contenu total du glutathion est diminué. Chez les rates recevant le supplément sodique de 1.8%, ces résultats démontrent qu'une insulte au niveau maternel pendant la gestation induit un déséquilibre au sein de l'environnement oxydatif du placenta favorisant l'oxydation. De plus, cet état d'oxydation est accompagné d'une augmentation de la synthèse de substances vasoconstrictrices, du TNF-α ainsi du taux d'apoptose placentaire.

PLACENTAL OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF PREECLAMPSIA

Annie Beauséjour, Karine Bibeau, Jean-Claude Lavoie, Jean St-Louis
and Michèle Brochu*

Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada, H3T 1C5
Department of Obstetrics and Gynecology University of Montreal, Montreal, Quebec,
Canada.

Running title: Placental oxidative stress in rat.

Keywords: Placenta, Oxidative stress, Rat model of preeclampsia

*Address for reprints:

Michèle Brochu

Centre de recherche

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, QC, Canada H3T 1C5

E-mail: [REDACTED]

Tel (514) 345-4931 ext. 5035

Fax (514) 345-4801

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (MOP-74600).

CONDENSATION

Maternal insult by sodium supplement given to pregnant rats for the last week of gestation induced placental oxidative stress which is similar to preeclampsia in pregnant women.

ABSTRACT

The onset of preeclampsia is associated with increased maternal insult that could affect placental function. By increasing sodium intake (0.9% or 1.8% NaCl in drinking water) during the last week of gestation in the rat, we developed an animal model that shows many characteristics of preeclampsia such as increased blood pressure, decreased circulatory volume and diminished activity of the renin-angiotensin-aldosterone system. The aim of the present study was to determine in this model whether maternal perturbations in pregnancy lead to placental oxidative stress. Sprague-Dawley pregnant rats receiving salted-water were compared to not-supplemented pregnant rat. Markers of oxidative stress, ensuing cell death, and changes in the production of vasoactive substances (prostanoids: thromboxane, TxB₂; and prostacyclin, PGF_{1α}) and the pro-inflammatory cytokine tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) were measured in the placenta. In tissue from pregnant rats on 1.8% NaCl supplement, 8-iso-PGF_{2α} levels, TxB₂/6-keto-PGF_{1α} ratios, total TNF-α RNA expression, as well as the apoptotic index (Bax/Bcl-2 ratio) and endothelial nitric oxide synthase protein expression increase while total glutathione content decreases. These findings demonstrate that maternal insult during gestation induced an imbalance in the oxidative environment in the placenta favouring oxidation. This was accompanied by an increased synthesis of vasoconstrictive substances and TNF-α by the placenta as well as the increased rate of placental cell apoptosis.

INTRODUCTION

During the second trimester of human pregnancy and the last week of gestation in the rat, arterial blood pressure decreases despite the marked expansion of plasma volume and the persistent activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) ¹⁻⁴. As the cardiovascular changes noted during the last week of gestation in the rat correlate well with those noted during the second trimester in human pregnancy ^{4,5}, the pregnant rat appears to represent a reliable animal model to study hemodynamic alterations of midpregnancy in humans. Along this line of reasoning, midpregnancy manifestations of hypertensive disorders may also be studied in comparable rat models in which disruptions of cardiovascular homeostasis are produced experimentally during the last gestational week. In support of this, we recently reported that pregnant rats given sodium supplements (0.9 or 1.8% NaCl) during the last week of gestation, exhibit many of the clinical features of human preeclampsia ⁵ such as decreased RAAS activity, obliteration of end-pregnancy decrease in blood pressure, and proteinuria. We also observed a significant decrease in circulating volume. Moreover, in pregnant rats receiving 1.8% NaCl, the diameter of uterine arcuate artery segment ⁶ and placental weights⁵ are reduced suggesting a decrease in placental perfusion. Finally, pregnant rats on 0.9 and 1.8% NaCl supplements, like pregnant women with preeclampsia ⁷, do not exhibit vascular resistance to vasoconstrictors ⁸.

Preeclampsia is a frequent and serious complication of human pregnancy, affecting close to 5% of all pregnancies worldwide. This disorder is associated with high rates of maternal and fetal mortality and morbidity and is characterized by *de novo* onset of hypertension after the 20th week of gestation accompanied by proteinuria ⁹. During preeclampsia, maternal circulating volume and RAAS activity are decreased compared to normal pregnancy, organ and tissue blood flow are compromised, and endothelial cell dysfunction occurs ¹⁰. Although the aetiology of preeclampsia is still unknown, a placental origin is postulated and amply supported by the rapid resolution of symptoms following parturition. In normal pregnancy, the process of implantation and trophoblast invasion as well as spiral arteries remodelling take place until the 20-

22nd week of pregnancy ¹¹ This corresponds to the beginning of the last week of gestation in rats ¹².

Increasing evidence suggests that placental oxidative stress, as a result of increased superoxide generation, plays an important role in the pathogenesis of preeclampsia ¹³. In this regard, superoxides and free radicals generated during maternal oxidative stress could attack lipids, proteins and nucleic acids, resulting in placental cell, tissue and organ damage. In addition, maternal oxidative stress could initiate maternal vascular endothelial dysfunction and induce leukocyte activation ^{13,14}. Alterations in maternal uterine vasculature and placental blood flow could compromise fetal growth. Leukocyte activation is linked to both haematological alterations that favour ischemia and thrombosis, as well as increased production of proteolytic enzymes, free radicals and inflammatory cytokines ¹⁵.

Isoprostanes are considered markers of oxidative stress and lipid peroxidation ¹⁶ while glutathione (GSH) is an important endogenous antioxidant that serves to neutralize reactive oxygen species and lipid peroxides ¹⁷. Thus, the oxidative status of a system or tissue is assessed in part by comparing isoprostane and GSH levels. Normally, the pro-aggregatory and vasoconstrictive activities of thromboxane A₂ (TxA₂) are opposed by the vasodilatory and platelet dissociating effects of prostacyclin to maintain vascular haemostasis ¹⁸. Oxidative stress has been shown to disrupt this balance in favour of vasoconstriction and platelet aggregation ¹⁹. A positive feedback loop has been shown to exist between inflammation and oxidative stress. In this regard, cytokine synthesis and release from maternal vascular endothelium has been shown to be upregulated by free radicals ²⁰. Conversely, free radical synthesis is increased by cytokines like tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), a multifunctional cytokine produced by macrophages, as well as placental decidual and trophoblast cells ²¹. It was suggested that TNF- α is involved in limiting trophoblast invasion ¹¹. This hypothesis on the role of TNF- α is supported by the increased plasma concentrations of TNF- α in women with preeclampsia²². In fact, in these women, a reduced trophoblastic invasion

have been observed ²³. More recently, TNF- α has been shown to promote endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation and induce endothelial cell apoptosis ²⁴.

In view of the above, we propose that the onset of experimental preeclampsia in our pregnant rats maintained on NaCl-supplemented diets is noted concomitant with increased placental oxidative stress and dysfunction. The aim of this study was to determine whether maternal insult in pregnancy results in placental oxidative stress as well. Therefore, changes consistent with increased oxidative stress in the placenta as well as placental cell dysfunction and death will be reflected by changes in placental 8-isoprostane F_{2 α} (8-iso-PGF_{2 α}) levels, total GSH content, prostanoid content (TxA₂ and prostacyclin), as well as TNF- α mRNA expression and eNOS protein expression and apoptotic index.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed using a total of 18 pregnant female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC) bred and housed as previously described⁵. Animals were randomly assigned to 3 equal groups. They were fed a normal diet containing 0.23% NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad; Montreal, Québec, Canada). The pregnant not-supplemented group (control group) received tap water throughout the treatment period while the 2 experimental pregnant groups received 0.9 or 1.8% NaCl solution *ad libitum* for the last week of gestation corresponding to day 15 -22 (term = day 23). On day 22 of gestation, animals were sacrificed by decapitation (0900-0930 AM) and placentas were removed and snap frozen in liquid nitrogen. This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

Total GSH Determination

Placental samples (100 mg) were homogenized in a 100mM Tris buffer (pH 7.6) containing 1mM EDTA, 10mM L-serine and 10mM borate. After centrifugation at 9500g x 1 min, supernatant proteins were precipitated with 10% sulfosalicylic acid, pelleted by centrifugation at 9500g x 1 min and then discarded. Glutathione was assayed in these final supernatants by an enzymatic colorimetric method²⁵. Results are expressed as GSH nmol/mg protein.

Prostanoids and 8-iso-PGF_{2α} measurements

Placental samples (100 mg) were homogenized in 100mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.5mM NaN₃, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA, and 10μM indomethacin. Prostanoids and 8-Iso-PGF_{2α} were eluted from octadecylsilyl silica columns with methyl formate and evaporated under vacuum to dryness. Thromboxane B₂ (TxB₂; stable metabolite of TxA₂) and 6-ketoprostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}; stable metabolite of prostacyclin) levels were measured by radioimmunoassay (Advanced Magnetics, Boston, MA). Cross-reactivity of the antibodies with other prostanoids is <2%. An

enzyme immunoassay was used to measure 8-Iso-PGF_{2α} (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The specificity of the assay is 100% for 8-isoprostanes and 85 ± 3% for 8-iso-PGF_{2α}; cross-reactivity of the antibody with TxB₂, PGE₂, and PGF_{2α} is ≤ 0.1%. Results are expressed as pg/mg protein.

TNF-α gene expression

Total cellular RNA from frozen placentas was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described previously⁵ before proceeding to Reverse Transcriptase-PCR analysis. PCR primers specific for TNF-α and GAPDH (internal standard) were designed with PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) using sequence data from the NCBI database (Table 1). Single-stranded cDNA was generated by reverse transcription (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen). PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen) was performed according to the procedure detailed by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at either 52°C for TNF-α or 51°C for GAPDH. The extension step was performed for 1 min at 72°C. PCR results were taken during the exponential phase. The number of cycles needed for amplification was determined for each gene (32 for TNF-α; 20 for GAPDH). Water was used as negative control. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels containing ethidium bromide. Amplification products (a 112-bp fragment for TNF-α and a 369-bp fragment for GAPDH) were quantified using Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Results are expressed as densitometric units relative to GAPDH.

eNOS expression and apoptosis

These parameters were measured by western blot. One hundred mg of frozen powder from each placenta were homogenized in either 20 mmol/L HEPES buffer (pH 7.5) containing 5μM pepstatin A, 5μM leupeptin, 1μM aprotinin (for eNOS) or lysis buffer containing 10mM Tris-HCl, 4mMβ-glycerophosphate, 4mM NaF, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 0.2mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 0.5mM PMSF, 5μM leupeptin, 5mM dithiotreitol (DTT), 1μM microcystine, 5μM benzamidine (for Bax or Bcl-2) and

centrifuged at either 850g x 15 min (for eNOS) or 16,000g x 15 min (for Bax or Bcl-2). Supernatants collected were then resuspended in Laemmli buffer. For comparative purposes, equal amounts of placental protein (60 µg /lane for eNOS or 65µg /lane for Bax or Bcl-2) were separated by SDS polyacrylamide (7.5% for eNOS or 5-15% for Bax or Bcl-2) gel electrophoresis and then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Bioscience inc, Baie d'Urfé, QC). Membranes were blocked for 1 hr at room temperature in 5% skim milk in Tris-buffered saline /0.1% Tween 20 (TBST) and then incubated with either mouse anti-eNOS (BD Transduction Laboratories, Mississauga, ON), mouse anti-Bax (BD Transduction Laboratories) or mouse anti-Bcl-2 antibodies (Santacruz, Santa Cruz, CA) (all diluted 1:1,000 in TBST) overnight at 4°C, washed, and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (1:5,000 in TBST; Amersham) for 45 min at room temperature. Equal protein loading was determined on duplicate gels using mouse anti-β-actin primary antibodies (Abcam, Cambridge, MA). Immunoreactive bands were visualized with the enhanced ECL chemoluminescence detection system (Amersham, Piscataway, NJ). Bands were quantified using Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Results are expressed as densitometric units relative to GAPDH.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA to assess the effect of 0.9 and 1.8% NaCl supplement compared with their pregnant control groups. Results are expressed as means ± SE with $P < 0.05$ considered to be significant. Six pregnant rats were used per experimental condition and 3-4 placentas examined per dam.

RESULTS

Total GSH and 8-iso-PGF_{2α}

A significant decrease in placental GSH is observed in pregnant rats maintained on 1.8% NaCl supplement (Fig.1A). Although placental 8-iso-PGF_{2α} levels increase in animals maintained on NaCl-supplemented water, they only reach statistical significance in the rats receiving 1.8% NaCl (Fig.1B).

Prostanoids

When compared to control animals, placental TxB₂ increases significantly in rats receiving 1.8% NaCl (Fig.2A). In contrast, levels of 6-keto-PGF_{1α} decrease in placenta from rats receiving both 0.9 and 1.8% NaCl supplements. This decrease is only significantly different from controls in placental samples from rats on 1.8% NaCl supplement (Fig 2B). As a result, the TxB₂/6-keto-PGF_{1α} ratio also increases significantly in placenta from the pregnant rats on 1.8% NaCl supplement when compared to control pregnant animals (Fig. 2C).

TNF-α gene expression

Expression of TNF-α mRNA has been found to increase significantly in placenta from pregnant rats on the 1.8% NaCl supplement when compared to non-supplemented controls. In contrast, no change in TNF-α mRNA expression is noted in placenta from pregnant animals on the lower (0.9%) NaCl supplement (Fig.3).

eNOS protein expression

As shown in figure 4, eNOS immunoreactive band intensity is greater in placental samples from pregnant rats receiving 1.8% NaCl supplement when compared to those of controls. Furthermore, expression of eNOS protein (when converted to arbitrary units by densitometric analyses) increases significantly in placenta from pregnant animals on 1.8% NaCl supplement when compared to controls.

Apoptosis

The ratio of apoptosis-promoting Bax to apoptosis-inhibiting Bcl-2 is often considered a useful index of cell death or survival²⁶⁻²⁸. In a representative western blot (Fig. 5A), the intensities of the Bax immunoreactive bands are evidently higher in placental samples from pregnant rats receiving 0.9 and 1.8% NaCl when compared to those from control animals. In contrast, Bcl-2 immunoreactivity is similar in placenta from all groups of rats (Fig. 5B). From densitometric analyses, expression of both Bax (expressed in arbitrary units) increases significantly in both groups of rats on NaCl supplements when compared to control (Fig. 5C). However, the Bax/Bcl-2 ratio is only found to be significantly higher in placental samples from rats on the 1.8% NaCl supplement (Fig. 5C).

DISCUSSION

Although there is no indication in the literature that the incidence of preeclampsia increases with increased salt consumption, or, that alternatively, low salt intake prevents the development of gestational hypertension²⁹, epidemiological studies do demonstrate a small yet significant correlation between salt intake and hypertension in humans³⁰. It is for this reason that we decided to explore the usefulness of manipulating dietary sodium intake during pregnancy in the rat to develop an animal model for studying the maternal manifestation of preeclampsia. In this regard, we previously found and reported that high NaCl supplements (0.9 or 1.8% in drinking water) given to pregnant rats during the last week of gestation prevent the pregnancy-induced decrease in blood pressure⁵. Furthermore, the higher NaCl supplement (1.8%) induced physiological changes in these pregnant rats reminiscent of those noted in preeclampsia in humans⁵. The usefulness of this animal model for studying the pathophysiology and aetiology of preeclampsia depends however, upon its further validation, the aim of the current investigation.

This study demonstrates that a “maternal insult” herein increased sodium intake, can result in placental oxidative stress by the end of gestation. This supports the increasing evidence that placental oxidative stress plays an important role in the onset of preeclampsia. In this regard, the placenta has been shown to be a major source of lipid peroxidation in preeclampsia¹⁴. Furthermore, levels of isoprostanes, useful markers of oxidative stress and lipid peroxidation, increase in maternal plasma and placenta during preeclampsia in a manner directly proportional to the severity of this disorder^{16,31}. In most biological systems, antioxidant defence systems operate to control or neutralize levels of free radicals³². However, when free radicals are produced in excess, they may deplete endogenous antioxidant stores³³. In preeclampsia, decreased levels of GSH in erythrocytes, plasma and placentas^{34,35} suggest that the free radical scavenging capacity of several key systems and tissues, including the placenta, are compromised. In agreement with these findings we presently report a significant decrease in GSH content in placenta from our pregnant rats maintained on the 1.8%

NaCl supplement. Furthermore, the depletion of endogenous antioxidants like GSH in the placenta from our rats on the 1.8% NaCl supplement appears to be due to increased lipid peroxidation. This is supported by our finding that placental levels of 8-iso-PGF_{2α} increase in these animals as well.

During normal term pregnancy, prostanoid production increases in utero-placental regions^{36,37}. The vasoconstrictive and pro-aggregatory effects of TxA₂ countered by the vasodilatory and platelet dissociating activities of prostacyclin serve to maintain normal maternal and uteroplacental circulation¹⁸. In preeclampsia, the TxA₂:prostacyclin ratio has been shown to be altered in favour of vasoconstriction and platelet aggregation³⁸. Increased oxidative stress during preeclampsia has been suggested to drive this phenomenon. In support of this, lipid peroxides have been documented to inhibit prostacyclin synthase³⁹ and induce or not alter the activity of TxA₂ synthase³⁸. In placenta from our pregnant rats on the 1.8% NaCl supplement, levels of TxB₂ (stable metabolite of TxA₂) increase, while those of 6-keto-PGF_{1α} (stable metabolite of prostacyclin), decrease. These changes in placental prostanoids in our rat model, like those noted in human preeclampsia, favour vasoconstriction and take place in a manner consistent with increased lipid peroxidation. Furthermore, this change in placental prostanoid synthesis in our animal model could impact uteroplacental blood flow and limit placental exchange and nutrient supply. Consistent with this, we have previously shown a decrease of 13% in placental and fetal weight without changes in number of pups in the rats on 1.8% NaCl supplement⁵.

Preeclampsia is also characterized by increased in the maternal inflammatory response, endothelial dysfunction and poor placental function⁴⁰; the latter being the decreased ability of the placenta to supply nutrients to the fetus and remove metabolic products. Expression of the inflammatory cytokine, TNF-α, has been shown to be increased in placenta from women with preeclampsia in a manner that correlates well with increased oxidative stress⁴¹. In agreement with the above, and in support of increased oxidative stress, we find TNF-α mRNA levels in placenta from our pregnant

rats on the 1.8% NaCl-supplemented diet to be significantly greater than those from pregnant controls. The increase in placental TNF- α may, as has been shown for endothelium²⁴, contribute to the increased rate of apoptosis in placenta from these rats. Normally, in uncomplicated human pregnancy, apoptotic cell death increases in the placenta from the first to third trimester⁴². Diminished or poor placental function in human preeclampsia and IUGR are associated with higher than normal rates of placental cell apoptosis^{42,43}. In placenta from pregnant rats on 1.8% NaCl supplement, Bax: Bcl-2 ratios, which reflect the rate of apoptosis, significantly increase as well.

In this present study, we also find eNOS protein expression to increase in placentas from rats on the 1.8% NaCl supplement. A similar increase has also been shown in placenta from preeclamptic women⁴⁴. This suggests that increased eNOS expression in the placenta of our animals or of preeclamptic women may represent a compensatory response to the increase in blood pressure. However, oxidative destruction of NO \cdot by superoxide leads to peroxynitrite formation. This pro-oxidant can generate nitrotyrosine which can induce vascular damage in placenta endothelium villous and contribute to the increased placenta vascular resistance seen in preeclampsia⁴⁵. The increase of eNOS may, as has been shown for endothelial tissue²⁴, depend upon the increased expression of TNF- α and could contribute to the pathophysiology of preeclampsia.

In summary, high (1.8%) NaCl supplement given to rats for the last week of gestation promote changes in the placenta of these animals consistent with increased oxidative stress and dysfunction. These changes closely simulate those noted in human placentas from preeclamptic pregnancies thus providing further validation of our animal model for experimental preeclampsia. The temporal relation between increased oxidative stress and alterations in placental prostanoids, cytokine and eNOS expression as well as changes in maternal circulation and blood pressure will be studied in this animal model. They could provide useful information on how to prevent placental dysfunction in hypertensive disorders of pregnancy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Rhoda Kenigsberg for her expert advice. This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research. Personal support was provided by the Canadian Institute of Health Research to A. Beauséjour (Studentship) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec to M. Brochu (Chercheur-Boursier, Senior). Cindy Gauthier, Thérèse Rouleau and Henrika Fernandez are acknowledged for their technical assistance.

TABLE 1. Sequences of oligonucleotide primers

Gene (GeneBank #)	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
TNF-α (X66539)	
sense	TCTGTGCCTCAGCCTCTTCT
antisense	TCCTCTTCAAGGGTTTACCC
GAPDH (XM234175)	
sense	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA
antisense	GGATGCAGGGATGATGTTCT

FIGURE 1.

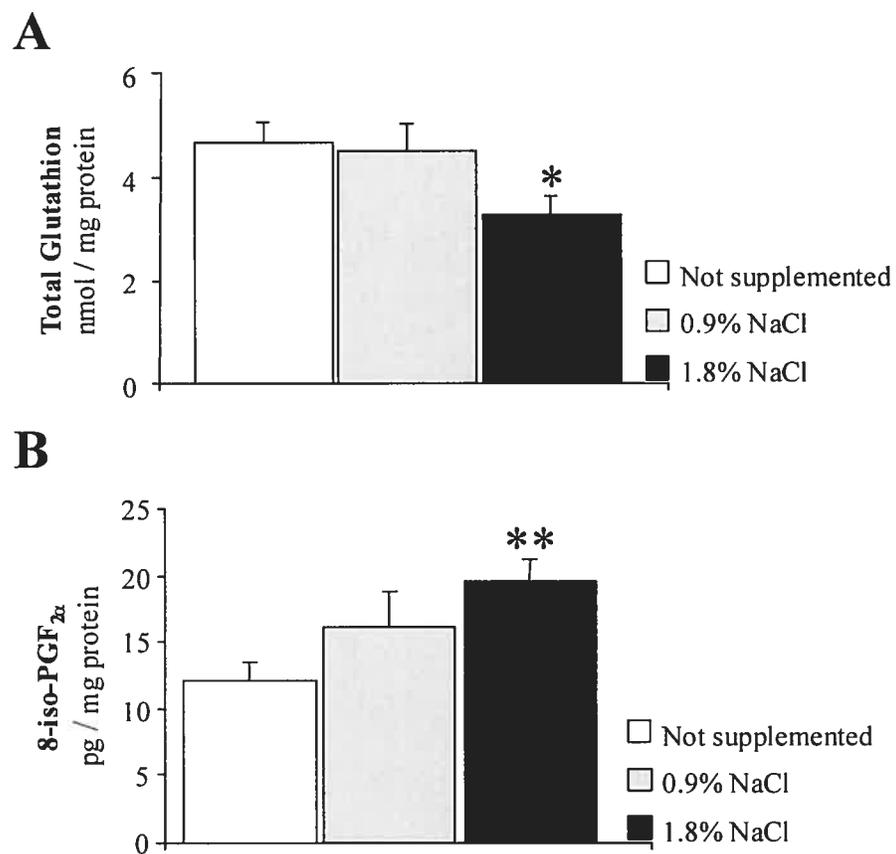


FIGURE 2.

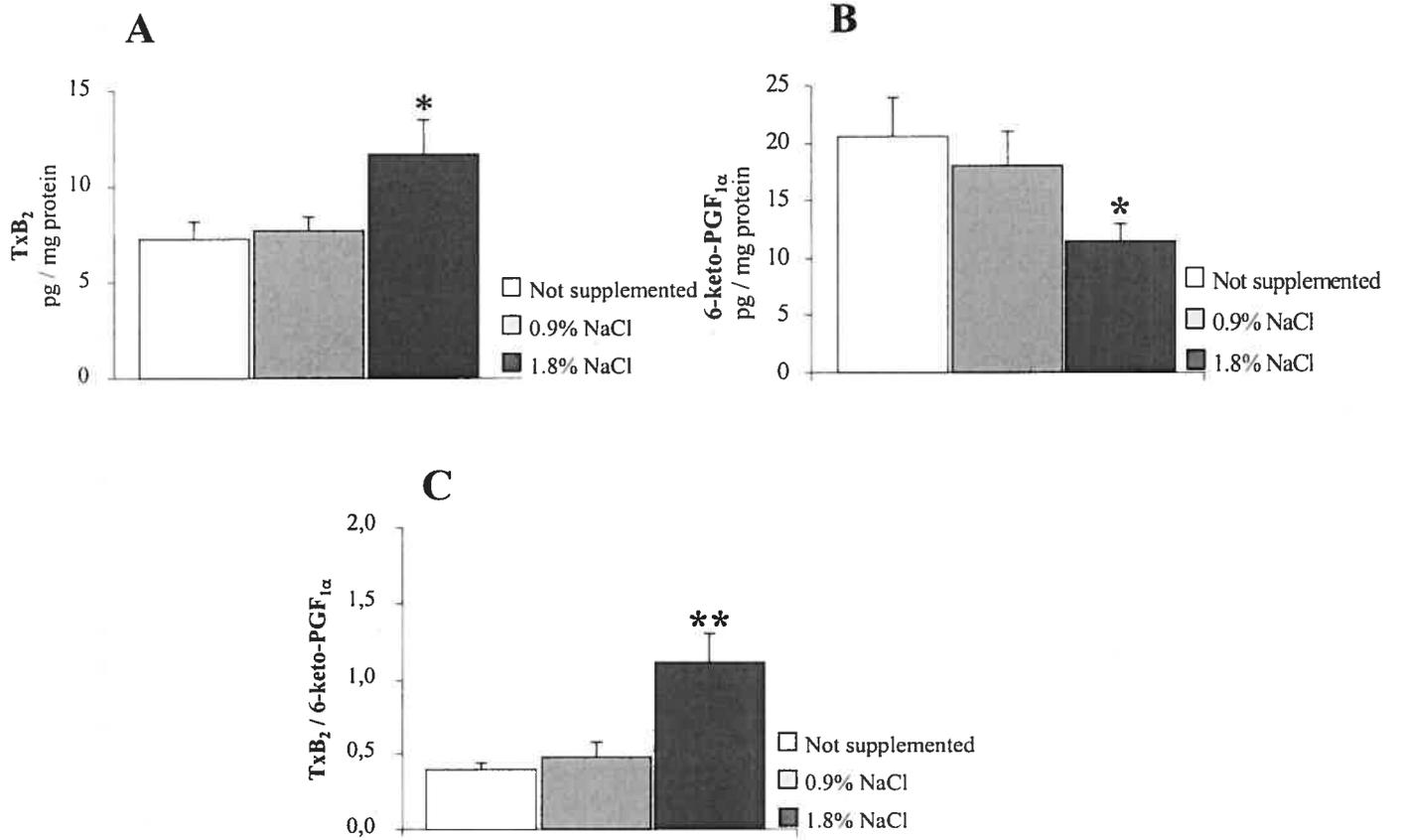


FIGURE 3.

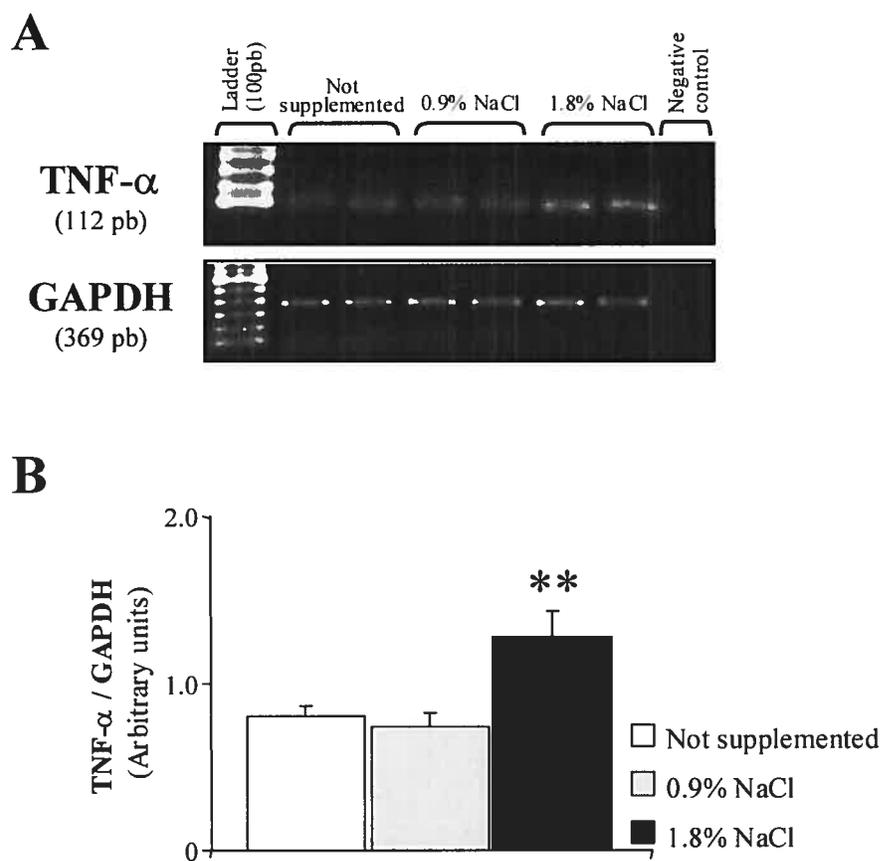


FIGURE 4.

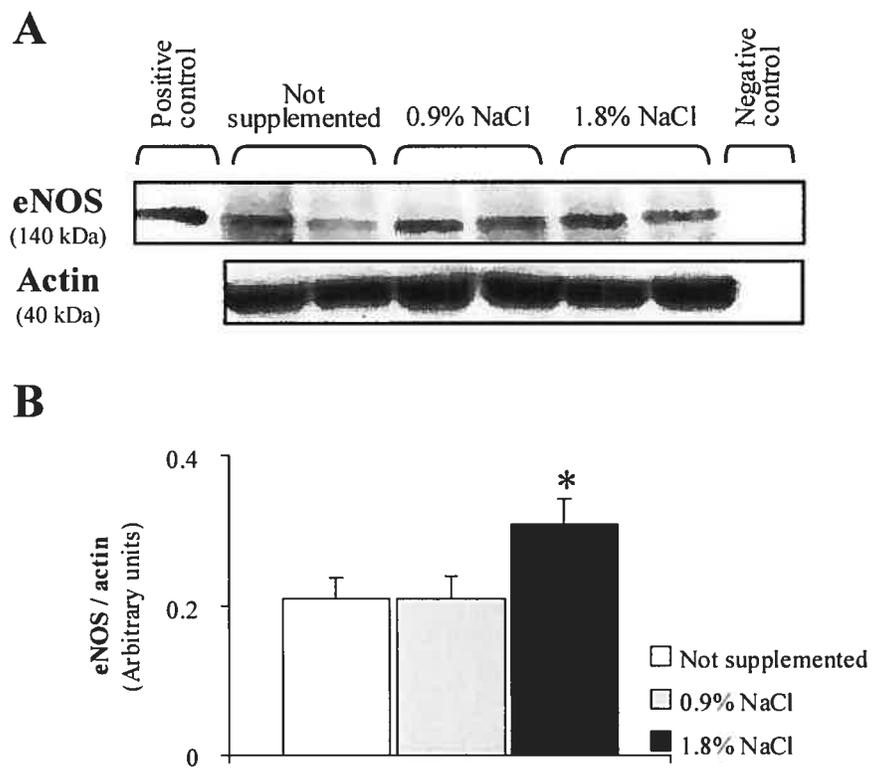
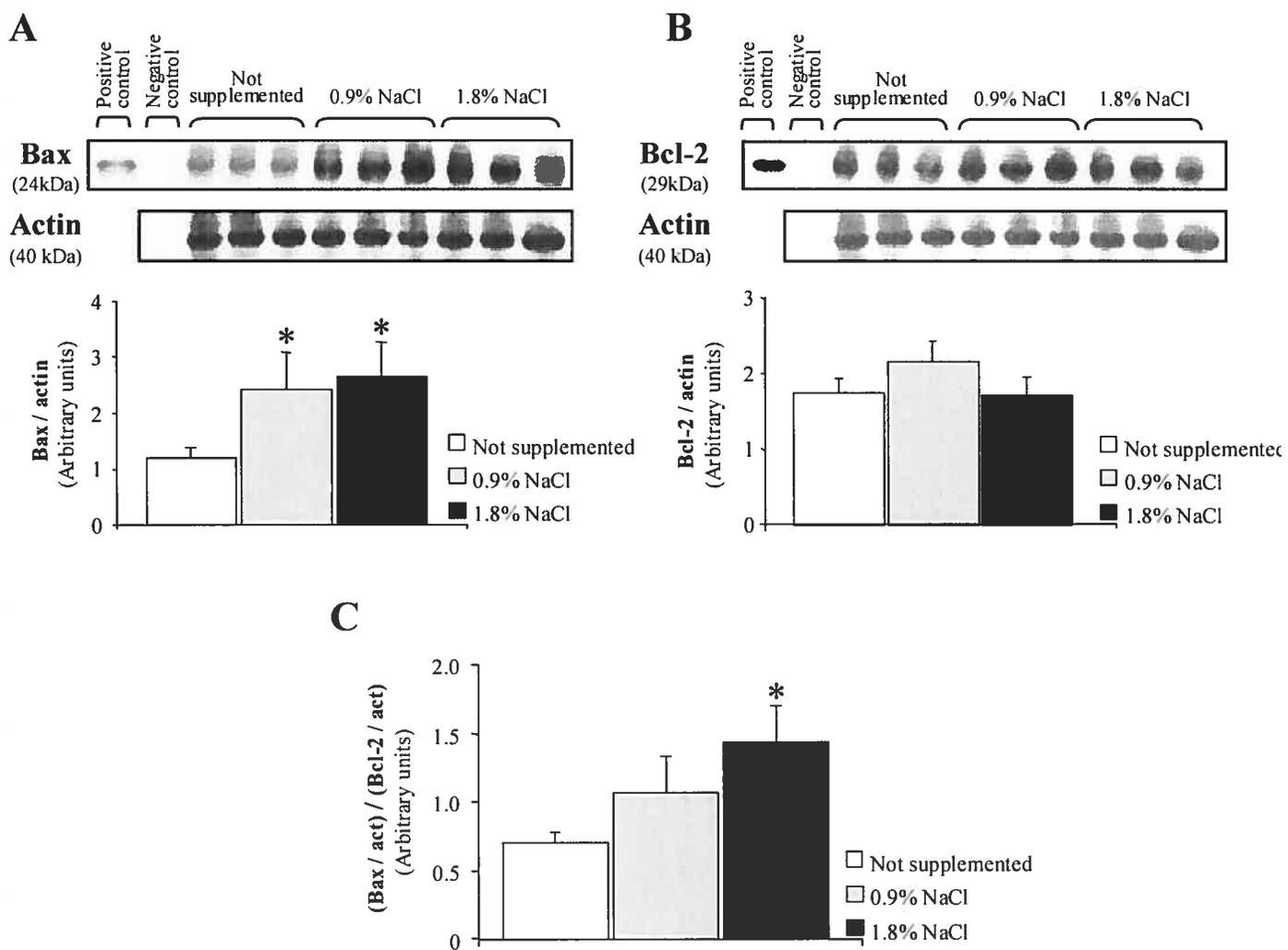


FIGURE 5.



LEGENDS TO FIGURES**Figure 1**

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplements on total placental GSH content (A) and 8-iso-PGF₂ levels (B). Results are expressed as means \pm SE, from 6 animals per group (3-4 placentas/rat). Values significantly different from not-supplemented control animals indicated by * P < 0.05, ** P < 0.01.

Figure 2

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl on placental levels of TxB₂ (A) and 6-keto-PGF_{1 α} (B). Corresponding TxB₂: 6-keto-PGF_{1 α} ratios are depicted in (C). Results are expressed as means \pm SE from 6 animals per experimental group (3-4 placentas/rat). Values significantly different from not-supplemented control animals are indicated by * P < 0.05, ** P < 0.01.

Figure 3

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplements on placental TNF- α gene expression. Representative gels for PCR amplification products for TNF- α and GAPDH are shown in A. Densitometric analysis of data expressed in arbitrary units relative to GAPDH ratio is shown in B. Results are expressed as means \pm SE from 6 animals per experimental group (3-4 placentas/rat). Values significantly different from not-supplemented control animals are indicated by ** P < 0.01.

Figure 4

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplements on placental eNOS protein expression. Representative immunoblot (A) and corresponding densitometric analyses (B). Rat thymus lysate (Santacruz, Santa Cruz, CA) serves as positive control and buffer as negative control. Data in (B) represent means \pm SE from 6 animals per experimental

group (3-4 placentas/rat). Values significantly different from not-supplemented control animals are indicated by $*P < 0.05$.

Figure 5

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplements on placental levels of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2. Representative immunoblots and data from densitometric analyses expressed in arbitrary units relative to actin ratio for Bax (A) and Bcl-2 (B). Bax: Bcl-2 ratios (using arbitrary units from densitometric analyses) (C). BJAB whole cell lysate (Santacruz, Santa Cruz, CA) and Jerkat whole cell lysate (Santacruz, Santa Cruz, CA) serve as positive controls for Bax and Bcl-2 respectively. Buffer was used as negative control for both. Data for all densitometric analyses depicted represent means \pm SE from 6 animals per experimental group (3-4 placentas/rat). Values significantly different from not-supplemented control animals are indicated by $*P < 0.05$.

REFERENCES

1. Duvekot, J. J. & Peeters, L. L. Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* **49**, 830-839 (1994).
2. Garland, H. O., Atherton, J. C., Baylis, C., Morgan, M. R. & Milne, C. M. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J. Endocrinol.* **113**, 435-444 (1987).
3. Roy-Clavel, E., Picard, S., St Louis, J. & Brochu, M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 608-613 (1999).
4. Moutquin, J. M. *et al.* A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **151**, 191-196 (1985).
5. Beausejour, A., Auger, K., St Louis, J. & Brochu, M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **285**, H375-H383 (2003).
6. St Louis, J., Sicotte, B., Beausejour, A. & Brochu, M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction in press*, (2005).
7. Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J. & MacDonald, P. C. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J. Clin. Invest* **52**, 2682-2689 (1973).
8. Auger, K., Beausejour, A., Brochu, M. & St Louis, J. Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **287**, H1848-H1856 (2004).
9. Brown, M. A., Lindheimer, M. D., de Swiet, M., Van Assche, A. & Moutquin, J. M. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens. Pregnancy.* **20**, IX-XIV (2001).
10. Davey, D. A. & MacGillivray, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 892-898 (1988).
11. Pijnenborg, R. Trophoblast invasion. *Reproductive Medicine Review* **3**, 53-73 (1994).

12. Caluwaerts, S., Vercruyse, L., Luyten, C. & Pijnenborg, R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* **26**, 574-584 (2005).
13. Walsh, S. W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16**, 93-104 (1998).
14. Hubel, C. A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**, 222-235 (1999).
15. Sargent, I. L., Germain, S. J., Sacks, G. P., Kumar, S. & Redman, C. W. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **59**, 153-160 (2003).
16. Walsh, S. W., Vaughan, J. E., Wang, Y. & Roberts, L. J. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J.* **14**, 1289-1296 (2000).
17. Meister A *The liver: Biology and Pathobiology*. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schacter D & Shafritz DA (eds.), pp. 401-417 New York: Raven,1988).
18. Moncada, S. & Vane, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* **30**, 293-331 (1978).
19. Walsh, S. W. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 223-232 (2004).
20. Dzau, V. J. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* **37**, 1047-1052 (2001).
21. Liu, Z. G. & Han, J. Cellular responses to tumor necrosis factor. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**, 79-90 (2001).
22. Conrad, K. P. & Benyo, D. F. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**, 240-249 (1997).
23. Roberts, J. M. & Lain, K. Y. Recent Insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta* **23**, 359-372 (2002).
24. Bulotta, S., Barsacchi, R., Rotiroti, D., Borgese, N. & Clementi, E. Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha. A novel feedback mechanism regulating cell death. *J. Biol. Chem.* **276**, 6529-6536 (2001).
25. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212 (1980).
26. Hetts, S. W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279**, 300-307 (1998).

27. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
28. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619 (1993).
29. Duley, L. & Henderson-Smart, D. Reduced salt intake compared to normal dietary salt, or high intake, in pregnancy. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD001687 (2000).
30. MacGregor, G. A. Sodium is more important than calcium in essential hypertension. *Hypertension* **7**, 628-640 (1985).
31. Wang, Y. P., Walsh, S. W., Guo, J. D. & Zhang, J. Y. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165**, 1695-1700 (1991).
32. Little, R. E. & Gladen, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* **13**, 347-352 (1999).
33. Kharb, S. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **93**, 37-39 (2000).
34. Madazli, R., Benian, A., Aydin, S., Uzun, H. & Tolun, N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.* **22**, 477-480 (2002).
35. Wisdom, S. J., Wilson, R., McKillop, J. H. & Walker, J. J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165**, 1701-1704 (1991).
36. Kelly, R. W. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr. Rev.* **15**, 684-706 (1994).
37. Platz-Christensen, J. J., Pernevi, P., Bokstrom, H. & Wiqvist, N. Prostaglandin E and F2 alpha concentration in the cervical mucus and mechanism of cervical ripening. *Prostaglandins* **53**, 253-261 (1997).
38. Walsh, S. W., Wang, Y. & Jesse, R. Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169**, 1007-1012 (1993).
39. Wang, J. A., Zhen, E. Z., Guo, Z. Z. & Lu, Y. C. Effect of hyperlipidemic serum on lipid peroxidation, synthesis of prostacyclin and thromboxane by cultured

- endothelial cells: protective effect of antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 243-249 (1989).
40. Broughton, P. F. & Rubin, P. C. Pre-eclampsia--the 'disease of theories'. *Br. Med. Bull.* **50**, 381-396 (1994).
 41. Wang, Y. & Walsh, S. W. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J. Reprod. Immunol.* **32**, 157-169 (1996).
 42. Smith, S. C., Baker, P. N. & Symonds, E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **177**, 57-65 (1997).
 43. Allaire, A. D., Ballenger, K. A., Wells, S. R., McMahon, M. J. & Lessey, B. A. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **96**, 271-276 (2000).
 44. Myatt, L. & Cui, X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 369-382 (2004).
 45. Myatt, L. *et al.* Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* **28**, 488-493 (1996).

CHAPITRE 3

MATERNAL INSULT DURING RAT PREGNANCY LEADS TO ALTERED KIDNEY AND CARDIAC MECHANISMS

Annie Beauséjour, Véronique Houde, Jean St-Louis et Michèle Brochu
Manuscrit pour soumission dans *Reproduction*, Janvier 2007

MATERNAL INSULT DURING RAT PREGNANCY LEADS TO ALTERED KIDNEY AND CARDIAC MECHANISMS

Nous avons récemment démontré qu'un supplément sodique induit des manifestations physiologiques différentes entre les rates non-gestantes et gestantes. En fait, un supplément sodique donné à des rates non-gestantes provoque des changements qui sont adéquats pour le maintien d'un nouvel équilibre au niveau du rein et du système cardiovasculaire. Chez les rates gestantes, une protéinurie, une restriction de croissance intra-utérine et un stress oxydatif sont présents. De plus, le supplément sodique prévient la diminution de la pression artérielle qui survient généralement au cours de la grossesse. Puisque les reins et le cœur sont impliqués dans la régulation de ces phénomènes, le but de cette étude est de déterminer si un supplément sodique entraîne des altérations au sein de ces organes pouvant mener à une réponse inappropriée à la grossesse. Pour ce faire, certains paramètres ont été mesurés selon leur implication dans le stress oxydatif (NO synthases, superoxide dismutase, catalase, 8-iso-PGF_{2α} et nitrotyrosine), l'apoptose (Bax/Bcl-2), l'inflammation (MCP-1, CTGF et TNF-α), le transport du sodium (Na⁺,K⁺-ATPase) ainsi que les deux premières enzymes du cycle de Krebs (citrate synthase et aconitase) afin de déterminer le métabolisme cardiaque. Aucune différence significative n'a été observée dans les reins de rates non-gestantes et gestantes recevant le supplément 0.9%. Cependant, une augmentation de l'expression des protéines eNOS et iNOS, de l'indice apoptotique et des nitrotyrosines ainsi qu'une diminution de l'expression de l'ARNm et de l'activité de la Na⁺,K⁺-ATPase ont été observées chez les rates gestantes recevant le supplément sodique 1.8%. Dans le cœur, ce même supplément induit une augmentation des nitrotyrosines, de la 8-iso-PGF_{2α} et de la catalase et est accompagnée par une diminution de l'activité de l'aconitase et de l'expression de la eNOS. Ces résultats suggèrent qu'une altération maternelle, par un supplément sodique, induit des changements cellulaires au niveau rénal et cardiaque, ce qui déstabilise le déroulement normal de la grossesse.

ALTERATION OF KIDNEY AND CARDIAC CELLULAR MECHANISMS BY HIGH-SALT INTAKE DURING RAT PREGNANCY

Annie Beauséjour, Véronique Houde, Jean St-Louis
and Michèle Brochu*

Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, and Department of Obstetrics and Gynecology,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title: High-sodium supplementation during rat pregnancy

Keywords: Na⁺,K⁺-ATPase, Oxidative stress, Rat model of preeclampsia

*Address for reprints:

Michèle Brochu

Centre de recherche

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, QC, Canada H3T 1C5

E-mail: 

Tel (514) 345-4931 ext. 5035

Fax (514) 345-4801

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-74600).

Condensation

High salt intake during pregnancy leads to sodium retention, kidney apoptosis as well as kidney and heart oxidative stress which destabilize the normal course of gestation.

Abstract

High-sodium intake evokes physiological manifestations that are different between nonpregnant and pregnant rats. In fact, sodium supplementation given for 1 week to nonpregnant rats induces changes that are adequate to maintain renal and circulatory homeostasis as well as arterial blood pressure. In pregnant rats, proteinuria, fetal growth restriction and placental oxidative stress are observed. Moreover, the decrease in blood pressure and expansion of circulatory volume, that are normally associated with pregnancy, are prevented by high-sodium intake. To better understand the inappropriate response to pregnancy in rats on high-sodium intake, we investigated cellular alterations in the heart and kidneys of rats on high-sodium intake. Parameters were measured according to their involvement in oxidative/nitrosative stress (nitric oxide synthases (NOSs), superoxide dismutase, catalase, 8-Isoprostaglandin F2 alpha (8-iso-PGF_{2α}), and nitrotyrosine), apoptosis (Bax/Bcl-2), inflammation (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), connective tissue growth factor (CTGF) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α)), sodium transport (Na⁺,K⁺-ATPase), as well as the first 2 tricarboxylic cycle enzymes (citrate synthase and aconitase) to assess cardiac glucose metabolism. Compared to rats on the control diet, 1.8% NaCl-water induced increases in endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS protein, in the apoptotic index and in nitrotyrosine expression with decreases in Na⁺,K⁺-ATPase mRNA and activity of pregnant rats. In the heart, heightened nitrotyrosine, 8-iso-PGF_{2α} and catalase activities were accompanied by reduced aconitase activity and eNOS protein expression. These findings suggest that maternal perturbation by high-sodium intake enhances changes in kidney and left cardiac ventricle homeostasis that destabilize the normal course of pregnancy.

Introduction

During pregnancy, metabolism and sodium homeostasis are differently regulated than in the non-pregnant state. For decades, the relationship between sodium intake and extracellular fluid volume, arterial pressure and the renin-angiotensin-system has been investigated extensively ^{1,2}. However, only a few studies have focused on the effect of sodium intake during pregnancy. We have demonstrated previously that high-sodium intake induces physiological manifestations that are different between pregnant and nonpregnant Sprague-Dawley rats ³. In fact, sodium supplementation given to nonpregnant rats did not change arterial blood pressure and elicited physiological manifestations that were adequate to maintain renal and circulatory homeostasis. However, sodium supplementation during rat gestation prevented the pregnancy-induced decrease in blood pressure and evoked many clinical features of human preeclampsia, such as proteinuria, fetal growth restriction, decreased renin-angiotensin-aldosterone system functioning, reduced circulatory volume, diminished uterine artery diameters and reversal of gestation-associated resistance to vasopressors ³⁻⁶. Moreover, we demonstrated recently that high-salt intake causes increases in placental oxidative markers ⁵.

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen oxygen species (RNOS) are compounds derived respectively from oxygen (superoxide: $O_2^{\bullet-}$, hydroxyl radical: OH^{\bullet} and hydrogen peroxide: H_2O_2) and nitrogen (peroxynitrite anion: $ONOO^-$ and nitrogen dioxide: NO_2^{\bullet}) ⁷. These molecules can be very reactive. Most organs have both non-enzymatic and enzymatic defence mechanisms that protect tissues from the harmful effects of ROS and RNOS. Glutathione is a central constituent of the antioxidant systems of ROS, by recycling ascorbic acid (vitamin C), by participating in the maintenance of protein integration, and by inhibiting lipid as well as DNA peroxidation. Superoxide dismutase (SOD) and catalase are first-line enzymes that counterbalance the deleterious effects of ROS and RNOS. SOD catalyzes the reduction of $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 , while catalase promotes the conversion of H_2O_2 to water and molecular oxygen. An imbalance between antioxidant defences and ROS/RNOS production in favour the latter could lead to

oxidative or nitrosative stress and induce cell, tissue and organ damage. F₂-isoprostanes and nitrotyrosine production are respectively considered to be markers of oxidative and nitrosative stress ^{8,9}. Inflammation and oxidative stress are closely related in a positive feedback loop involving cytokine release and ROS/RNOS production ^{10,11}. In fact, ROS can trigger an inflammatory response through the activation of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) pathway ¹².

It has been demonstrated that high-sodium intake upregulates NADPH oxidase activity in rat renal tissues, leading to increased O₂^{•-} production ¹³. On the other hand, low-salt intake induces angiotensin II release which also increases the generation of ROS via NADPH oxidase activation ¹⁴. However, the mechanisms by which high-sodium intake or angiotensin II evoke NADPH oxidase activation remain under investigation, and the relationship between the renin-angiotensin-aldosterone system, salt intake, and the development of oxidative stress is still not clearly understood. In normotensive Dahl salt-resistant rats, a 3-week period of high-sodium intake induces an increase in urinary F₂-isoprostane excretion, a marker of lipid peroxidation ¹⁵. It has also been demonstrated that arteriolar relaxation by acetylcholine in the superfused spinotrapezius muscle is decreased significantly in rats on high-sodium intake (7% for 4 to 5 weeks), and that the addition of antioxidants in the medium restores the acetylcholine response, suggesting the presence of oxidative stress ¹⁶. These reports propose that high-sodium intake in normotensive rats could contribute to increased oxidative stress generation and alter vascular reactivity.

Sodium homeostasis is primarily modulated by the rate of its renal reabsorption, a process driven by Na⁺,K⁺-ATPase contained in the basolateral membrane of tubular cells ¹⁷. Controversial results were obtained in late pregnant rats: increase as well as decrease in renal Na⁺,K⁺-ATPase activity were found ^{18,19}. It has also been shown that after exposure to ONOO⁻ (0.5 mM), the activity of this pump was reduced by 36% in the normoxic brain membranes of fetal guinea pigs ²⁰. ONOO⁻ treatment seems to alter the affinity of the active site of Na⁺,K⁺-ATPase for ATP. These data indicate that the activity of this transmembrane enzyme is susceptible to free radicals.

Cardiac glucose metabolism enzymes, such as the tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle) enzymes aconitase and citrate synthase, can be affected by oxidative/nitrosative stress. Aconitase is a member of a growing family of $O_2^{\cdot-}$ -sensitive dehydratases that contains sites of $O_2^{\cdot-}/O_2$ toxicity where $O_2^{\cdot-}$ liaison leads to inactivation of the enzyme^{21,22}.

In view of the above, we hypothesized that maternal insult during gestation by high-sodium supplementation affects cellular mechanisms in the kidney and left cardiac ventricle that may be perturbed the normal course of pregnancy and lead to the manifestations seen in our animal model. We investigated parameters in the kidneys and left cardiac ventricle according to their involvement in oxidative/nitrosative stress, apoptosis, inflammation, sodium transport and glucose metabolism in pregnant rats receiving or not a high sodium supplement.

Study design

Animals

Experiments were performed on female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec) weighing between 225 and 250 g. They were bred with a known fertile male. Day 1 of pregnancy was established when spermatozoa were found in morning vaginal smears. All animals were housed under controlled light (6 AM–6 PM) and temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). They were fed a normal diet containing 0.23% NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad, Montreal, Quebec). Control animals received tap water during the entire treatment period, while the experimental groups were exposed to 0.9 or 1.8% NaCl solution ad libitum for 7 days, starting on day 15 of experimentation, corresponding to the last week of gestation. At the end of treatment (day 22 of gestation, term = day 23), the animals were decapitated (9–9:30 AM). Kidneys and the left cardiac ventricle were rapidly removed from the animals and snap-frozen in liquid nitrogen. This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

8-Isoprostaglandin F 2 alpha (8-iso-PGF_{2α}) measurements

Heart left ventricle samples (100 mg) were homogenized in 1 ml of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.5 mM NaN₃, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, and 10 μM indomethacin. Samples were loaded on octadecylsilyl silica columns and 8-Iso-PGF_{2α} was eluted by methyl formate and evaporated under vacuum to dryness. An enzyme immunoassay was used to measure 8-iso-PGF_{2α} (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The specificity of the assay was 100% for 8-isoprostanes and $85 \pm 3\%$ for 8-iso-PGF_{2α}; cross-reactivity of the antibody with thromboxane B₂ (TxB₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), and PGF_{2α} was $\leq 0.1\%$.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis:

Total cellular RNA from frozen kidneys was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described previously³. PCR primers specific for the Na⁺-K⁺-ATPase α 1 subunit, the Na⁺,K⁺-ATPase β 1 subunit, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), connective tissue growth factor (CTGF), TNF- α and glyceraldehyde phosphodehydrogenase (GAPDH) were designed with PRIMER3 using sequence data from the NCBI database (Table 1). Single-stranded cDNA was generated by reverse transcription (SuperScriptTM II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen). PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen) was performed according to the procedure recommended by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at either 52°C for TNF- α , 59°C for Na⁺-K⁺-ATPase α 1, 58°C for Na⁺,K⁺-ATPase β 1, 58°C for MCP-1, 61°C for CTGF and 51°C for GAPDH. The extension step was performed for 1 min at 72°C. The PCR data were collected during the exponential phase. The number of cycles needed for amplification was determined for each gene (32 for TNF- α , 32 for Na⁺,K⁺-ATPase α 1, 22 for Na⁺,K⁺-ATPase β 1, 32 for MCP-1; 28 for CTGF, and 20 for GAPDH). Water was the negative control. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels containing ethidium bromide. Amplification products (Table 1) were quantified with Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

Nitric oxide synthase (NOS) expression and apoptosis

These parameters were measured by Western blotting. For NOS expression, 100 mg of the kidney cortex or left cardiac ventricle were homogenized in 1 ml of HEPES buffer (20 mmol/l, pH 7.5) containing 5 μ M pepstatin A, 5 μ M leupeptin, 1 μ M aprotinin. The measurement of Bax or Bcl-2 was done solely in the kidney because the antibodies were not efficient in cardiac ventricle preparations. For the kidney cortex, 100 mg were homogenized in a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 4 mM β -glycerophosphate, 4 mM NaF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 5 μ M leupeptin, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1 μ M microcystine and 5 μ M benzamidine. The homogenates were centrifuged at either 850g \times 15 min at 4°C (for NOSs) or 16,000g \times 15 min at 4°C (for Bax or Bcl-2). The supernatants collected were then resuspended in

Laemmli buffer. For comparative purposes, equal amounts of protein (60 $\mu\text{g}/\text{lane}$ for NOSs or 65 $\mu\text{g}/\text{lane}$ (for Bax or Bcl-2) were separated by sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide (7.5% for endothelial NOS (eNOS) or 5-15% for Bax or Bcl-2) gel electrophoresis, then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK). The membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk in Tris-buffered saline/0.1% Tween 20 (TBST), then incubated with either mouse anti-eNOS or mouse anti-inducible NOS (iNOS) (BD Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario), mouse anti-Bax (BD Transduction Laboratories) or mouse anti-Bcl-2 antibodies (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (all diluted 1:1,000 in TBST) overnight at 4°C, washed, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin G (IgG, 1:5,000 in TBST; Amersham, UK) for 45 min at room temperature. Equal protein loading was determined on samemembrane with mouse anti- β -actin primary antibodies (Abcam, Cambridge, MA). Immunoreactive bands were visualized with the enhanced ECL chemoluminescence detection system (Amersham, Piscataway, NJ).

Na⁺,K⁺-ATPase activity assay

Na⁺,K⁺-ATPase activity in the kidney (cortex and medulla) and left cardiac ventricle was quantified by the production of inorganic phosphate (Pi) liberated from ATP. In brief, 30 mg of tissues were homogenized in 1 ml of buffer containing 250 mM sucrose, 5 mM EDTA and 20 mM imidazole. Homogenates (200 μl) were preincubated for 15 min at room temperature in an equal volume of 2.6 mM SDS solution. Then, 12.5 μl of the homogenate were added to 112.5 μl of a solution containing 100 mM NaCl, 83.3 mM Tris, 15 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 5 mM NaN₃ in the absence or presence of 1 mM ouabain and incubated at 37°C for 10 min. Ouabain served as a selective inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase. Then, 30 mM Na₂ATP was added. After 5 min, the enzymatic reaction was terminated by adding 25 μl of ice-cold 72% HClO₄. The samples were centrifuged at 1,500g x 15 min at 2°C. The supernatant (200 μl) was added to 400 μl of coloration solution containing 144 mM FeSO₄.7H₂O, 8 mM (NH₄)₆MO₇O₂₄.4H₂O and 3% H₂SO₄. Absorbance was read at 750 nm to assess Pi production. Na⁺,K⁺-ATPase activity (ouabain-

sensitive fraction), calculated as the difference between total ATPase (assayed in the absence of ouabain) and the ouabain-resistant fraction, was expressed in micromoles of Pi liberated by 1 mg of protein during 1 h ($\mu\text{mol/h/mg}$ protein). Each sample was assayed in triplicate, and the difference between averaged total ATPase and averaged ouabain-resistant ATPase was used in further calculations. Protein concentrations were quantified with Bio-Rad reagent.

SOD and catalase assay

One hundred mg of kidney and left ventricle were homogenized in 1 ml of either 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.4 (for catalase) or 20 mM HEPES, pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol and 7 mM sucrose (for SOD) and centrifuged either at $10,000g \times 15$ min at 4°C (for catalase) or $1,500g \times 5$ min at 4°C (for SOD). Supernatants were used to measure enzyme activity by commercial kits according to the procedure detailed by the manufacturer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Protein nitration assay

Tyrosine nitration, a marker of nitrosative stress, was quantified by slot-blot as described by Beauchamp et al. ²³. Briefly, frozen tissues (75 mg) were homogenated in 1 ml of Tris buffer: 50 mM Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1x complete cocktail inhibitor (Roche, Indianapolis, IN). The homogenates were centrifuged at $12,000g$ at 4°C for 30 min, and the supernatant was collected. For comparative purposes, equal amounts of protein ($15 \mu\text{g/lane}$ for the kidney and $5 \mu\text{g/lane}$ for the left ventricle) were loaded in a final volume of $100 \mu\text{l}$ in phosphate-buffered saline (PBS; 15 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM K_2HPO_4 , pH 7.4). Nitrocellulose membrane was placed in a Hybri-slot Manifold apparatus (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD), and washed with PBS; $100 \mu\text{l}$ of PBS-diluted protein solution was allowed to passively diffuse for 30 min and then washed 3 times with PBS. The membrane was removed from the apparatus, washed briefly with PBS, and blocked with PBS-Tween containing 5% dried milk for 45 min at room temperature. The membrane was incubated overnight at 4°C with anti-nitrotyrosine polyclonal antibodies

(1:5,000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The washing, secondary incubation, revelation, and densitometry techniques and analysis were the same as described above for Western blotting. The membrane was finally incubated with ponceau-s to normalize for loading.

Tricarboxylic acid cycle enzyme activities

Frozen powdered tissue (left cardiac ventricle: 30 mg) was homogenized in 1 ml of 0.1 mM Tris-HCl/15 mM tricarballic acid solution (pH 7.8), centrifuged at 9,500g for 10 min at 4°C, and the supernatant collected was immediately processed for enzyme determinations. Citrate synthase activity was measured at 412 nm using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid as substrate ²⁴. Aconitase activity was quantified at 340 nm by the formation of NADPH after α -ketoglutarate production from isocitrate ²⁵. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Mississauga, Ontario), bovine serum albumin as standard. Enzyme activities are expressed in units (U) per mg of protein, where U is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μ mol of substrate per min at 37°C.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA to assess the effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation compared with the not supplemented groups. The results are expressed as means \pm SE with $P < 0.05$ considered to represent significant differences.

Results

Effects of sodium supplementation in the kidney

NOS protein expression is an index of nitric oxide (NO) production. In tissues, NO can be either cytoprotective or cytotoxic by participating in ROS production²⁶. Expression of eNOS (Fig. 1A) and iNOS (Fig. 1B) protein were increased in the kidney cortex from pregnant rats receiving sodium supplementation (0.9% or 1.8% NaCl).

SOD (Fig. 2A) and catalase (Fig. 2B) activity, the first-line antioxidant enzymes acting in the presence of oxidative stress, were not different in the kidney cortex of pregnant rats on sodium supplement compared to their controls. However, nitrotyrosine levels were increased by NaCl supplementation but only reached statistical significance in rats receiving 1.8% NaCl (Fig. 2C). This suggests the presence of nitrosative stress.

The ratio of apoptosis-promoting Bax to apoptosis-inhibiting Bcl-2 is often considered a useful index of cell death or survival²⁷. As illustrated in Figure 3, Bax expression was increased in the kidney cortex of pregnant rats receiving salt supplement (Fig. 3A). No change in Bcl-2 protein expression was observed (Fig. 3B). This led to a higher Bax/Bcl-2 in kidney cortex samples from pregnant rats on 1.8% NaCl supplementation (Fig. 3C).

To establish if inflammation is induced by sodium supplementation, proinflammatory markers (MCP-1, CTGF and TNF- α) were measured in the kidney cortex in pregnant rats. No effects were observed, as reported in Table 2.

As seen in Table 3, in the kidney cortex, 1.8% sodium intake decreased the mRNA expression of Na⁺,K⁺-ATPase α 1, the catalytic subunit as well as the mRNA of the regulatory subunit, β 1. This was accompanied by decreased activity of the pump. However, in the kidney medulla, no difference was observed between the high-sodium intake groups and the control one.

Effects of sodium supplementation in the left cardiac ventricle

iNOS bands were not detectable using Western blotting in left cardiac ventricle. As shown in Figure 4, eNOS protein expression was not different between sodium-supplemented pregnant rats and their controls.

When compared to control animals, decreases in SOD activity (Fig. 5A) were seen in the left cardiac ventricle from pregnant rats on 0.9 or 1.8% NaCl. Catalase activity (Fig. 5B) increased in pregnant rats receiving 1.8% NaCl supplementation. Left cardiac ventricle 8-iso-PGF_{2α} levels were augmented in animals receiving 1.8% NaCl (Fig. 5C). Although nitrotyrosine expression (Fig. 5D) was increased in the left cardiac ventricle from pregnant rats NaCl-supplemented water, they only reached statistical significance in rats receiving 1.8% NaCl solution. These findings suggest the presence of oxidative and nitrosative stress.

To determine if these stresses affected the Krebs cycle, citrate synthase and the second mitochondrial enzyme aconitase were measured. Citrate synthase activity was increased (Fig. 6A) and aconitase decreased (Fig. 6B) in the left cardiac ventricle of pregnant rats receiving 1.8% NaCl water.

TNF-α mRNA was measured as an indice of inflammation. No difference was apparent between not supplemented (0.57 ± 0.02 , n=5) and 0.9% NaCl -supplemented (0.64 ± 0.05 , n=5) rats. However, rats receiving 1.8% sodium supplementation presented increased values (0.76 ± 0.06 , n=5, $P < 0.05$ vs not supplemented).

Finally, Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured, and no difference between the 3 groups was noted (0.44 ± 0.06 , 0.46 ± 0.05 and 0.37 ± 0.05 , controls, 0.9%- and 1.8% NaCl-supplemented respectively, n=10 for each group).

Discussion

We reported previously that high NaCl supplementation (0.9 or 1.8% in drinking water) given to pregnant rats during the last week of gestation prevented the pregnancy-induced decrease in blood pressure. Moreover, the higher NaCl supplementation (1.8%) induced physiological changes in these pregnant rats reminiscent of those noted in preeclampsia in humans, including placental oxidative stress^{3,5}. This study demonstrates that a “maternal insult”, herein increased sodium intake, can result in cellular alterations in the kidneys and heart that could lead to inappropriate responses to pregnancy.

Effects of high-salt intake in kidney cellular mechanisms

In the kidney cortex from pregnant rats on 1.8% NaCl, an increase in eNOS and iNOS protein expressions as well as augmented nitrotyrosine expression accompanied by unchanged SOD or catalase activity were observed. In addition, the ratio of apoptosis-promoting Bax to apoptosis-inhibiting Bcl-2 was increased. It has been shown in male Sprague-Dawley rats that a high-sodium diet (6 g/kg NaCl for 10 days) induces an increase in NADH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ production by the kidneys compared to the normal salt diet (0.3 g/kg NaCl)¹³. Moreover, excessive intrarenal $O_2^{\cdot-}$ production elicits sodium retention and blood pressure elevation by compromising local NO^{\cdot} availability^{28,29}. Contrary to these reports, in our hands, no effect was found in female nonpregnant rats (unpublished data). Gender difference could have been the origin of this divergence. In fact, it has been shown that the aorta and mesenteric arteries from male hypertensive rats produce higher levels of $O_2^{\cdot-}$ than females^{30,31}. Moreover, a sexual dimorphism in antioxidant systems could also be implicated, since male Wistar rats show decreased SOD expression in the heart as well as lower SOD and catalase activities in macrophages compared to females^{32,33}. We suggest that during pregnancy, kidney redox state could be modified and more sensitive to sodium supplement. This is in accordance with an investigation in humans, suggesting that pregnancy *per se* is an oxidative condition³⁴. ROS, NO^{\cdot} and their interaction are important regulators of renal function. NO^{\cdot} can be inactivated by $O_2^{\cdot-}$ and thus limiting its vasodilatory effect. Moreover, in association with $O_2^{\cdot-}$, it can form $ONOO^-$ ²⁶, which can nitrosylate tyrosine residues and cause changes in

protein functions as well as tissue damage and increased apoptosis. Early signs of renal damage include increases in urinary protein excretion¹⁵ as observed in pregnant rats on 1.8% NaCl³. This indicates glomerular injury. Thus, the results obtained in our study suggest that NO[•] could be trapped by O₂^{-•}, leading to ONOO⁻ formation which participates in the tyrosine nitration process and apoptosis.

During normal rat and human pregnancies, sodium and volume retention are elevated^{35,36}. Sodium reabsorption is driven, in part, by the Na⁺,K⁺-ATPase pump present in the basolateral membrane of tubular cells¹⁷. Our results demonstrated that in the kidney cortex from pregnant rats receiving 1.8% NaCl, decreased mRNA expression of both Na⁺,K⁺-ATPase α1 and β1 subunits is associated with diminished activity of the pump. We have reported previously that these rats have greater sodium excretion but higher plasma sodium concentration, suggesting that they are unable to excrete the sodium excess, and this may underlie the renal defects³. Increasing NaCl concentration in the lumen of the macula densa activates eNOS³⁷. It has been shown that NO[•]-derived products (NO₂[•] and ONOO⁻) inhibit Na⁺,K⁺-ATPase activity via the possible oxidation of thiol groups of the enzyme in the cerebral cortex³⁸, erythrocytes³⁹, and kidney proximal tubules⁴⁰. In addition, it has been suggested that endogenous NO[•] *per se* plays a direct inhibitory role in Na⁺,K⁺-ATPase activity in the kidneys⁴¹. In fact, it has been reported that NO[•] generated by mouse proximal tubule epithelial cell iNOS inhibits Na⁺,K⁺-ATPase activity in an autocrine manner and this inhibition is accompanied by a reduction in Na-dependent solute transport⁴². In the present work, NOS activities were not measured. However, the increase in protein expression suggests greater NO[•] production, and this could explain the decline in Na⁺,K⁺-ATPase activity.

Effects of high-salt intake in the left cardiac ventricle

In a recent study, it was shown that pregnant rats on 0.9% NaCl supplementation have different structural left cardiac ventricle remodelling, including cell enlargement⁴³. Furthermore, the authors demonstrated that the increased contractile properties of the heart seen in pregnant rats on 0.9% NaCl supplementation appears to be due to changes in

metabolic loading or hormonal conditions rather than the inotropic state. Interestingly, the overall remodelling that occurs in these rats seems to be consequent to an inappropriate response compared to normal pregnant controls. In the present study, no significant differences were observed in aconitase and citrate synthase activities, oxidative and nitrosative stress markers, as well as in TNF- α gene expression and Na⁺,K⁺-ATPase activity in the left cardiac ventricle from pregnant rats receiving 0.9% NaCl, suggesting that oxidative stress may not be implicated in cardiac remodelling.

In the left cardiac ventricle from pregnant rats receiving 1.8% NaCl, we found that SOD activity was reduced whereas catalase activity was increased, indicating an augmentation of O₂^{-•} and formation of H₂O₂. Excessive production of ROS, including ONOO⁻ and O₂^{-•}, is detrimental to the heart ^{44,45}. It is important to point out that H₂O₂ and its oxidizing metabolites can promote lipid peroxidation. Nitrotyrosine and 8-iso-PGF_{2 α} , respective markers of ONOO⁻ production and lipid peroxidation, were significantly increased in the left cardiac ventricle from pregnant rats receiving 1.8% NaCl. This was associated with decreased aconitase, a tricarboxylic acid cycle enzyme extremely sensitive to ROS ⁴⁶, thus confirming the presence of oxidative stress that could alter cardiac function and remodelling. It has also been shown that ONOO⁻ inhibited recombinant human MnSOD activity and induced the production of nitrotyrosine ⁴⁷. Unchanged eNOS expression combined with decreased SOD activity indicated that the half-life of tissue O₂^{-•} could be potentially lengthened and this could promote its conversion to other deleterious oxidants. Indeed, a role for both NADPH and mitochondrial oxidases in cardiac ROS production and toxicity has been suggested ^{48,49}. The function of NADPH oxidases in the left ventricle of our model requires further investigation. In the present work, we noted higher TNF- α expression in the left cardiac ventricle from pregnant rats receiving 1.8% NaCl supplementation, which suggests that the cytokine pathway could be involved. In fact, ROS production was found to correlate positively with the severity of cardiac dysfunction and expression of cytokines, such as TNF- α , interleukin-1 and interferon-gamma, possibly via the activation of nuclear factor kappa B ⁵⁰.

Normal pregnancy is characterized by decreased maternal plasma glucose. This is explained by its transfer to supply fetal requirements. As demonstrated by Bassien-Capsa et al., pregnancy in rats is also accompanied by higher maternal plasma lactate/pyruvate ratios⁴³. The latter is a well-recognized marker of the redox state⁵¹. In fact, when glucose metabolism is enhanced, increased NADPH production by glucose-6-phosphate dehydrogenase can cause inhibition of pyruvate dehydrogenase, the enzyme catalyzing pyruvate conversion to acetyl coenzyme A, the first Krebs cycle substrate. This phenomenon leads to higher lactate production and anaerobic metabolism. Thus, it indicates that oxidative stress and differential regulation of cofactors could play a role in the adaptive changes that occur during pregnancy. However, when maternal insults occur, herein salt supplementation, they could alter the regulation of cofactors, such as NADPH, and evoke considerable increases in oxidative stress status.

Pregnancy in humans and rats is a condition where several changes occur in order to bring into being. Our results, obtained in the kidney, indicate that pregnancy itself is an oxidative state. However, adaptation of the maternal body to this new environment resets cellular homeostasis. Decreased blood glucose concentration and elevated triglyceride and lactate levels, as reported by Bassien-Capsa et al suggest an effect on redox status. With high-sodium intake, the boundaries of cellular homeostasis are exceeded, and oxidative stress ensues. Our pregnancy animal model provides information on kidney and heart damage while maternal perturbations are taking place. In fact, on day 22 of gestation, we demonstrated that high-NaCl supplementation leads to sodium retention, kidney apoptosis as well as kidney and heart oxidative stress which destabilize the normal course of gestation. Oxidative stress has been clearly associated with preeclampsia and our results correlates with human data, providing more information at cellular level⁵²⁻⁵⁴. Poston and colleagues have recently reported that the use of an antioxidant treatment combining vitamins C and E did not prevent preeclampsia in women at risk⁵⁵. Thus, we propose that time course investigations must be undertaken to determine if oxidative stress and NO[•] reduction are the causes or consequences of renal and cardiac alterations observed in our study.

Table 1. PCR primers designed (by Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canada) for genes of interest

Gene (GeneBank #)		Oligonucleotide sequence	Product size (pb)
TNF-α (X-66539)	FP	TCTGTGCCTCAGCCTCTTCT	112
	RP	TCCTCTTCAAGGGTTTACCC	
Na⁺,K⁺-ATPase α1 (NM_012504)	FP	AGATTTGAGCCGAGGCCTAACACC	418
	RP	TCCGCCCTTCACCTCCACCAGAT	
Na⁺,K⁺-ATPase β1 (NM_013113)	FP	GGCTAGTGGGAAAGATTTGTGC	357
	RP	TGGAGACTTACCCTCTGACGATG	
MCP-1 (NM_031530)	FP	CCAGAAACCAGCCA ACTCTC	223
	RP	TGCTGCTGGTGATTCTCTTG	
CTGF (NM_022266)	FP	ATGGAGACATGGCGTAAAGC	303
	RP	CACTCTTCCAGGAGGCTCAC	
GAPDH (XM234175)	FP	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	369
	RP	GGATGCAGGGATGATGTTCT	

FP: forward primer (5'→3'); RP: reverse primer (5'→3'); TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CTGF: connective tissue growth factor; GAPDH: glyceraldehyde phosphodehydrogenase.

Table 2. Effect of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on inflammatory gene mRNA expression (MCP-1, CTGF and TNF- α) in the kidney cortex of pregnant rats.

	Not supplemented	0.9% NaCl	1.8% NaCl
MCP-1 mRNA			
Kidney cortex (arbitrary units)	1.02 \pm 0.14 (5)	1.02 \pm 0.17 (5)	0.85 \pm 0.17 (5)
CTGF mRNA			
Kidney cortex (arbitrary units)	1.60 \pm 0.09 (5)	1.48 \pm 0.18 (5)	1.53 \pm 0.15 (5)
TNF-α mRNA			
Kidney cortex (arbitrary units)	1.04 \pm 0.11 (5)	0.87 \pm 0.12 (5)	0.86 \pm 0.07 (5)

Values are means \pm SE. Number shown in parentheses represent the number of rats used.

Table 3. Effect of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on Na⁺,K⁺-ATPase α 1 and β 1 subunit mRNA expression and Na⁺,K⁺-ATPase activity in the kidneys of pregnant rats.

	Not supplemented	0.9% NaCl	1.8% NaCl
Na⁺,K⁺-ATPase α1 mRNA			
Kidney cortex (arbitrary units)	1.40 \pm 0.09 (5)	1.18 \pm 0.21 (5)	0.74 \pm 0.11* (5)
Na⁺,K⁺-ATPase β1 mRNA			
Kidney cortex (arbitrary units)	2.24 \pm 0.13 (5)	1.93 \pm 0.22 (5)	1.77 \pm 0.12* (5)
Na⁺,K⁺-ATPase activity			
Kidney cortex (μ Mol PO ₄ /mg/h)	4.90 \pm 0.27 (10)	4.56 \pm 0.43 (10)	3.53 \pm 0.28* (10)
Na⁺,K⁺-ATPase activity			
Kidney medulla (μ Mol PO ₄ /mg/h)	3.90 \pm 0.57 (10)	4.16 \pm 0.34 (10)	4.36 \pm 0.26 (10)

Values are means \pm SE. Number shown in parentheses represent the number of rats used.

*P<0.05 compared with not supplemented rats.

Figure 1.

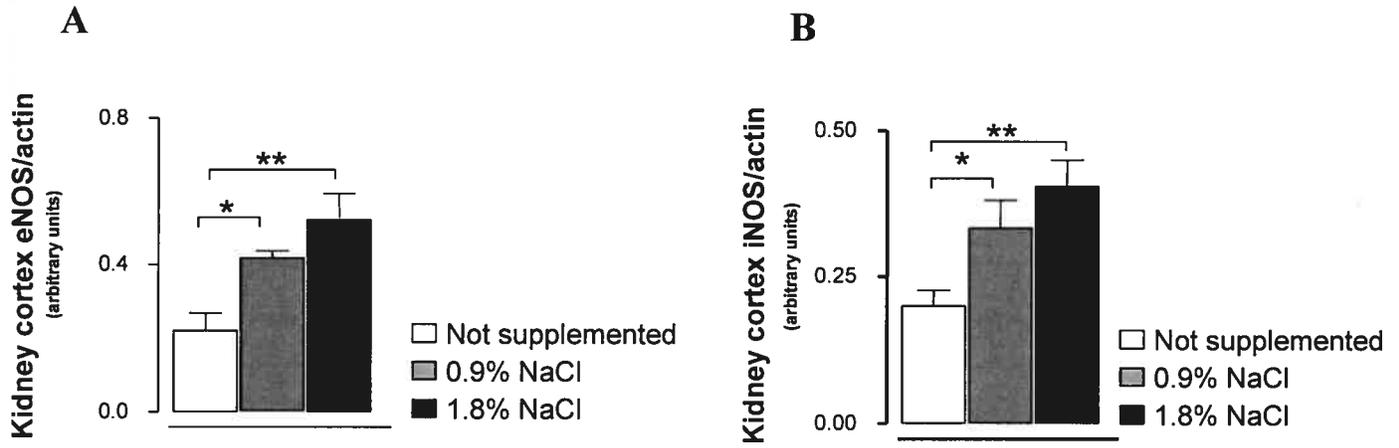


Figure 2.

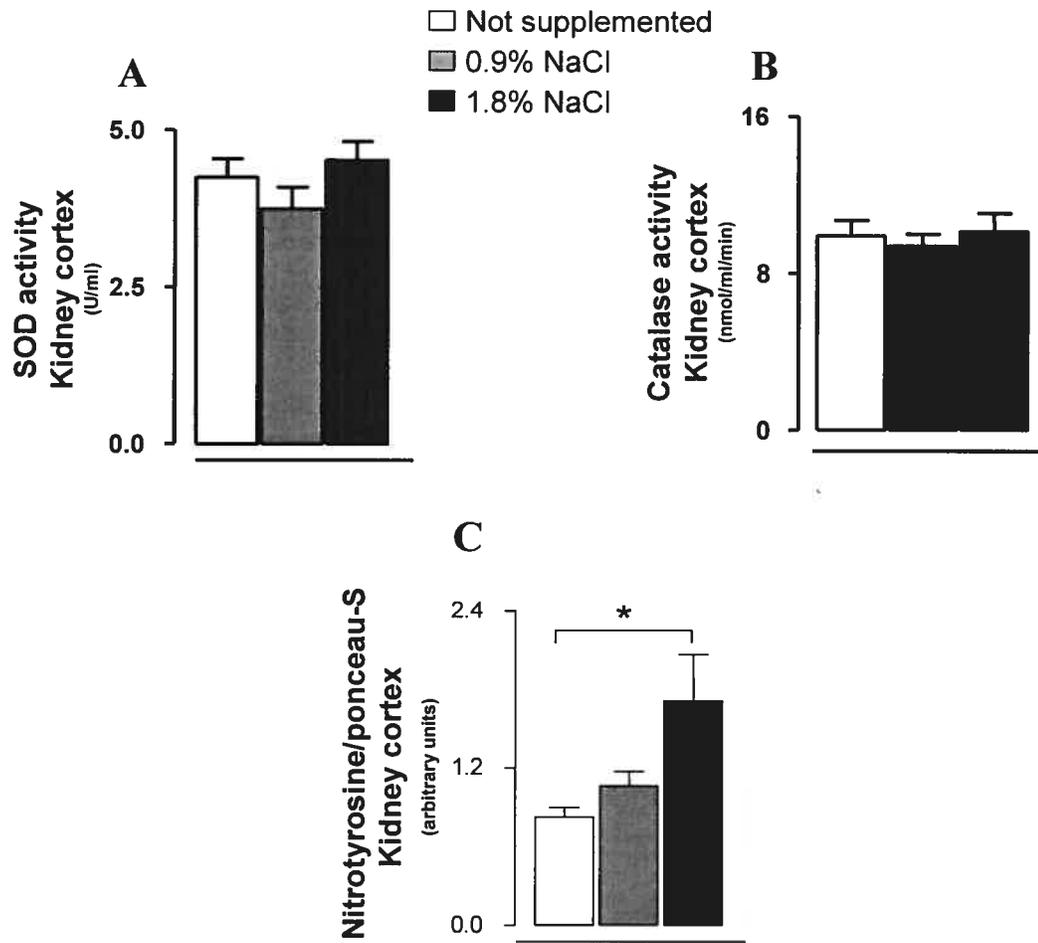


Figure 3.

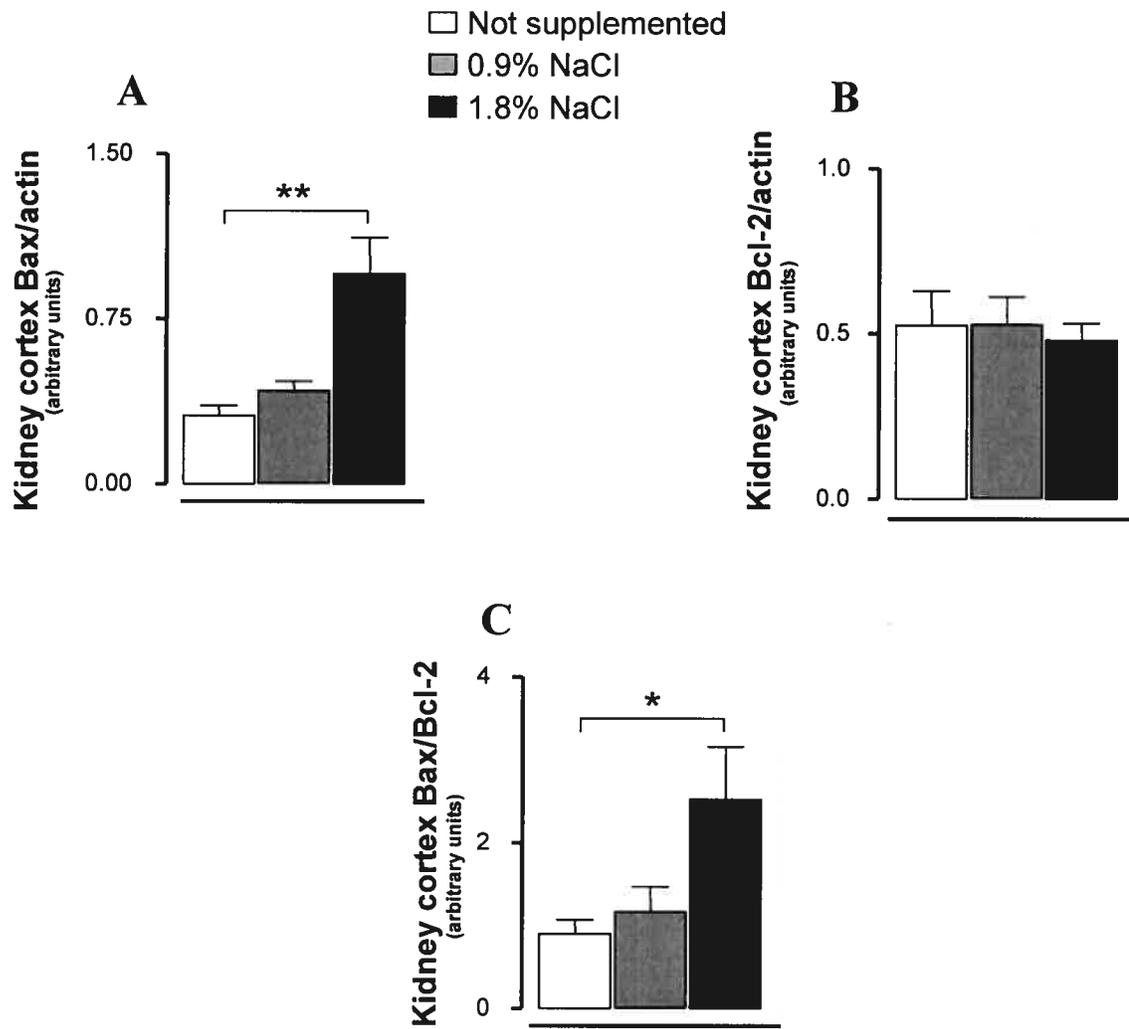


Figure 4.

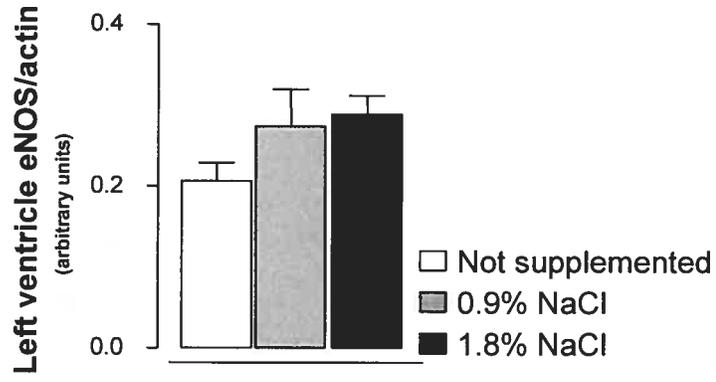


Figure 5

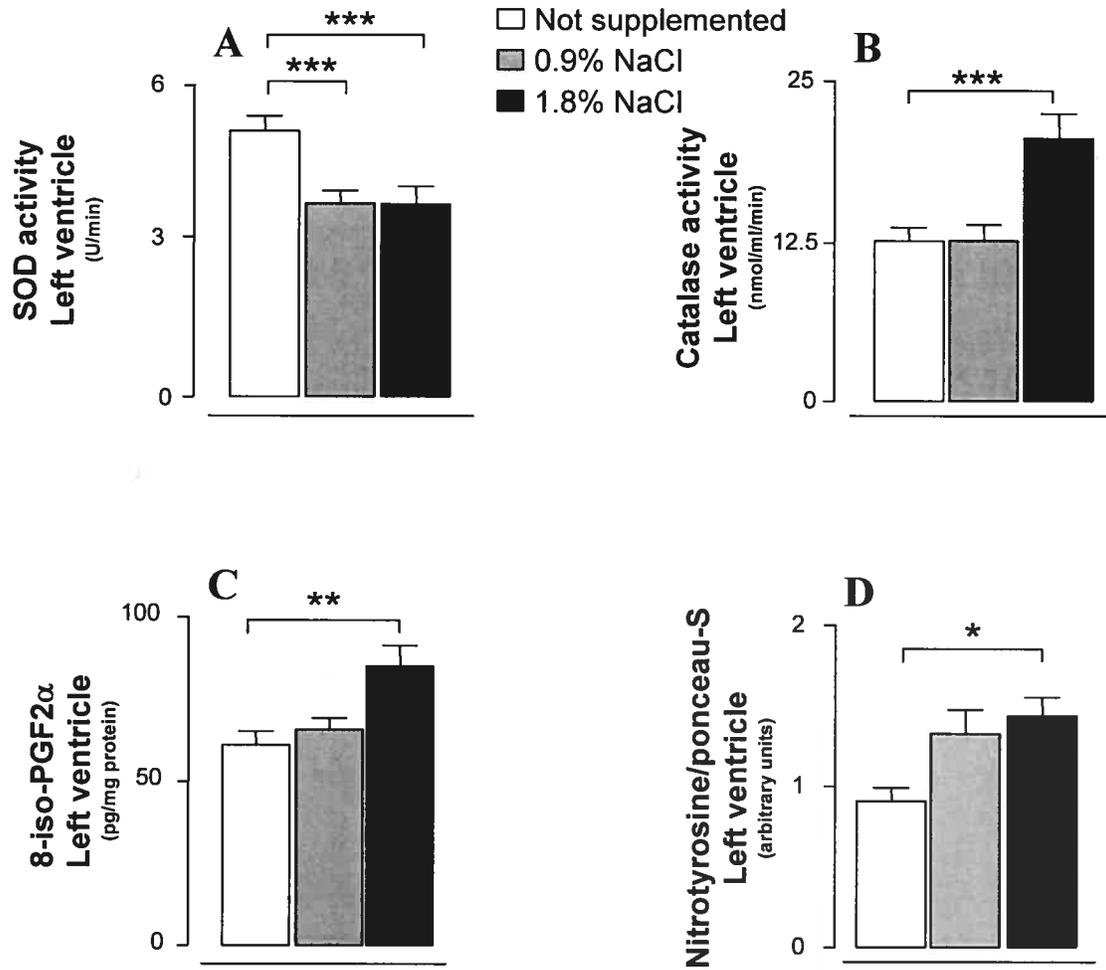
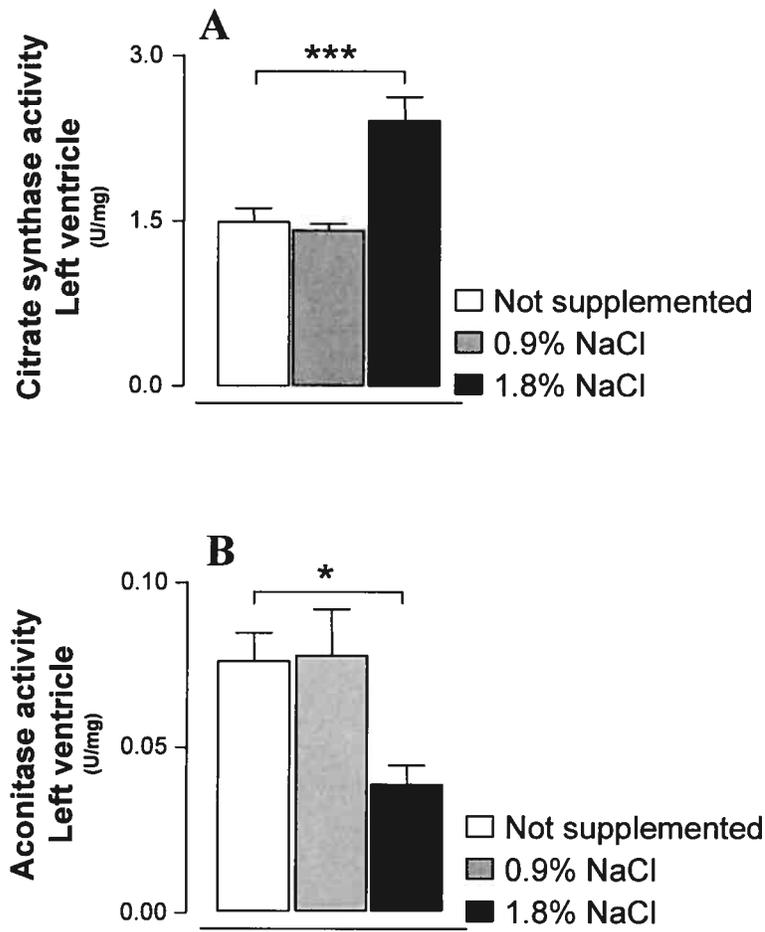


Figure 6



Legends to figures**Figure 1.**

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on kidney cortex eNOS (A) and iNOS (B) protein expression in pregnant rats. Data from densitometric analysis are expressed as means \pm SE from 6 rats per group. Values significantly different from not supplemented control animals are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2.

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on kidney cortex SOD activity (A), catalase activity (B) and nitrotyrosine expression (C) in pregnant rats. The results are expressed as means \pm SE from 10 rats per group. Values significantly different from not supplemented control animals are indicated by * $P < 0.05$.

Figure 3.

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on kidney cortex levels of pro-apoptotic Bax (A) and anti-apoptotic Bcl-2 (B) as well as Bax:Bcl-2 ratios (C) in pregnant rats. Data from densitometric analysis are expressed in arbitrary units. The results are expressed as means \pm SE from 6 rats per experimental condition. Values significantly different from not supplemented control animals are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4.

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on left cardiac ventricle eNOS protein expression in pregnant rats. Data from densitometric analysis are expressed as means \pm SE from 6 animals per group.

Figure 5.

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on left cardiac ventricle SOD activity (A), catalase activity (B), 8-isoPGF 2α levels (C) and nitrotyrosine expression (D) in pregnant rats. The results are expressed as means \pm SE from 10 rats per group. Values significantly

different from not supplemented control animals are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 6.

Effects of 0.9 and 1.8% NaCl supplementation on tricarboxylic acid cycle enzyme activities: citrate synthase (A) and aconitase (B) in the left cardiac ventricle in pregnant rats. The results are expressed as means \pm SE from 10 rats per group. Values significantly different from not supplemented control animals are indicated by * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

References

1. Graudal, N. A., Galloe, A. M. & Garred, P. Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterols, and triglyceride: a meta-analysis. *JAMA* 279, 1383-1391 (1998).
2. Heer, M., Baisch, F., Kropp, J., Gerzer, R. & Drummer, C. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F585-F595 (2000).
3. Beausejour, A., Auger, K., St Louis, J. & Brochu, M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H375-H383 (2003).
4. Auger, K., Beausejour, A., Brochu, M. & St Louis, J. Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287, H1848-H1856 (2004).
5. Beausejour, A., Bibeau K, St Louis, J. & Brochu, M. Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta* In press, (2006).
6. St-Louis, J., Sicotte, B., Beausejour, A. & Brochu, M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction*. 131, 331-339 (2006).
7. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724 (1994).
8. Roberts, L. J. & Morrow, J. D. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 505-513 (2000).
9. Ischiropoulos, H. *et al.* Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 431-437 (1992).
10. Habibzadegah-Tari, P., Byer, K. & Khan, S. R. Oxalate induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in HK-2 cells involves reactive oxygen species. *Urol. Res.* 33, 440-447 (2005).
11. Sun, Y. *et al.* Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 161, 1773-1781 (2002).
12. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* (2006).
13. Kitiyakara, C. *et al.* Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2775-2782 (2003).

14. Griending, K. K. & Ushio-Fukai, M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul. Pept.* 91, 21-27 (2000).
15. Meng, S., Roberts, L. J., Cason, G. W., Curry, T. S. & Manning, R. D., Jr. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 283, R732-R738 (2002).
16. Lenda, D. M., Sauls, B. A. & Boegehold, M. A. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H7-H14 (2000).
17. Feraille, E. & Doucet, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* 81, 345-418 (2001).
18. Lindheimer, M. D. & Katz, A. I. Kidney function in the pregnant rat. *J. Lab Clin. Med.* 78, 633-641 (1971).
19. Mahaney, J. *et al.* Renal cortical Na⁺-K⁺-ATPase activity and abundance is decreased in normal pregnant rats. *Am. J. Physiol* 275, F812-F817 (1998).
20. Qayyum, I. *et al.* Nitration as a mechanism of Na⁺, K⁺-ATPase modification during hypoxia in the cerebral cortex of the guinea pig fetus. *Neurochem. Res.* 26, 1163-1169 (2001).
21. Gardner, P. R. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 349, 9-23 (2002).
22. Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B. & White, C. W. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13399-13405 (1995).
23. Beauchamp, M. H. *et al.* Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1885-1894 (2004).
24. Nulton-Persson, A. C. & Szweda, L. I. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276, 23357-23361 (2001).
25. Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., Benderdour, M. & Des, R. C. Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 283, H1505-H1514 (2002).
26. Gryglewski, R. J., Palmer, R. M. & Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-456 (1986).

27. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619 (1993).
28. Zou, M. H. & Ullrich, V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.* 382, 101-104 (1996).
29. Makino, A., Skelton, M. M., Zou, A. P., Roman, R. J. & Cowley, A. W., Jr. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension* 39, 667-672 (2002).
30. Brandes, R. P. & Mugge, A. Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci.* 60, 391-396 (1997).
31. Dantas, A. P. *et al.* Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc. Res.* 61, 22-29 (2004).
32. Azevedo, R. B., Lacava, Z. G., Miyasaka, C. K., Chaves, S. B. & Curi, R. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 683-687 (2001).
33. Barp, J. *et al.* Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1075-1081 (2002).
34. Wisdom, S. J., Wilson, R., McKillop, J. H. & Walker, J. J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 1701-1704 (1991).
35. Baylis, C. The determinants of renal hemodynamics in pregnancy. *Am. J. Kidney Dis.* 9, 260-264 (1987).
36. Atherton, J. C. *et al.* Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J. Physiol* 330, 81-93 (1982).
37. Herrera, M. & Garvin, J. L. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. *Hypertension* 45, 1062-1067 (2005).
38. Sato, T., Kamata, Y., Irifune, M. & Nishikawa, T. Inhibitory effect of several nitric oxide-generating compounds on purified Na⁺,K⁺-ATPase activity from porcine cerebral cortex. *J. Neurochem.* 68, 1312-1318 (1997).
39. Turkozkan, N., Unlu, A., Ertabak, A., Cimen, B. & Karabicak, U. The effects of peroxynitrite on erythrocytes. *Clin. Chem. Lab Med.* 39, 1263-1266 (2001).

40. Zhang, C., Imam, S. Z., Ali, S. F. & Mayeux, P. R. Peroxynitrite and the regulation of Na(+),K(+)-ATPase activity by angiotensin II in the rat proximal tubule. *Nitric Oxide*. 7, 30-35 (2002).
41. Kang, D. G., Kim, J. W. & Lee, J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na,K-ATPase activity in the kidney. *Pharmacol. Res.* 41, 121-125 (2000).
42. Guzman, N. J., Fang, M. Z., Tang, S. S., Ingelfinger, J. R. & Garg, L. C. Autocrine inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J. Clin. Invest* 95, 2083-2088 (1995).
43. Bassien-Capsa, V., Fouron, J. C., Comte, B. & Chorvatova, A. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc. Res.* 69, 423-431 (2006).
44. Li, J. M. & Shah, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 287, R1014-R1030 (2004).
45. Hare, J. M. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 351, 2112-2114 (2004).
46. Hausladen, A. & Fridovich, I. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* 269, 29405-29408 (1994).
47. Millan-Crow, L. A., Crow, J. P. & Thompson, J. A. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37, 1613-1622 (1998).
48. Mohazzab, K. M., Kaminski, P. M. & Wolin, M. S. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol* 266, H2568-H2572 (1994).
49. Guzik, T. J. *et al.* UltraRapid communications : vascular superoxide production by NAD(P)H Oxidase Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 86, 1008 (2000).
50. Ferdinandy, P., Danial, H., Ambrus, I., Rothery, R. A. & Schulz, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ. Res.* 87, 241-247 (2000).
51. Buchalter, S. E., Crain, M. R. & Kreisberg, R. Regulation of lactate metabolism in vivo. *Diabetes Metab Rev.* 5, 379-391 (1989).
52. Hubel, C. A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 222-235 (1999).

53. Walsh, S. W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 93-104 (1998).
54. Walsh, S. W. & Wang, Y. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 1456-1461 (1993).
55. Poston, L., Briley, A. L., Seed, P. T., Kelly, F. J. & Shennan, A. H. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 367, 1145-1154 (2006).

DISCUSSION ET CONCLUSION

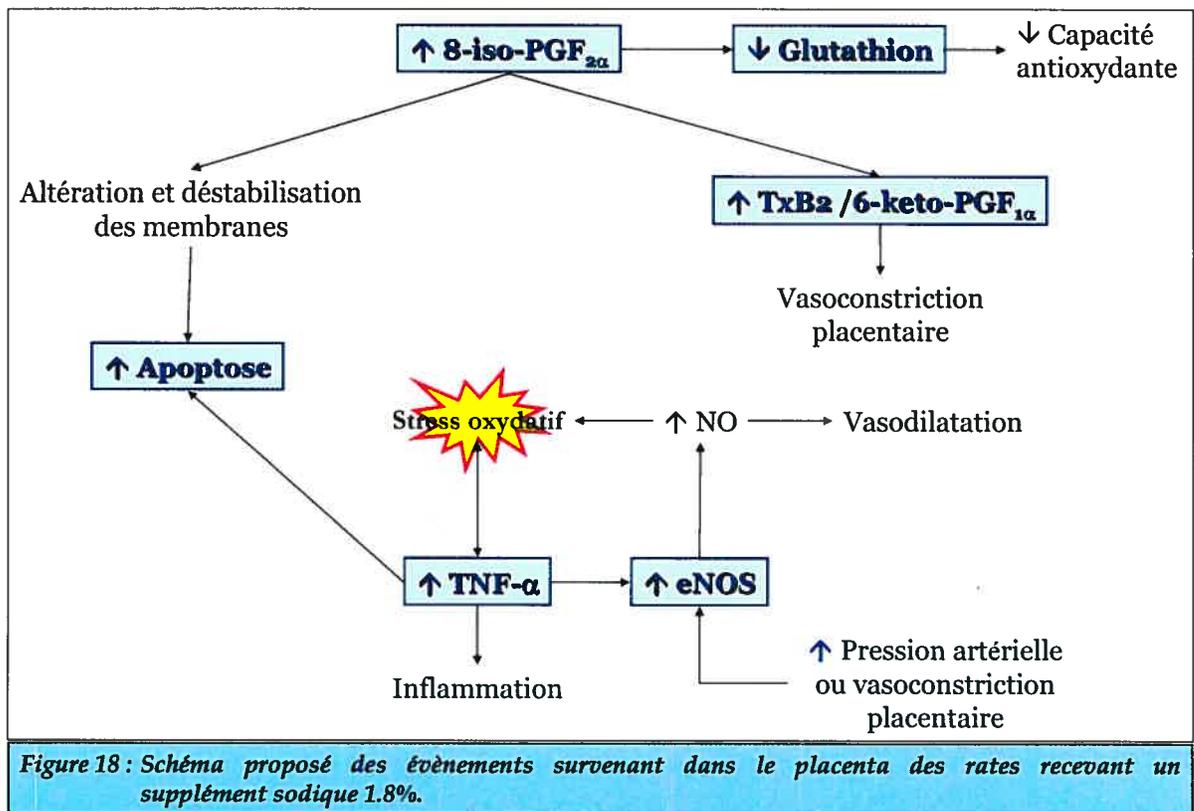
DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce travail, nous avons démontré qu'une altération maternelle par supplément sodique (0.9 ou 1.8%) empêche la baisse de pression artérielle normalement observée au cours de la gestation. De plus, les rates gestantes sous le supplément 1.8% NaCl présentent des modifications au sein de mécanismes cellulaires placentaires, rénaux et cardiaques. Les données obtenues chez les rates gestantes recevant le supplément 0.9% NaCl, suggère que la grossesse s'adapte à cette insulte. En effet, ce supplément conduit à des changements cellulaires non significatifs se situant entre ceux des rates non-gestantes et des gestantes.

Le placenta

Comme décrit dans le manuscrit « Placental oxydative stress in a rat model of preeclampsia ³⁰⁷», en donnant un supplément sodique 1.8% au cours de la gestation chez la rate, nous induisons des changements tels qu'une diminution du glutathion total et une augmentation de la 8-isoPGF_{2α}. Ces résultats nous indiquent la présence d'un stress oxydatif placentaire. Tout comme chez la femme, un déséquilibre entre les forces pro-oxydantes et anti-oxydantes favorisant l'oxydation est présent au sein du modèle de pré-éclampsie expérimentale ^{81,308,309}. Nous proposons un schéma des évènements survenant dans les placentas des rates recevant un supplément sodique de 1.8%. Tel que décrit dans la figure 18, une augmentation du NaCl à la diète induit une augmentation des niveaux de 8-iso-PGF_{2α} suggérant la présence d'une peroxydation lipidique et une déstabilisation des membranes. Le système antioxydant semble aussi altéré puisque nous avons observé une diminution du glutathion total. Habituellement, lors d'une attaque oxydative, les antioxydants sont produits en grande quantité et neutralisent les ROS générés ³¹⁰. Cependant, une production excessive de ceux-ci peut induire la déplétion des systèmes antioxydants ³¹¹. Nous croyons que la diminution du glutathion observée ici pourrait être la conséquence de l'augmentation de la peroxydation lipidique. La présence d'un stress oxydatif peut entraîner un déséquilibre entre la synthèse du thromboxane (vasoconstricteur) et de la prostacycline (vasodilatateur). Ces hormones vasoactives participent, entre autres, à la régulation de la circulation utéro-placentaire ³¹². Nous avons

observé, dans notre modèle animal, une augmentation du ratio $\text{TxB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$, ce qui suggère une vasoconstriction et une augmentation agrégation plaquettaire placentaire ²⁵⁹. Ce déséquilibre dans la synthèse de ces eicosanoïdes au cours de la grossesse pourrait altérer la circulation utéro-placentaire et réduire l'apport en nutriments au fœtus. En accord avec ces données, nos collaborateurs et nous avons observé une diminution du diamètre des artères utérines, une diminution du poids des placenta ainsi qu'une restriction de croissance intrautérine chez les rates recevant le supplément 1.8% NaCl ^{216,302}. Une corrélation existe entre la présence d'un stress oxydatif et l'augmentation du $\text{TNF-}\alpha$ ²⁷⁹. De plus, cette cytokine participe à l'induction de l'apoptose ¹⁰⁶. Nous proposons donc que l'augmentation de l'expression du $\text{TNF-}\alpha$ placentaire observée dans notre modèle animal contribue au stress oxydatif et à l'apoptose. Généralement, le rapport entre les protéines pro-apoptotique et anti-apoptotique suffit afin d'établir la présence d'apoptose. Cependant, afin d'appuyer ces résultats, il serait bon de vérifier l'activité des caspases effectrices telle que la caspase-3. Finalement, nous avons démontré une élévation de l'expression protéique de la eNOS suggérant une production accrue de NO. Le NO pourrait agir de façon compensatoire à la hausse de pression artérielle ou de la vasoconstriction placentaire. En second lieu, puisqu'il est aussi considéré comme un radical libre et sa liaison à l'anion superoxyde participe à la nitration des protéines, sa contribution à la présence du stress oxydatif placentaire n'est pas à exclure. Ainsi, afin de déterminer la voie empruntée par le NO, il serait intéressant de mesurer l'expression des nitrotyrosines ainsi que des enzymes antioxydantes impliquées dans la détoxification de l'anion superoxyde telle que la SOD et la catalase ¹⁵².



Le rein

La pré-éclampsie est une maladie présentant une constellation de signes et symptômes lui conférant un aspect multisystémique. Plusieurs organes dont le rein sont touchés par ce désordre et engendrent des altérations dans la réponse de l'organisme face à la grossesse. Au cours de la grossesse normale, le taux de filtration glomérulaire est augmenté de près de 40% induisant une diminution de la concentration des marqueurs sériques de la fonction rénale. Lors de la pré-éclampsie, le taux de filtration glomérulaire diminue de 30% comparativement à la grossesse normale. Cette pathologie est aussi caractérisée par l'apparition d'une protéinurie pathologique. Les mécanismes exacts de la réduction de l'hémodynamie rénale au cours de la pré-éclampsie sont encore inconnus.

Nous avons démontré, qu'un supplément sodique donné à des rates non-gestantes ne modifie pas la pression artérielle ²¹⁶. De plus, l'augmentation de l'excrétion de sodium chez ces rates assure le maintien de la concentration plasmatique normale de cet ion. Ces résultats démontrent que les rates non-gestantes répondent adéquatement à un

supplément sodique donnée pendant 1 semaine et maintiennent leur homéostasie ²¹⁶. Au cours de la grossesse, le supplément sodique (0.9 ou 1.8%) empêche la baisse de pression artérielle normalement observée. Bien que l'excrétion rénale de sodium soit élevée chez les rates gestantes recevant le supplément 1.8% NaCl, celle-ci ne semble pas suffisante puisque la concentration plasmatique du sodium est augmentée. Une protéinurie est aussi présente ce qui suggère une atteinte du glomérule rénal. Dans la littérature, les modifications hémodynamiques rénales en présence d'une augmentation de la consommation de sodium ont été principalement étudiées chez des sujets normaux ou souffrants d'hypertension essentielle. Il a été démontré, par exemple, qu'un supplément sodique entre 180 et 200mmol/jour, pendant 4 jours, augmente la pression intrarénale et induit une hyperfiltration glomérulaire chez des patients normotendus ³¹³. Cette dernière se définit par une augmentation du débit plasmatique rénal et du taux de filtration glomérulaire. De plus, il a été démontré que l'hyperfiltration induite par une augmentation de l'apport en sodium affecte l'intégrité de la membrane basale glomérulaire chez le rat, ce qui entraîne une protéinurie ³¹⁴ (voir la figure 1 dans l'introduction). Les mécanismes par lesquels cette protéinurie survient ne sont toutefois pas encore élucidés.

Mon travail décrit dans le manuscrit « Alteration of kidney and cardiac cellular mechanisms by high sodium intake during rat pregnancy » démontre qu'un supplément sodique de 1.8% NaCl, donné pendant la dernière semaine de gestation chez la rate, induit un stress oxydatif et une augmentation de l'apoptose dans le rein. De plus, nous avons observé une diminution de l'activité de la pompe Na⁺,K⁺-ATPase. En accord avec le fait que le sel semble être un inducteur de stress oxydatif, il a été démontré qu'un supplément sodique de 6g/kg/jour pendant 10 jours induit une augmentation de la production de l'anion superoxyde dans les reins de rats ¹²⁸. De par les résultats obtenus, nous proposons un schéma des mécanismes cellulaires qui surviennent dans le rein de ces rates suite à un supplément sodique (figure 19). Nos résultats concernant l'expression des protéines e- et iNOS sous-entend une production accrue de NO. Sa combinaison avec l'anion superoxyde, et la formation subséquente de peroxynitrite paraît évidente puisque nous

observons une augmentation des nitrotyrosines. Ceci suggère une altération de la fonction de diverses protéines. Toutefois, il a été démontré que le NO est un régulateur important de la réabsorption de sodium par le rein en condition normale. En effet, il induit une diminution de la rétention de sodium et d'eau dans le tubule proximal, où s'effectue la majorité de sa réabsorption³¹⁵. L'effet du NO sur la réabsorption de sodium dans cette portion du tubule semble être dû, en partie, à un effet inhibiteur directe sur l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase³¹⁶. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de 28% de l'activité de la cette pompe au niveau du cortex rénal, où se retrouve la majorité des tubules proximaux, des rates gestantes recevant 1.8% NaCl comparativement aux rates gestantes témoins. La Na^+, K^+ -ATPase est très sensible aux radicaux libres et à la peroxydation des lipides membranaires³¹⁷. En effet, il a été démontré qu'une exposition des membranes corticales cérébrales de cobayes au peroxy-nitrite ($0.5\mu\text{M}$) induit une diminution de 36% de l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase³¹⁸. Ainsi, nous proposons que la diminution de l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase que nous observons, pourrait être due à une action combinée du NO et de ses dérivés oxydants tels que le peroxy-nitrite. Afin de compléter la caractérisation rénale de notre modèle animal, des perspectives seront discutées plus loin dans la discussion.

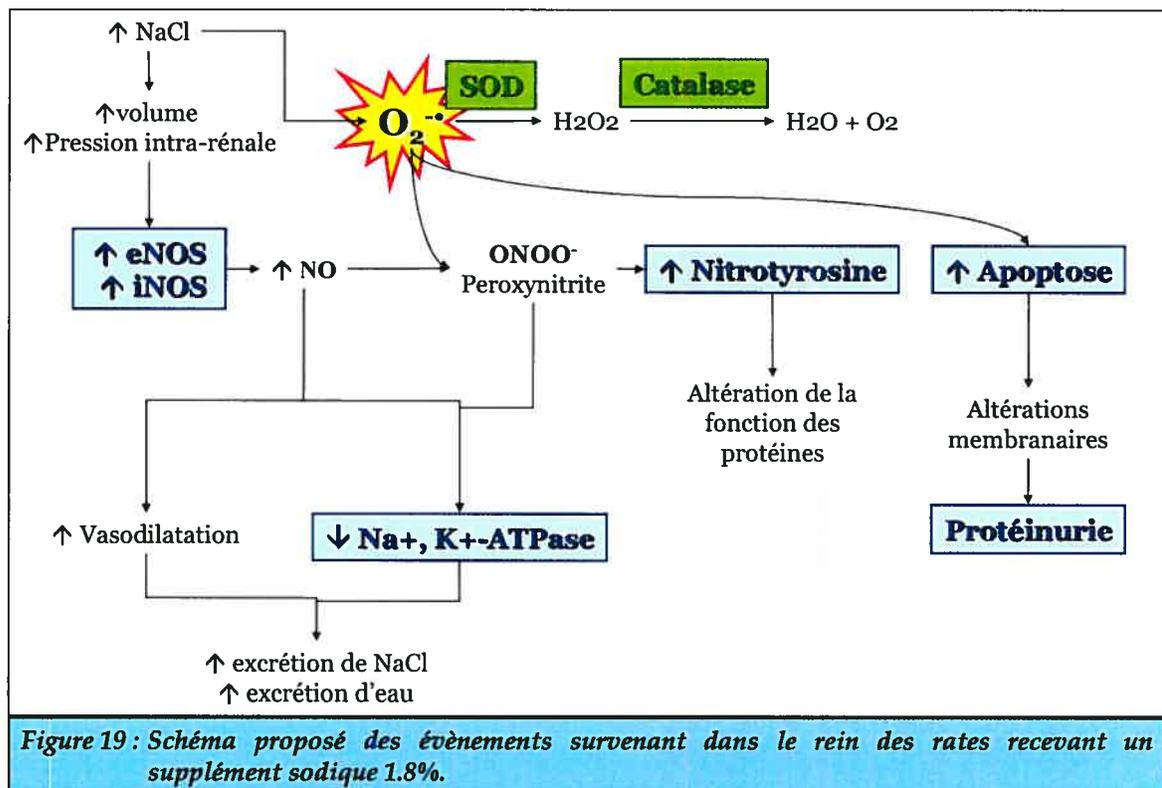


Figure 19 : Schéma proposé des événements survenant dans le rein des rates recevant un supplément sodique 1.8%.

Le coeur

Mes travaux démontrent qu'un supplément sodique de 1.8% au cours de la gestation chez la rate entraîne un stress oxydatif ainsi qu'une altération du métabolisme cardiaque. La figure 20 est une représentation schématique des évènements qui selon nous, surviennent dans le ventricule gauche de ces rates. Comme il a été discuté dans la section sur le rein, une diète riche en sodium (6g/kg/jour) pendant 10 jours entraîne une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase dans le rein de rat, entraînant une production accrue d'anion superoxyde ¹²⁸. Dans la littérature, aucune donnée n'est présente quant à l'effet d'un supplément sodique sur l'induction du stress oxydatif dans le coeur. Ainsi, nous proposons qu'un apport riche en sel cause une augmentation de l'anion superoxyde. L'habileté du $O_2^{\bullet-}$ à réagir avec le NO induit la formation de peroxynitrite (ONOO⁻). Ce dernier est un puissant oxydant capable d'induire la peroxydation lipidique et la formation des nitrotyrosines tel que nous l'observons dans le ventricule gauche des rates gestantes recevant le supplément sodique de 1.8%. Une diminution de l'activité de la SOD est aussi observée. Il a été démontré que la SOD pouvait être régulée négativement par le ONOO⁻ ³¹⁹. Ainsi, une inactivation de cette enzyme par ce radical entraîne une accumulation de l'anion superoxyde menant à une production supplémentaire de ONOO⁻. L'augmentation de l'activité de la catalase suggère une présence élevée de H₂O₂, participant lui aussi à la peroxydation des lipides. Tel que mentionné dans l'introduction l'aconitase est sensible aux variations du statut oxydant de la cellule ⁴³. Elle est une enzyme contenant un groupe central Fer-souffre sensible à l'oxydation par les radicaux libres. Une attaque radicalaire induit la relâche de ce fer (Fe²⁺) et provoque l'inhibition de l'enzyme ⁴³. Ainsi, la diminution de l'activité de cette enzyme observée dans notre modèle, en plus de suggérer une altération dans le métabolisme du glucose, est souvent interprétée comme un marqueur du stress oxydatif. Finalement, nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm du TNF- α . Ceci suggère la présence d'une inflammation et, comme nous l'avons discuté pour le placenta, cette cytokine participe aussi à l'induction d'un stress oxydatif ²⁷⁹. Ces conditions pourraient être reponsables d'une altération de la capacité du coeur à pomper le sang. Le calcium intracellulaire contribue de façon importante lors de la contraction des cellules cardiaques. Il a été

démontré que dans des conditions oxydatives, une augmentation de la concentration de calcium libre intracellulaire est observée dans une suspension de cellules neuronales ³²⁰. De plus, il a été démontré qu'un stress oxydatif altère la fonction cardiaque via une diminution de la pompe Ca^{2+} -ATPase sarco/endoplasmique (SERCA), responsable de maintenir une concentration adéquate de calcium à l'intérieur du réticulum endoplasmique, ainsi qu'une redistribution des chaînes lourdes de myosine, protéine contractile dans les cardiomyocytes ³²¹. Aussi, il a été montré qu'un supplément sodique de 0,9% dans l'eau de breuvage pendant la dernière semaine de gestation chez la rate induit une altération des courants calcique de type L ³²². Ces études suggèrent donc qu'un stress oxydatif peut affecter la fonction cardiaque. Ainsi, il serait intéressant de faire des recherches approfondies sur la signalisation du calcium dans les cœurs des rates soumises aux suppléments sodiques.

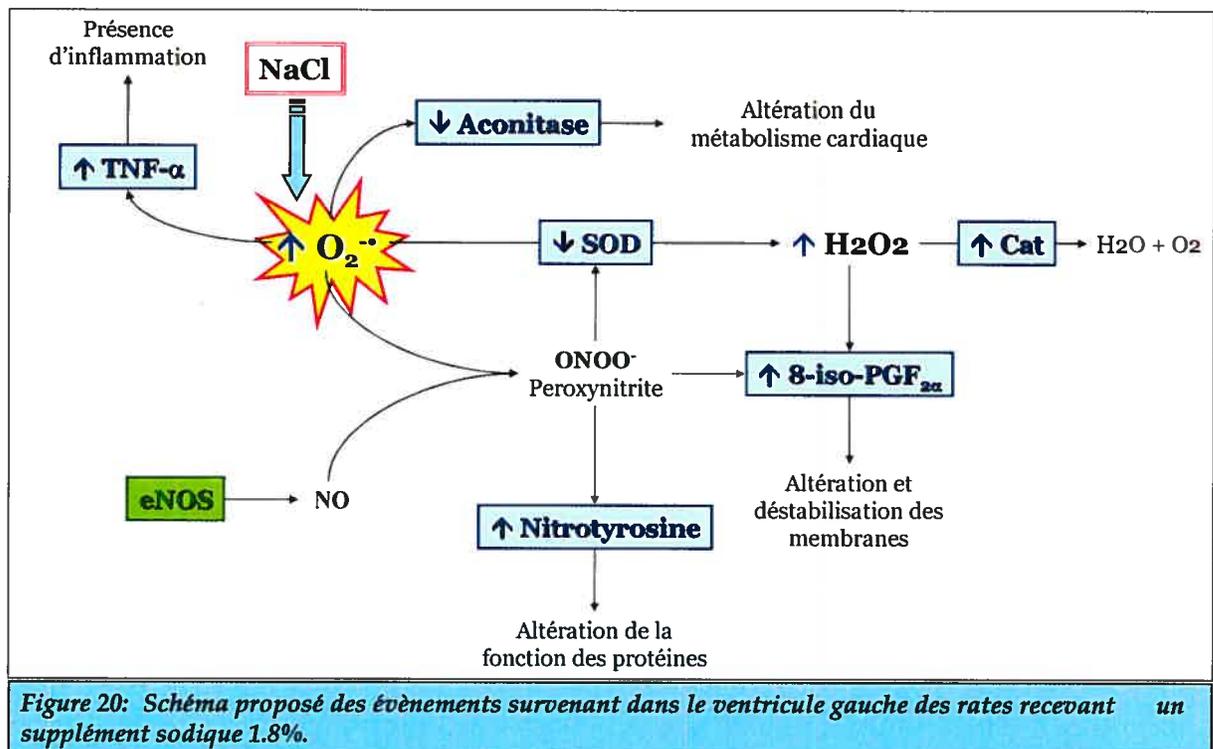


Figure 20: Schéma proposé des événements survenant dans le ventricule gauche des rates recevant un supplément sodique 1.8%.

Pré-éclampsie et antioxydants

Mes travaux démontrent qu'une insulte maternelle est accompagnée d'une augmentation de la pression artérielle ainsi que d'un stress oxydatif placentaire, rénal et cardiaque chez la rate gestante. Des travaux chez l'humain sont en accord avec cela. En effet, il a été démontré qu'au cours de la pré-éclampsie, maladie hypertensive de la grossesse, un déséquilibre entre les forces pro-oxydantes et anti-oxydantes est présent ^{305,308,309}. Par exemple, comparativement à la grossesse normale, une augmentation de la 8-iso-PGF_{2α}, marqueur de peroxydation lipidique, a été observé dans les placentas et dans la circulation sanguine des femmes souffrant de la pré-éclampsie (pour une revue ³⁰⁹). Une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes telle que la glutathion peroxydase et la SOD est présente dans les placentas de femmes pré-éclamptiques ^{305,306}. De plus, les concentrations plasmatiques des vitamines E et C ainsi que de la β-carotène sont diminuées lors de la pré-éclampsie comparativement à la grossesse normale ^{311,323-325}. D'ailleurs, on a proposé de donner ces antioxydants (vitamine E et C) pendant la grossesse comme potentielle stratégie préventive au développement de la pré-éclampsie. Des études cliniques ont été lancées afin de déterminer si un traitement aux antioxydants diminue l'incidence de la pré-éclampsie. Certaines investigations utilisant des suppléments de vitamine E et C montrent une diminution des marqueurs de stress oxydatif ainsi que de l'incidence de la pré-éclampsie. Le groupe de Lucilla Poston, en 1999, a analysé les effets de la prise d'un supplément vitaminé au cours de la pré-éclampsie, sur les marqueurs plasmatiques d'une activation des cellules endothéliales vasculaires (PAI-1 ; *plasminogen activator inhibitor-1*) et de l'insuffisance placentaire (PAI-2) ainsi que sur l'incidence de la maladie. Ils ont démontré, chez 283 femmes à risque, que l'apport de vitamines (vit E ; 400IU/j) et C ; 1000mg/j) de façon quotidienne à partir des semaines 16- 22 de grossesse entraîne une diminution du ratio PAI-1/PAI-2 ce qui suggère une diminution de l'activation des cellules endothéliales ³²⁶. En 2002, ce même groupe a démontré que ce supplément vitaminé donné à un groupe de 79 femmes à risque induit une diminution de la concentration plasmatique de 8-epi-PGF_{2α}, marqueur de peroxydation lipidique, comparativement au groupe à faible risque de développer la pré-éclampsie (32 femmes) ³²⁷. Les auteurs concluent que l'augmentation de la consommation de vitamines E et C

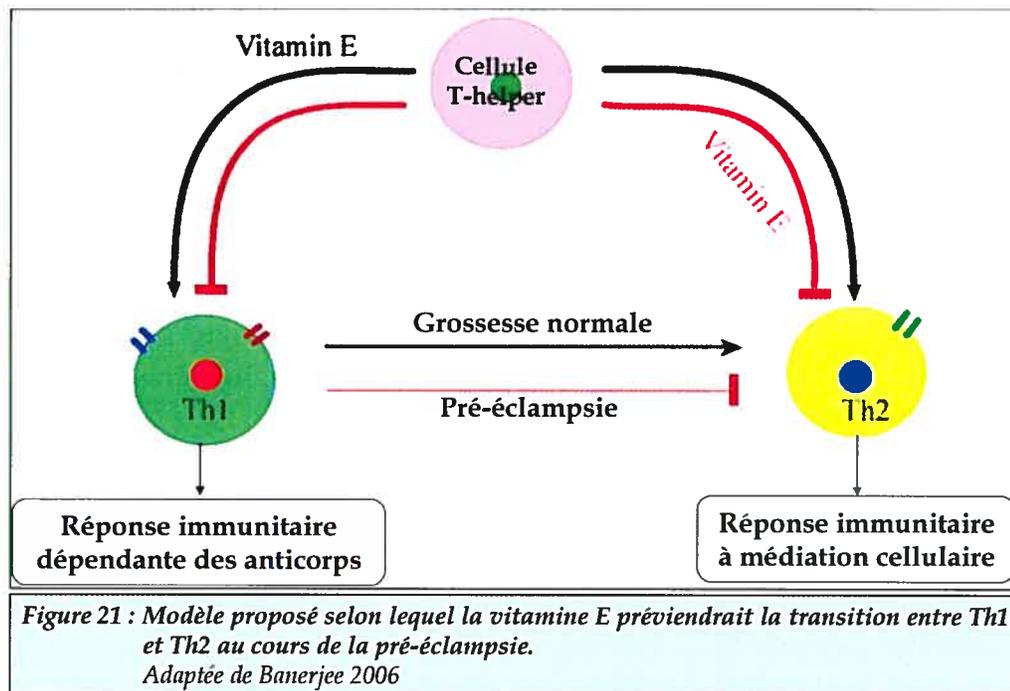
améliore le statut oxydatif au cours de la pré-éclampsie. Toutefois, l'utilisation de ces vitamines au cours de la pré-éclampsie reste controversée. Il a été démontré, par le groupe de Sibai, que le même supplément vitaminé utilisé précédemment ne change pas l'incidence de la pré-éclampsie (17,3%) dans un groupe de 52 femmes à risque comparativement au groupe recevant le placebo (18,8%)³²⁸. Le désaccord présent entre ces études semble due au nombre de patientes utilisées et à la nationalité des sujets. En fait, le groupe de Sibai conclut, qu'afin d'être valides, les études utilisant les suppléments vitaminés devraient contenir plus de 500 sujets. Tout récemment, le groupe de Poston a publié dans « The Lancet » une étude clinique nommée VIP (*Vitamins In Preeclampsia*) utilisant 2404 patientes à haut risque de développer la pré-éclampsie. Cette étude utilise les mêmes concentrations de vitamines que les dernières et le supplément est donné à partir du second trimestre jusqu'à terme³²⁹. Ils ont démontré que ce traitement ne diminue pas l'incidence de la pré-éclampsie (15% vs placebo 16%). Cette étude montre aussi qu'un plus grand nombre de femmes dans le groupe recevant le supplément vitaminé développent de l'hypertension gestationnelle et ont recouru à un traitement anti-hypertensif intraveineux, des stéroïdes anténataux ou du sulfate de magnésium. De plus, ils ont démontré une corrélation positive entre l'utilisation des antioxydants vitaminés et l'augmentation des naissances de bébés de faible poids dans le groupe de femmes à haut risque de développer la maladie. Bien que la mortalité des bébés soit plus élevée dans le groupe recevant le supplément vitaminé comparativement au groupe placebo, cette différence n'est pas significative. D'autres études cliniques ont été menées et celles-ci n'ont démontrées aucune amélioration du statut oxydatif chez les femmes préclamptiques³⁷⁰⁻³⁷¹. Suite à ces résultats, les différents auteurs contre-indiquent l'utilisation des vitamines E et C, aux concentrations utilisées dans l'étude, en prévention de la pré-éclampsie. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de bien définir les effets de tels suppléments.

Les vitamines C et E sont communément considérées comme des antioxydants bénéfiques pour la santé et leur utilisation est très prônée. Cependant, de plus en plus d'études démontrent que la vitamine E peut aussi agir comme un oxydant potentiel dans des conditions où un stress oxydatif est déjà présent. En effectuant son pouvoir antioxydant, la vitamine E oxydée devient le radical α -tocophérol, molécule oxydante

(voir figure 9 dans l'introduction). Généralement, la cascade impliquant la participation commune de la glutathion peroxydase, le glutathion et la vitamine C est capable de régénérer totalement le radical α -tocophérol en vitamine E. Cependant, dans des conditions où les composantes de cette cascade sont amoindris, tel que dans la pré-éclampsie ³³⁰, il est fort possible que ce processus soit compromis et entraîne la formation accrue du radical α -tocophérol. Il a été démontré que ce dernier est capable d'amplifier la peroxydation lipidique qui survient dans des suspensions de LDL (*low density lipoprotein*) plasmatiques déjà soumis à un environnement oxydatif ^{331,332}. De plus, il a récemment été démontré que la vitamine E, pourrait être responsable de la production d'oxygène singulet ³³³. Ce dernier étant une molécule très réactive pouvant altérée la fonction des protéines, des lipides et de l'ADN. Ainsi, le rôle potentiellement oxydant de la vitamine E lorsque donnée pendant la pré-éclampsie n'est pas à exclure.

Ces dernières années, il a été démontré que la vitamine E possédait des activités biologiques indépendantes de ses fonctions anti-oxydantes. Cependant, la distinction entre les fonctions anti-oxydantes et non-anti-oxydantes n'est pas claire. Le groupe de Banerjee, propose un modèle où la vitamine E aurait des effets néfastes sur la réponse immunitaire au cours de la pré-éclampsie ³³⁴. Les cytokines du système immunitaire produites par les lymphocytes sont regroupées en 2 catégories : Th1 et Th2. Les molécules du groupe Th1 regroupent, entre autres, le TNF- α , l'interféron- γ (INF- γ) et l'interleukine-12 tandis que celles appartenant au groupe Th2 sont l'interleukine-4 et -10. Généralement, les cytokines Th1 assurent une réponse immunitaire à médiation cellulaire tandis que la réponse aux Th2 est dépendante des complexes antigènes-anticorps (réponse humorale). La grossesse possède un caractère immunologique important puisque l'unité foeto-placentaire en développement produit ses propres antigènes (Ag) et est considérée comme une allogreffe. Ces Ag peuvent être reconnus par le système immunitaire de la mère comme du non-soi et engendrer un rejet. Au début de la grossesse, entre les semaines 8 et 12, la production par les trophoblastes de cytokines de la classe Th1 est à son maximum. Puis, vers le 2^{ème} trimestre, où l'établissement de la circulation foeto-maternelle définitive survient, une transition entre la production des médiateurs Th1 et Th2 s'effectue : Th2

devenant ainsi dominant. Cette migration semble s'effectuer via une activation de la protéine kinase C theta (PKC- θ). Ceci favoriserait la réponse immunitaire cellulaire et limiterait la réponse humorale face aux Ag foeto-placentaires ³³⁵. En plus d'effectuer un pouvoir anti-oxydant, il a été démontré que la vitamine E diminue la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires via une inhibition de la PKC- θ ³³⁶. Le groupe de Banerjee, propose un modèle où la vitamine E, lorsque donnée en prévention à des femmes à haut risque de développer la pré-éclampsie, pourrait empêcher la transition entre cette production de cytokines (figure 21) ³³⁴. Ainsi, un supplément de vitamine E favoriserait la production des médiateurs Th1 par l'entremise d'une inhibition de la PKC et diminuerait celle des Th2 dans les trophoblastes. Ce concept, est appuyé par des études dans des modèles animaux ainsi que dans des études cliniques chez l'humain. Par exemple, il a été démontré qu'un supplément de vitamine E (500ppm) pendant 8 semaines chez la souris infectée par le virus de l'influenza induit une augmentation de la production d'INF- γ (Th1) par les splénocytes ³³⁷. De même qu'un supplément de vitamine E (750mg) pendant 2 semaines induit la production de l'interleukine-2 et l'IFN- γ (Th1), tandis que celle de l'IL-10 (Th2) n'a pas été affectée chez des patients atteints de cancer colorectal ³³⁸. L'action non-oxydative de la vitamine E serait alors responsable de favoriser une plus grande réponse immunitaire face aux antigènes foeto-placentaires libérés dans la circulation maternelle. Ainsi, les auteurs suggèrent que cette vitamine serait à l'origine d'effets indésirables sur la maturation immunitaire foetale ainsi qu'au niveau de l'interaction foeto-maternelle nuisant au devenir de la progéniture.



Le stress oxydatif et ses conséquences sont, sans aucun doute, impliqués dans le développement de la pré-éclampsie. Cependant, les études cliniques portant sur l'utilisation des vitamines anti-oxydantes comme traitement préventif de la pré-éclampsie n'ont pas donné les effets escomptés. Les connaissances actuelles sur les mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans le développement de la pré-éclampsie étant encore limitées, des études fondamentales axées sur la compréhension de ceux-ci seraient nécessaires. Par exemple, bien définir l'implication du stress oxydatif dans la maladie : cause ou conséquence ?

Limitations des modèles animaux de pré-éclampsie

La pré-éclampsie est une condition qui survient spontanément seulement chez l'humain et quelques espèces de grands singes. La création de modèles animaux est donc essentielle pour en étudier les manifestations et en comprendre les mécanismes. Plusieurs de ces modèles ont été proposés toutefois, il est admis qu'aucun de ceux-ci ne présente parfaitement les caractéristiques de cette maladie. Le placenta semble être l'organe central dans le développement de la pré-éclampsie et le choix d'un bon modèle animal doit tenir compte de la spécificité du placenta humain. Le rôle endocrinien et la formation de cet

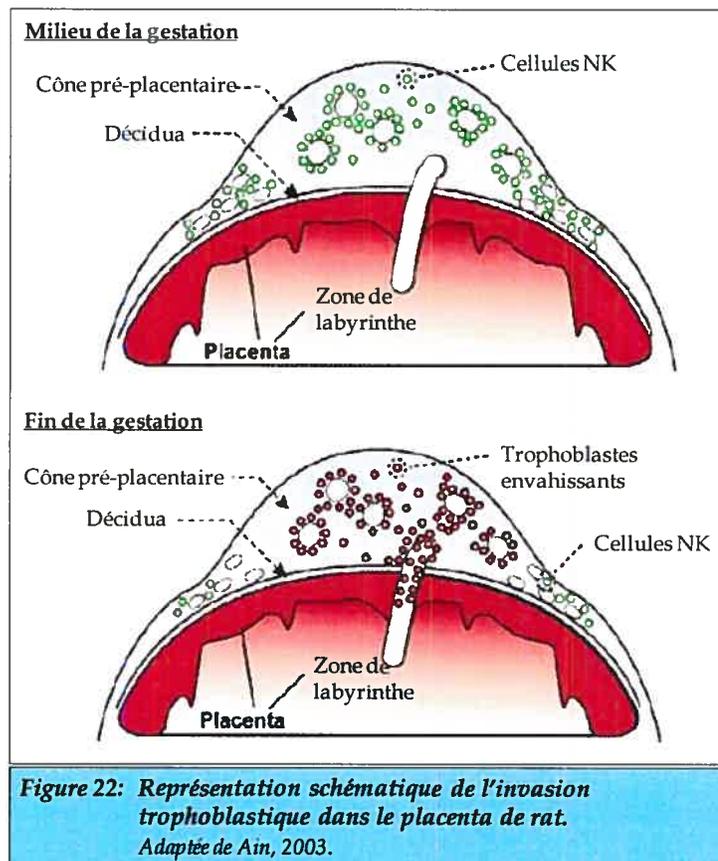
organe unique et fonctionnellement autonome différent quelque peu entre les espèces. Par exemple, le placenta humain produit et sécrète l'hormone hCG ²⁶⁴. Cette hormone ne semble toutefois pas produite par le placenta de rats ^{240,339}. De plus, son développement chez l'humain est caractérisé par une invasion massive et profonde des trophoblastes. Cette dernière n'est toutefois pas retrouvée chez toutes les espèces murines ²⁴⁵. Ainsi, une étude récente suggère que l'invasion trophoblastique profonde qui prend place chez le rat est comparable à celle chez l'humain. Toutefois, cette invasion profonde ne se produit pas chez la souris ²⁴⁵. De plus, le groupe de Caluwaerts démontre que les changements observés dans les artères spiralées chez la rate sont similaires à ceux rencontrés chez l'humain. Ainsi, ces études suggèrent que la rate gestante est un bon modèle pour étudier le développement placentaire et les maladies liées en corrélation avec l'humain. La création de modèles animaux reste difficile à exécuter et les données issues de ces modèles demandent une interprétation critique lorsqu'on tient compte de la spécificité placentaire rencontrée chez l'humain.

Perspectives

L'invasion trophoblastique lors du développement placentaire

L'invasion trophoblastique au sein de l'utérus est une caractéristique importante et essentielle lors du développement du placenta hémochorial. Cette invasion est présente chez plusieurs espèces dont l'humain, le rat et la souris ^{340,341}. Une hypothèse pour expliquer l'étiologie de la pré-éclampsie est un défaut de placentation. En effet, une altération au niveau de l'invasion trophoblastique peut entraîner une modification incomplète des artères spiralées maternelles. Ce phénomène a été associé au développement de maladies gestationnelles telles que la pré-éclampsie et des restrictions de croissance intra-utérine ³⁴². L'expression du TNF- α , cytokine inflammatoire, dans les cytotrophoblastes extravilloux chez l'humain suggère que cette molécule est impliquée dans l'invasion trophoblastique ³⁴³. De plus, il a été démontré qu'une concentration élevée (100ng/mL) de cette cytokine affecte la différenciation des trophoblastes du blastocyste de souris en culture ³⁴⁴. Aussi, il a été démontré que le TNF- α empêche la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques dans une matrice de collagène ^{340,345}. Nos études

démontrent une augmentation de l'expression de l'ARNm de cette cytokine dans les placentas de rates recevant un supplément sodique de 1.8% ³⁰⁷. Ainsi, ce résultat suggère qu'une altération au niveau de l'invasion trophoblastique pourrait être présente dans notre modèle animal et contribuer aux symptômes de la pré-éclampsie. Chez le rat, le signal contrôlant l'invasion trophoblastique est encore mal connu. Cependant, les lymphocytes NK semblent jouer un rôle important dans l'invasion trophoblastique chez la rate. Ces cellules sont présentes dans le cône pré-placentaire (voir figure 15 de l'introduction) puis, vers le 15^{ième} jour de gestation, elles commencent à disparaître par apoptose et sont progressivement remplacées par les trophoblastes envahissants (Figure 22) ³⁴⁰.



Le groupe d'Ain démontre qu'il existe une relation réciproque entre les cellules NK et les trophoblastes envahissants puisque ces derniers occupent les mêmes sites. Il a aussi été démontré que la synthèse du TNF- α est inhibée dans les cellules NK en culture lorsque

celles-ci entre en contact avec des trophoblastes ³⁴⁶. Il serait donc intéressant de vérifier la localisation des trophoblastes envahissants et des cellules NK dans les placentas de notre modèle animal afin de déterminer si une altération de l'invasion trophoblastique est présente.

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et ses récepteurs

Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est un facteur mitogénique pour les cellules endothéliales des artères et des veines ³⁴⁷. Il participe à l'angiogénèse et la vasculogénèse au niveau de plusieurs tissus ³⁴⁸. Le VEGF est aussi connu sous le nom de facteur de perméabilité vasculaire. En effet, il a été démontré qu'il était capable d'induire une fenestration des cellules endothéliales dans les capillaires du muscle crémaster chez le rat, ce qui permet l'extravasation des protéines ³⁴⁹. Les actions du VEGF sont assurées par sa liaison à des récepteurs membranaires (VEGFR) liés aux tyrosines kinases (pour une revue ³⁴⁸). Un récepteur soluble a aussi été caractérisé. Le VEGFRs est aussi connu sous le nom de sFlt1-1 (*soluble receptor fms-like tyrosine kinase*). Ce récepteur capture le VEGF et empêche ses actions cellulaires. Dans le rein, la présence d'une protéinurie traduit habituellement une atteinte des structures du glomérule rénal. De plus, il a été démontré qu'une corrélation positive existe entre l'augmentation de l'expression du VEGF et le développement d'une protéinurie en condition pathologique telle que de diabète ³⁵⁰. Au cours de la pré-éclampsie, le site majeur des injures rénales semble être la cellule endothéliale glomérulaire. Il a été démontré, dans des biopsies de reins provenant de femmes pré-éclamptiques, qu'une réduction de la densité de l'endothélium fenestré des capillaires glomérulaires est présente ³⁵¹. Aussi, il a été montré que la concentration plasmatique de sFlt1-1 était augmentée chez les femmes pré-éclamptiques comparativement aux femmes normotensives ³⁵². De plus, on observe aussi la présence de dépôt fibrineux sous-endothélial à ce niveau. Une récente étude suggère un rôle du VEGF dans le développement de néphropathie associée à la pré-éclampsie ³⁵³. Cette investigation démontre que dans un groupe de patientes pré-éclamptiques présentant une néphropathie, l'expression de l'ARNm et de la protéine du VEGF dans des biopsies rénales est augmentée et corrèle avec la protéinurie et les lésions vasculaires observées ³⁵³.

Nos études démontrent qu'un supplément sodique entraîne une réponse inappropriée du rein face à la gestation menant à une protéinurie. Afin d'élargir la compréhension des mécanismes qui surviennent lors de la prise d'un supplément sodique pendant la grossesse, nous proposons de caractériser l'expression du VEGF ainsi que de ses récepteurs dans le rein de nos animaux. Une augmentation de son expression pourrait être responsable d'une augmentation de la fenestration des cellules endothéliales glomérulaires et ainsi, de la protéinurie que nous observons. Des études utilisant la microscopie électronique pourraient aussi être effectuées et permettraient de visualiser et d'analyser l'intégrité de la membrane de ces cellules.

Les travaux effectués dans notre laboratoire démontrent qu'un supplément sodique (1.8%) induit une diminution du diamètre des artères utérines ³⁰², du poids des placentas ainsi qu'une restriction de croissance intrautérine ²¹⁶. De plus, les résultats présentés dans cette thèse montrent la présence d'un stress oxydatif placentaire ³⁰⁷. La réduction du diamètre des artères utérines suggère une diminution possible de la perfusion placentaire et donc de l'apport en oxygène au fœtus. Chez la femme, avant la 9^{ème} semaine de grossesse, la tension en oxygène dans le placenta est relativement faible (20mmHg). Par la suite, celle-ci augmente à des niveaux de l'ordre de 55mmHg afin de répondre à la demande croissante du fœtus ³⁵⁴. Cette transition essentielle coïncide au moment où les cytotrophoblastes deviennent envahissants et érodent les artères maternelles. De plus, il semble que ces cellules soient sensibles à de faible concentration d'oxygène. En effet, il a été démontré qu'un milieu hypoxique empêche la différenciation des cytotrophoblastes en un phénotype envahissant ³⁵⁵.

Le VEGF stimule la prolifération des trophoblastes ³⁵⁶. De faibles concentrations du VEGF ou une augmentation de la production d'antagonistes tels que la forme soluble du récepteur ont été proposées comme médiateurs possibles de la pré-éclampsie ³⁵². Comparativement à la grossesse normale, le récepteur sFlt1-1 est produit en abondance par le placenta de femmes pré-éclamptiques et est aussi retrouvé dans la circulation sanguine ^{357,358}. Un mécanisme a été proposé pour expliquer cette hausse de sFlt1-1 au cours de la pré-éclampsie. Il a été démontré qu'une diminution de l'oxygène (hypoxie) de

20 à 2% induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de ce récepteur dans des cultures de cytotrophoblastes ³⁵⁹. De plus, cette hypoxie entraîne la production accrue du VEGF dans ces cellules. Les auteurs suggèrent que la production excessive de sFlt1-1 au cours de la pré-éclampsie pourrait être la conséquence d'une hypoxie placentaire. Cette condition pouvant conduire à une altération dans les propriétés envahissantes des cytotrophoblastes extra-villeux. En fait, le groupe de Ahmad a démontré qu'en pré-incubant des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*HUVEC*; *human umbilical vein endothelial cells*) avec le récepteur sFlt1-1, la migration des cellules HUVEC est significativement diminuée ³⁵⁷. On associe aussi l'hypoxie avec la formation de ROS. Li et ses collègues ont démontré que des trophoblastes provenant de placenta à terme normaux cultivés dans des conditions d'hypoxie (2% O₂) présentent une augmentation de l'expression de l'ARNm du sFlt1-1 et de la concentration du VEGF, ce qui corrèle avec une élévation de la peroxydation lipidique ³⁶⁰. Mis ensemble, ces études proposent que l'hypoxie placentaire présente lors de la pré-éclampsie induit une altération de la régulation du VEGF et du statut oxydant menant à un défaut de placentation et une dysfonction placentaire à l'interface foeto-maternelle.

Dans notre modèle animal, le stress oxydatif présent au niveau placentaire ainsi que la diminution du diamètre des artères utérines suggèrent la présence d'un environnement hypoxique. Puisque l'hypoxie est un inducteur majeur du VEGF, il serait intéressant de l'expression et la synthèse de celui-ci de même que du sFlt1-1 à l'interface foeto-maternelle.

Les récepteurs aux minéralocorticoïdes

Nous avons démontré, dans notre modèle animal de pré-éclampsie expérimental, que les rates gestantes soumises au supplément sodique 1.8% ont une augmentation de la concentration de corticostérone ainsi qu'une diminution de l'aldostérone plasmatique ²¹⁶. Bien que le système rénine-angiotensine-aldostérone soit diminué, ces rates ont une hausse de la pression artérielle.

Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) possède une affinité pour une variété de stéroïdes tels que le cortisol, la corticostérone (glucocorticoïde chez le rat), la déoxycorticostérone, la progestérone et l'aldostérone ³⁶¹. Le cortisol et la corticostérone possèdent la même affinité pour les MR que l'aldostérone. En état physiologique, la concentration intracellulaire de glucocorticoïdes actifs est de l'ordre de 10 fois plus importante que celle de l'aldostérone. Se faisant, la majorité de MR peuvent être occupés par les glucocorticoïdes. Ce complexe glucocorticoïde-MR peut être activé par divers facteurs. Il existe donc un système enzymatique afin de favoriser la liaison de l'aldostérone sur son récepteur. L'enzyme 11- β hydroxystéroïde-déhydrogénase de type 2 (11- β HSD2) est responsable de l'inactivation du cortisol en cortisone chez l'humain ou de la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone chez le rat ³⁶². Ces deux dérivés sont des métabolites inactifs ayant une affinité négligeable pour les MR. Ce système protège donc les MR d'un excès de glucocorticoïdes. Dans des cas tel que la pré-éclampsie, où l'activité de la 11- β HSD2 est diminuée dans les placentas et la concentration plasmatique du cortisol est augmentée, le complexe cortisol-MR peut être activé par certain facteurs et mimer les effets de l'aldostérone ^{363,364}. Le statut rédox cellulaire serait un important déterminant de l'activation de ce complexe. Il a été démontré que des rats Dahl-sensitive (DS) sous diète riche en sodium (8% pendant 7 semaines consécutives) développent une hypertension accompagnée d'une diminution de l'aldostérone plasmatique ³⁶⁵. Une augmentation de la production d'anion superoxyde ainsi qu'une diminution du ratio GSH/GSSG sont aussi observées au niveau du ventricule gauche, suggérant la présence d'un stress oxydatif. En donnant l'eplerenone (inhibiteur des MR ; 30 ou 100ng par Kg) pour une durée de 19 semaines, une atténuation de la fibrose, de l'hypertrophie cardiaque ainsi que du stress oxydatif a été observée dans ce modèle. Les auteurs suggèrent donc que le complexe corticostérone-MR pourrait être à l'origine des modifications cardiovasculaires et ce par l'entremise d'un stress oxydatif. De par ces études, il serait intéressant de vérifier l'expression et l'activité de la 11 β -HSD2 de même que l'implication de la liaison glucocorticoïdes-MR au sein des différents organes étudiés dans notre modèle animal. Ceci nous donnera une image précise du rôle des MR dans la gestation et dans des cas pathologiques tel que la pré-éclampsie expérimentale.

Conclusion

Même encore aujourd'hui, l'étiologie de la pré-éclampsie reste encore indéfinie avec en son centre, le placenta. Certaines hypothèses ont été proposées pour en expliquer la cause telle que la relâche, par le placenta, de microfragments ou de molécules, telles que le TNF- α et les lipides peroxydés. Lors du développement du placenta chez les femmes pré-éclampsiques, l'invasion des artères spiralées est incomplète et ces dernières demeurent sensibles aux agents vasoconstricteurs^{366,367}. Cette placentation anormale impliquerait le VEGF, et serait, en partie responsable d'une hypoxie tissulaire ce qui entraînerait la production de ROS et de RNOS^{368,369}. À ce stade d'étude, aucune donnée n'est en mesure de déterminer si le stress oxydatif est la cause ou la conséquence de cette maladie. Toutefois, le véritable défi est de comprendre comment les mécanismes physiologiques et moléculaires qui surviennent au cours de la pré-éclampsie entraînent ces conséquences néfastes pour la mère et le fœtus.

L'étude des manifestations qui surviennent au cours de la grossesse et de ses pathologies est possible grâce à l'élaboration de modèles animaux tels que celui que nous avons développé au cours de mes études. Mes travaux, en accord avec la littérature, démontrent que la gestation elle-même est une condition oxydante. De plus, les résultats présentés dans cette thèse indiquent qu'un nouvel équilibre physiologique et cellulaire est mis en place au cours de la grossesse, et que celui-ci peut être très sensible à une insulte maternelle. Ceci pouvant conduire à une réponse inappropriée de la grossesse et affecter la croissance foetale. De par les résultats obtenus au cours de mes études, nous considérons que notre modèle animal est un outil précieux pour l'étude des mécanismes impliqués lors de la grossesse et de la pré-éclampsie. De plus, ce modèle nous permettra de faire un suivi tout au long de la gestation afin de vérifier à quel moment le supplément sodique (insulte maternelle chez la rate) cause les atteintes que nous avons observées. Nous pourrions ainsi déterminer, quand, pendant la grossesse les mécanismes cellulaires sont différents entre les rates gestantes recevant un supplément sodique comparativement aux rates gestantes témoins.

Bibliographie

1. Smith H.W. *From fish to philosopher*. Boston (1953).
2. Gougoux A *La physiologie du rein et des liquides corporels*. Montréal (1999).
3. Tortora GJ & Grabowski SR *Tortora Grabowski Principes d'anatomie et de physiologie*. John Wiley & Sons Inc (ed.), pp. 991-1029 (les éditions du nouveau pédagogique, Canada, 2001).
4. Zimanyi, M. A. *et al.* A developmental nephron deficit in rats is associated with increased susceptibility to a secondary renal injury due to advanced glycation end-products. *Diabetologia* 49, 801-810 (2006).
5. Feraille, E. & Doucet, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* 81, 345-418 (2001).
6. Maunsbach, A. B. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 16, 239-258 (1966).
7. Biemesderfer, D. *et al.* NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol* 265, F736-F742 (1993).
8. Ciampolillo, F. *et al.* Cell-specific expression of amiloride-sensitive, Na⁽⁺⁾-conducting ion channels in the kidney. *Am. J. Physiol* 271, C1303-C1315 (1996).
9. Gormley, K., Dong, Y. & Sagnella, G. A. Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem. J.* 371, 1-14 (2003).
10. Wallace, D. P., Rome, L. A., Sullivan, L. P. & Grantham, J. J. cAMP-dependent fluid secretion in rat inner medullary collecting ducts. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 280, F1019-F1029 (2001).
11. Harris, R. C. *et al.* Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest* 94, 2504-2510 (1994).
12. Nasrallah, R. & Hebert, R. L. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 289, F235-F246 (2005).
13. Phillips, M. I. & Schmidt-Ott, K. M. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci.* 14, 271-274 (1999).
14. Carey, R. M. & Siragy, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.* 24, 261-271 (2003).

15. Kingdom, J. C., McQueen, J., Connell, J. M. & Whittle, M. J. Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 100, 476-482 (1993).
16. Petit, A. *et al.* Angiotensin II stimulates both inositol phosphate production and human placental lactogen release from human trophoblastic cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 69, 280-286 (1989).
17. Petit, A. *et al.* An islet-activating protein-sensitive G-protein is involved in dopamine inhibition of both angiotensin-stimulated inositol phosphate production and human placental lactogen release in human trophoblastic cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 71, 1573-1580 (1990).
18. Bottari, S. P., De, G. M., Steckelings, U. M. & Levens, N. R. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.* 14, 123-171 (1993).
19. Chassagne, C., Servant, M. J. & Meloche, S. Recepteur de l'angiotensine II: Rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal. *Medecine/Sciences* 12, 1351-1360 (1996).
20. Horiuchi, M., Akishita, M. & Dzau, V. J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33, 613-621 (1999).
21. De Gasparo M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415-472 (2000).
22. Hill-Kapturczak, N. *et al.* Angiotensin II-stimulated nitric oxide release from porcine pulmonary endothelium is mediated by angiotensin IV. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 481-491 (1999).
23. Handa, R. K. Biphasic actions of angiotensin IV on renal blood flow in the rat. *Regul. Pept.* (2006).
24. Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. & White, P. C. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J. Biol. Chem.* 264, 20961-20967 (1989).
25. Hatakeyama, H. *et al.* Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269, 24316-24320 (1994).
26. Takeda, Y. *et al.* Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 29, 45-48 (1997).

27. Gomez-Sanchez, C. E. *et al.* Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 138, 3369-3373 (1997).
28. Takeda, Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. *Mol. Cell Endocrinol.* 217, 75-79 (2004).
29. Knepper, M. A., Kim, G. H. & Masilamani, S. Renal tubule sodium transporter abundance profiling in rat kidney: response to aldosterone and variations in NaCl intake. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 562-569 (2003).
30. Williams, J. S. & Williams, G. H. 50th anniversary of aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 2364-2372 (2003).
31. Wehling, M., Eisen, C. & Christ, M. Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids. *Mol. Cell Endocrinol.* 90, C5-C9 (1992).
32. Barbato, J. C., Mulrow, P. J., Shapiro, J. I. & Franco-Saenz, R. Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. *Hypertension* 40, 130-135 (2002).
33. Boldyreff, B. & Wehling, M. Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 375-381 (2003).
34. Stevens A & Lowe J *Histologie*. Gower medical publishing, Québec (1993).
35. Tortora GJ & Grabowski SR *Principes d'anatomie et de physiologie*. les éditions du renouveau pédagogique, Canada (2001).
36. Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD & Scrimgeour KG *Principes de biochimie*. Neil Patterson, Bruxelles (1994).
37. KREBS, H. A. The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect. Series* 44, 165-199 (1948).
38. KREBS, H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14, 154-170 (1970).
39. Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B. & White, C. W. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13399-13405 (1995).
40. Hausladen, A. & Fridovich, I. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* 269, 29405-29408 (1994).
41. Gardner, P. R. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 349, 9-23 (2002).

42. Gardner, P. R. & Fridovich, I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J. Biol. Chem.* 266, 19328-19333 (1991).
43. Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van, H. B. & Orrenius, S. ROLE of MITOCHONDRIA in TOXIC OXIDATIVE STRESS. *Mol. Interv.* 5, 94-111 (2005).
44. Keyer, K. & Imlay, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13635-13640 (1996).
45. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376 (1980).
46. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526 (1987).
47. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615 (2001).
48. Stamler, J. S. & Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 81, 209-237 (2001).
49. Shaul, P. W. *et al.* Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271, 6518-6522 (1996).
50. Herrera, M. & Garvin, J. L. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. *Hypertension* 45, 1062-1067 (2005).
51. Dussaule, J. C. & Chatziantoniou, C. [Role of nitric oxide in the regulation of arterial pressure and renal function]. *Presse Med.* 25, 1789-1793 (1996).
52. Gabbai, F. B., Garcia, G. E., Blantz, R. C. & De, N. L. Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 24, 3-18 (1995).
53. Balligand, J. L. & Cannon, P. J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1846-1858 (1997).
54. Schiessl, B. *et al.* Expression of endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and estrogen receptors alpha and beta in placental tissue of normal, preeclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1441-1449 (2005).

55. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. & Venema, R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522-18525 (1997).
56. Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. & Michel, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272, 15583-15586 (1997).
57. Garcia-Cardena, G. *et al.* Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824 (1998).
58. Kingwell, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 14, 1685-1696 (2000).
59. Sexton, A. J., Loesch, A., Turmaine, M., Miah, S. & Burnstock, G. Nitric oxide and human umbilical vessels: pharmacological and immunohistochemical studies. *Placenta* 16, 277-288 (1995).
60. Al-Hijji, J., Andolf, E., Laurini, R. & Batra, S. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 51 (2003).
61. Komeima, K., Hayashi, Y., Naito, Y. & Watanabe, Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275, 28139-28143 (2000).
62. Bender, A. T. *et al.* Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 1472-1478 (1999).
63. Perreault, M. & Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* 7, 1138-1143 (2001).
64. COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* 129, 4-10 (2002).
65. Trajkovic, V. Modulation of inducible nitric oxide synthase activation by immunosuppressive drugs. *Curr. Drug Metab* 2, 315-329 (2001).
66. Purcell, T. L., Buhimschi, I. A., Given, R., Chwalisz, K. & Garfield, R. E. Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal-maternal interface and decreases prior to labour. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 485-491 (1997).

67. Casado, M. *et al.* Expression of the calcium-independent cytokine-inducible (iNOS) isoform of nitric oxide synthase in rat placenta. *Biochem. J.* 324 (Pt 1), 201-207 (1997).
68. McDonald, L. J. & Murad, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 1-6 (1996).
69. Schmidt, H. H. & Walter, U. NO at work. *Cell* 78, 919-925 (1994).
70. Dumont, Y., D'Amours, M., Lebel, M. & Lariviere, R. Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16, 746-754 (2001).
71. Govers, R. & Rabelink, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 280, F193-F206 (2001).
72. Sayago, C. M. & Beierwaltes, W. H. Nitric oxide synthase and cGMP-mediated stimulation of renin secretion. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 281, R1146-R1151 (2001).
73. Karatinos, J., Rosse, R. B. & Deutsch, S. I. The nitric oxide pathway: potential implications for treatment of neuropsychiatric disorders. *Clin. Neuropharmacol.* 18, 482-499 (1995).
74. Gryglewski, R. J., Palmer, R. M. & Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-456 (1986).
75. Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Surette, M. E., Triggiani, M. & Winkler, J. D. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 1-15 (1996).
76. Shen, R. F. & Tai, H. H. Thromboxanes: synthase and receptors. *J. Biomed. Sci.* 5, 153-172 (1998).
77. Smith, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol* 263, F181-F191 (1992).
78. DuBois, R. N., Radhika, A., Reddy, B. S. & Entingh, A. J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 110, 1259-1262 (1996).
79. Lim, H. *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91, 197-208 (1997).
80. Johnson MH & Everitt BJ *Reproduction*. Blackwell Sciences Limited, Espagne (2002).

81. Walsh, S. W., Vaughan, J. E., Wang, Y. & Roberts, L. J. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J.* 14, 1289-1296 (2000).
82. Walsh, S. W. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 152, 335-340 (1985).
83. Oudot, F., Grynberg, A. & Sergiel, J. P. Eicosanoid synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation, and polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol* 268, H308-H315 (1995).
84. Murakami, M. & Kudo, I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr. Pharm. Des* 12, 943-954 (2006).
85. Walsh, S. W., Behr, M. J. & Allen, N. H. Placental prostacyclin production in normal and toxemic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151, 110-115 (1985).
86. Lim, H. & Dey, S. K. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 143, 3207-3210 (2002).
87. Moncada, S. Prostacyclin and arterial wall biology. *Arteriosclerosis* 2, 193-207 (1982).
88. Sobal, G. & Sinzinger, H. Prostaglandins and lipid modification. *Curr. Pharm. Des* 7, 461-474 (2001).
89. Kennedy, C. R. *et al.* Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat. Med.* 5, 217-220 (1999).
90. Hanasaki, K., Nakano, T. & Arita, H. Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2535-2542 (1990).
91. Ali, S., Davis, M. G., Becker, M. W. & Dorn, G. W. Thromboxane A2 stimulates vascular smooth muscle hypertrophy by up-regulating the synthesis and release of endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 268, 17397-17403 (1993).
92. Mestel, F. *et al.* Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase. *Lancet* 1, 157 (1980).
93. Hirata, T. *et al.* Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J. Clin. Invest* 94, 1662-1667 (1994).
94. FitzGerald, D. J., Rocki, W., Murray, R., Mayo, G. & FitzGerald, G. A. Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 335, 751-754 (1990).

95. Farrukh, I. S., Michael, J. R., Summer, W. R., Adkinson, N. F., Jr. & Gurtner, G. H. Thromboxane-induced pulmonary vasoconstriction: involvement of calcium. *J. Appl. Physiol* 58, 34-44 (1985).
96. Donadio, J. V., Jr. *et al.* Membranoproliferative glomerulonephritis. A prospective clinical trial of platelet-inhibitor therapy. *N. Engl. J. Med.* 310, 1421-1426 (1984).
97. Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 2994-2998 (1975).
98. Oates, J. A. *et al.* Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A₂ formation (1). *N. Engl. J. Med.* 319, 689-698 (1988).
99. Walsh, S. W. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 152, 335-340 (1985).
100. Nicola, N. A. Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells* 12 Suppl 1, 3-12 (1994).
101. Idriss, H. T. & Naismith, J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50, 184-195 (2000).
102. Bazzoni, F. & Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334, 1717-1725 (1996).
103. Liu, Z. G. & Han, J. Cellular responses to tumor necrosis factor. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 79-90 (2001).
104. Ferdinandy, P., Danial, H., Ambrus, I., Rothery, R. A. & Schulz, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ. Res.* 87, 241-247 (2000).
105. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142 (1991).
106. Bulotta, S., Barsacchi, R., Rotiroti, D., Borgese, N. & Clementi, E. Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha. A novel feedback mechanism regulating cell death. *J. Biol. Chem.* 276, 6529-6536 (2001).
107. Spyridopoulos, I. *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 1321-1330 (1997).
108. Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. & Grotendorst, G. R. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular

- endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell Biol.* 114, 1285-1294 (1991).
109. Wyatt, S. M. *et al.* The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta* 26, 372-379 (2005).
 110. Frazier, K. S., Paredes, A., Dube, P. & Styer, E. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation. *Vet. Pathol.* 37, 328-335 (2000).
 111. Iwanciw, D., Rehm, M., Porst, M. & Goppelt-Struebe, M. Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1782-1787 (2003).
 112. Ohnishi, H. *et al.* Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 2411-2422 (1998).
 113. Leask, A., Denton, C. P. & Abraham, D. J. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J. Invest Dermatol.* 122, 1-6 (2004).
 114. Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. & Grotendorst, G. R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest Dermatol.* 107, 404-411 (1996).
 115. Kireeva, M. L. *et al.* Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp. Cell Res.* 233, 63-77 (1997).
 116. Hishikawa, K. *et al.* Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 100, 2108-2112 (1999).
 117. Griffin JE & Ojeda SR *Textbook of endocrine physiology.* Oxford University, New York (2000).
 118. Charo, I. F. & Taubman, M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* 95, 858-866 (2004).
 119. Yla-Herttuala, S. *et al.* Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 5252-5256 (1991).

120. Viedt, C. *et al.* MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1534-1547 (2002).
121. Rovin, B. H., Doe, N. & Tan, L. C. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.* 27, 640-646 (1996).
122. Zhou, L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ. Res.* 98, 1177-1185 (2006).
123. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724 (1994).
124. Cathcart, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 23-28 (2004).
125. Gutteridge, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 19, 141-158 (1993).
126. Meng, S., Roberts, L. J., Cason, G. W., Curry, T. S. & Manning, R. D., Jr. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 283, R732-R738 (2002).
127. Lenda, D. M., Sauls, B. A. & Boegehold, M. A. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H7-H14 (2000).
128. Kitiyakara, C. *et al.* Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2775-2782 (2003).
129. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1620-1624 (1990).
130. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 841-859 (2002).
131. Bourdon, E. & Blache, D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid. Redox. Signal.* 3, 293-311 (2001).
132. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84 (2007).

133. Griending, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B. & Ushio-Fukai, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2175-2183 (2000).
134. Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83-95 (1999).
135. Morrow, J. D. *et al.* A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 9383-9387 (1990).
136. Morrow, J. D. & Roberts, L. J. Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 195-200 (1991).
137. Hoffman, S. W., Moore, S. & Ellis, E. F. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* 28, 844-849 (1997).
138. Fukunaga, M., Yura, T. & Badr, K. F. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF₂ alpha, an F₂-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 Suppl 3, S51-S52 (1995).
139. Beckman, J. S. *et al.* Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 438-445 (1992).
140. Ischiropoulos, H. *et al.* Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 431-437 (1992).
141. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. & Beckman, J. S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 834-842 (1992).
142. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790-796 (2002).
143. www.granddictionnaire.com. 2006.
Ref Type: Internet Communication
144. Bendich, A. & Olson, J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 3, 1927-1932 (1989).
145. Brigelius-Flohe, R. & Traber, M. G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13, 1145-1155 (1999).

146. Duarte, T. L. & Lunec, J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic. Res.* 39, 671-686 (2005).
147. Lomaestro, B. M. & Malone, M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann. Pharmacother.* 29, 1263-1273 (1995).
148. Dickinson, D. A. & Forman, H. J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 488-504 (2002).
149. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1-8 (1990).
150. Ganafa, A. A. *et al.* Acute inhibition of glutathione biosynthesis alters endothelial function and blood pressure in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 454, 217-223 (2002).
151. Vaziri, N. D., Wang, X. Q., Oveisi, F. & Rad, B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 36, 142-146 (2000).
152. Mates, J. M., Perez-Gomez, C. & Nunez, d. C., I Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603 (1999).
153. Forsberg, L., de, F. U. & Morgenstern, R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 84-93 (2001).
154. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257 (1972).
155. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449 (1995).
156. Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. & David, C. N. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.* 9, 959-962 (1999).
157. Wood, W. *et al.* Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245-5252 (2000).
158. Straszewski-Chavez, S. L., Abrahams, V. M. & Mor, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr. Rev.* 26, 877-897 (2005).
159. Abrahams, V. M., Straszewski-Chavez, S. L., Guller, S. & Mor, G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 55-63 (2004).

160. Hedger, M. P. & Meinhardt, A. Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58, 1-26 (2003).
161. Weil, M., Raff, M. C. & Braga, V. M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.* 9, 361-364 (1999).
162. Follezou, J. Y., Emerit, J. & Bricaire, F. [Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis]. *Presse Med.* 28, 1661-1666 (1999).
163. Ye, J. *et al.* Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 34974-34980 (1999).
164. Ziegler, U. & Groscurth, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 19, 124-128 (2004).
165. Fadok, V. A., de, C. A., Daleke, D. L., Henson, P. M. & Bratton, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 1071-1077 (2001).
166. Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 581-586 (1994).
167. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652 (1993).
168. Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676 (1994).
169. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413 (1997).
170. Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442 (1988).
171. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240 (1993).
172. Cory, S., Huang, D. C. & Adams, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607 (2003).
173. Droin, N. M. & Green, D. R. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 179-188 (2004).

174. Jamnicki-Abegg, M. *et al.* Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. *Anesthesiology* 103, 1006-1014 (2005).
175. Ross, A. J. *et al.* Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat. Genet.* 18, 251-256 (1998).
176. Gonzalez-Garcia, M. *et al.* bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4304-4308 (1995).
177. Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83-94 (2004).
178. Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. & Hsueh, A. J. Bok is a proapoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12401-12406 (1997).
179. Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H. & Youle, R. J. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1265-1276 (2001).
180. Mikhailov, V. *et al.* Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 278, 5367-5376 (2003).
181. Zong, W. X. *et al.* Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59-69 (2003).
182. Bouillet, P. & Strasser, A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.* 115, 1567-1574 (2002).
183. Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L. C., Strasser, A. & Adams, J. M. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell* 1, 645-653 (2001).
184. Boyce, M., Degtarev, A. & Yuan, J. Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death. Differ.* 11, 29-37 (2004).
185. Koenig, U., Eckhart, L. & Tschachler, E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1150-1154 (2001).
186. Lamkanfi, M., Kalai, M. & Vandenabeele, P. Caspase-12: an overview. *Cell Death. Differ.* 11, 365-368 (2004).

187. Chien, A. J., Presland, R. B. & Kuechle, M. K. Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 911-917 (2002).
188. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459-470 (2002).
189. Mikolajczyk, J., Scott, F. L., Krajewski, S., Sutherlin, D. P. & Salvesen, G. S. Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry* 43, 10560-10569 (2004).
190. Duvekot, J. J. & Peeters, L. L. Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 49, 830-839 (1994).
191. Lund, C. J. & Donovan, J. C. Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 98, 394-403 (1967).
192. Chesley, L. C. Plasma and red cell volumes during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 112, 440-450 (1972).
193. Clark, S. L. *et al.* Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 1439-1442 (1989).
194. Robson, S. C., Hunter, S., Boys, R. J. & Dunlop, W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am. J. Physiol* 256, H1060-H1065 (1989).
195. Barron, W. M. Water metabolism and vasopressin secretion during pregnancy. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1, 853-871 (1987).
196. Roy-Clavel, E., Picard, S., St Louis, J. & Brochu, M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 608-613 (1999).
197. Linke, A., Li, W., Huang, H., Wang, Z. & Hintze, T. H. Role of cardiac eNOS expression during pregnancy in the coupling of myocardial oxygen consumption to cardiac work. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 283, H1208-H1214 (2002).
198. de Rijk, E. P., van Esch, E. & Flik, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol. Pathol.* 30, 271-282 (2002).
199. McLaughlin, M. K. & Keve, T. M. Pregnancy-induced changes in resistance blood vessels. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155, 1296-1299 (1986).
200. Parent, A., Schiffrin, E. L. & St Louis, J. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 229-234 (1990).

201. St Louis, J. & Sicotte, B. Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 684-692 (1992).
202. Anumba, D. O., Robson, S. C., Boys, R. J. & Ford, G. A. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am. J. Physiol* 277, H848-H854 (1999).
203. Moutquin, J. M. *et al.* [Prospective study of arterial pressure during pregnancy. Prediction of hypertensive complications]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 11, 833-837 (1982).
204. St Louis, J. & Massicotte, G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 37, 1351-1357 (1985).
205. Wilson, M. *et al.* Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am. J. Med.* 68, 97-104 (1980).
206. Talledo, O. E. Renin-angiotensin system in normal and toxemic pregnancies. II. Inactivation of angiotensin in normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 97, 571-572 (1967).
207. Simaan, M., Cadorette, C., Poterek, M., St Louis, J. & Brochu, M. Calcium channels contribute to the decrease in blood pressure of pregnant rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 282, H665-H671 (2002).
208. Hefler, L. A., Tempfer, C. B., Moreno, R. M., O'Brien, W. E. & Gregg, A. R. Endothelial-derived nitric oxide and angiotensinogen: blood pressure and metabolism during mouse pregnancy. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 280, R174-R182 (2001).
209. Bedford, C. A., Challis, J. R., Harrison, F. A. & Heap, R. B. The role of oestrogens and progesterone in the onset of parturition in various species. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 16, Suppl-23 (1972).
210. Sherwood, O. D., Crnekovic, V. E., Gordon, W. L. & Rutherford, J. E. Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 107, 691-698 (1980).
211. Davidson, J. M. Overview: Kidney function in pregnant women. *Am. J. Kidney Dis.* 9, 248-252 (1987).
212. Baylis, C. Glomerular filtration and volume regulation in gravid animal models. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1, 789-813 (1987).
213. Davison, J. M. & Dunlop, W. Renal hemodynamics and tubular function normal human pregnancy. *Kidney Int.* 18, 152-161 (1980).

214. Garland, H. O. & Green, R. Micropuncture study of changes in glomerular filtration and ion and water handling by the rat kidney during pregnancy. *J. Physiol* 329, 389-409 (1982).
215. Alexander, E. A., Churchill, S. & Bengel, H. H. Renal hemodynamics and volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Kidney Int.* 18, 173-178 (1980).
216. Beausejour, A., Auger, K., St Louis, J. & Brochu, M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H375-H383 (2003).
217. Ianosi-Irimie, M. *et al.* A rat model of preeclampsia. *Clin. Exp. Hypertens.* 27, 605-617 (2005).
218. Kassab, S. E., bu-Hijleh, M. F., Al-Shaikh, H. B. & Nagalla, D. S. Hyperhomocysteinemia in pregnant rats: effects on arterial pressure, kidneys and fetal growth. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 122, 177-181 (2005).
219. Baylis, C. The determinants of renal hemodynamics in pregnancy. *Am. J. Kidney Dis.* 9, 260-264 (1987).
220. Sullivan, C. A. & Martin, J. N., Jr. Sodium and pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* 37, 558-573 (1994).
221. Atherton, J. C. *et al.* Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J. Physiol* 330, 81-93 (1982).
222. Barron, W. M. & Lindheimer, M. D. Renal sodium and water handling in pregnancy. *Obstet. Gynecol. Annu.* 13, 35-69 (1984).
223. Pedersen, E. B., Johannesen, P., Rasmussen, A. B. & Danielsen, H. The osmoregulatory system and the renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia and normotensive pregnancy. *Scand. J. Clin. Lab Invest* 45, 627-633 (1985).
224. Conrad, K. P., Morganelli, P. M., Brinck-Johnsen, T. & Colpoys, M. C. The renin-angiotensin system during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 1065-1072 (1989).
225. Bird, I. M., Zheng, J., Cale, J. M. & Magness, R. R. Pregnancy induces an increase in angiotensin II type-1 receptor expression in uterine but not systemic artery endothelium. *Endocrinology* 138, 490-498 (1997).
226. St Louis, J., Sicotte, B., Bedard, S. & Brochu, M. Blockade of angiotensin receptor subtypes in arcuate uterine artery of pregnant and postpartum rats. *Hypertension* 38, 1017-1023 (2001).

227. Forcier, I., St Louis, J. & Brochu, M. Angiotensin II receptor subtypes in the adrenals of pregnant rats. *Mol. Cell Endocrinol.* 114, 177-186 (1995).
228. Bedard, S., Sicotte, B., St-Louis, J. & Brochu, M. Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J. Physiol* 562, 937-950 (2005).
229. Schneider, M. A., Davies, M. C. & Honour, J. W. The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. *Fertil. Steril.* 59, 1059-1064 (1993).
230. Simonian, M. H. & Capp, M. W. Characterization of steroidogenesis in cell cultures of the human fetal adrenal cortex: comparison of definitive zone and fetal zone cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 59, 643-651 (1984).
231. Garland, H. O., Atherton, J. C., Baylis, C., Morgan, M. R. & Milne, C. M. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J. Endocrinol.* 113, 435-444 (1987).
232. Jaffe, R. B. *Reproductive Endocrinology, Physiology, Pathophysiology and Clinical Management.* Yen, Jaffe & Barbieri (eds.), p. 765 (W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999).
233. Herrera, E., Munoz, C., Lopez-Luna, P. & Ramos, P. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2499-2519 (1994).
234. Villar, J. *et al.* Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167, 1344-1352 (1992).
235. Lopez-Luna, P., Munoz, T. & Herrera, E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci.* 39, 1389-1393 (1986).
236. Butte, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1256S-1261S (2000).
237. Martin-Hidalgo, A., Holm, C., Belfrage, P., Schotz, M. C. & Herrera, E. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am. J. Physiol* 266, E930-E935 (1994).
238. Herrera, E., Gomez-Coronado, D. & Lasuncion, M. A. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol. Neonate* 51, 70-77 (1987).

239. Alsat, E., Malassine, A., Tarrade, A., Merviel, P. & Evain-Brion, D. Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *Medecine/Sciences* 15, 1236-1243. 1999.
Ref Type: Generic
240. Malassine, A., Frenco, J. L. & Evain-Brion, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update.* 9, 531-539 (2003).
241. Aplin, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 4), 681-692 (1991).
242. Tabibzadeh, S. & Babaknia, A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 10, 1579-1602 (1995).
243. Paria, B. C., Reese, J., Das, S. K. & Dey, S. K. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 296, 2185-2188 (2002).
244. Pijnenborg, R., Bland, J. M., Robertson, W. B. & Brosens, I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4, 397-413 (1983).
245. Caluwaerts, S., Vercruyse, L., Luyten, C. & Pijnenborg, R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 26, 574-584 (2005).
246. Johnson MH & Everitt BJ *Reproduction*. DeBoeck Université (ed.), pp. 172-199 (Blackwell Sciences Limited, Espagne,2002).
247. Kurt Benirschke. Comparative placentation. <http://medicine.ucsd.edu/cpa/> . 2004.
Ref Type: Internet Communication
248. Cipolla, M. & Osol, G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 805-811 (1994).
249. St Louis, J., Pare, H., Sicotte, B. & Brochu, M. Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am. J. Physiol* 273, H1148-H1153 (1997).
250. Page, K. L., Celia, G., Leddy, G., Taatjes, D. J. & Osol, G. Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 1647-1652 (2002).
251. Poisner, A. M., Downing, G. J. & Poisner, R. Prorenin secretion from villous placenta: regulation by cyclic AMP and angiotensin. *Placenta* 15, 487-499 (1994).

252. Ihara, Y., Taii, S. & Mori, T. Expression of renin and angiotensinogen genes in the human placental tissues. *Endocrinol. Jpn.* 34, 887-896 (1987).
253. Downing, G. J., Poisner, A. M. & Barnea, E. R. First-trimester villous placenta has high prorenin and active renin concentrations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172, 864-867 (1995).
254. Chao, H. S., Poisner, A. M., Poisner, R. & Handwerger, S. Endothelin-1 modulates renin and prolactin release from human decidua by different mechanisms. *Am. J. Physiol* 267, E842-E846 (1994).
255. Chao, H. S., Poisner, A. M., Poisner, R. & Handwerger, S. Lipopolysaccharides inhibit prolactin and renin release from human decidua cells. *Biol. Reprod.* 50, 210-214 (1994).
256. Kalenga, M. K., De, G. M., Thomas, K. & De, H. R. Angiotensin-II stimulates estradiol secretion from human placental explants through AT1 receptor activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80, 1233-1237 (1995).
257. Hagemann, A., Nielsen, A. H. & Poulsen, K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 252-261 (1994).
258. Meadows, J. W., Pitzer, B., Brockman, D. E. & Myatt, L. Differential localization of prostaglandin E synthase isoforms in human placental cell types. *Placenta* 25, 259-265 (2004).
259. Walsh, S. W., Wang, Y. & Jesse, R. Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 1007-1012 (1993).
260. White, V. *et al.* Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 117-123 (2002).
261. Wang, Y. P., Walsh, S. W., Guo, J. D. & Zhang, J. Y. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 1695-1700 (1991).
262. Handwerger, S. & Freemark, M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 13, 343-356 (2000).
263. Caufriez, A. *et al.* Placental growth hormone as a potential regulator of maternal IGF-I during human pregnancy. *Am. J. Physiol* 258, E1014-E1019 (1990).

264. John E Buster & Sandra A Carson *Obstetrics: normal and problem pregnancy*. Steven G Gabbe, Jennifer R Niebyl & Joe Leigh Simpson (eds.), pp. 3-35 (Churchill livingstone, Philadelphia,2002).
265. Gohar, J., Mazor, M. & Leiberman, J. R. GnRH in pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* 259, 1-6 (1996).
266. Blank, M. S. & Dufau, M. L. Rat chorionic gonadotropin: augmentation of bioactivity in the absence of the pituitary. *Endocrinology* 112, 2200-2202 (1983).
267. Lerrant, Y., Corbani, M., Counis, R. & Jutisz, M. Rat placental mRNA directs the synthesis of a polypeptide immunologically related to alpha-subunit of glycoprotein hormones. *Mol. Cell Endocrinol.* 54, 23-28 (1987).
268. Tepper, M. A. & Roberts, J. L. Evidence for only one beta-luteinizing hormone and no beta-chorionic gonadotropin gene in the rat. *Endocrinology* 115, 385-391 (1984).
269. Witlin, A. G. & Sibai, B. M. Hypertension in pregnancy: current concepts of preeclampsia. *Annu. Rev. Med.* 48, 115-127 (1997).
270. Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 1691-1712 (1990).
271. de Jong, C. L., Dekker, G. A. & Sibai, B. M. The renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia. A review. *Clin. Perinatol.* 18, 683-711 (1991).
272. Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J. & MacDonald, P. C. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J. Clin. Invest* 52, 2682-2689 (1973).
273. Dekker, G. A. & Sibai, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179, 1359-1375 (1998).
274. August P *Medical complication during pregnancy*. Burrow and Duffy (ed.), pp. 53-77 (W.B.Saunders Compagny, Philadelphia, USA,1999).
275. Broughton, P. F. & Rubin, P. C. Pre-eclampsia--the 'disease of theories'. *Br. Med. Bull.* 50, 381-396 (1994).
276. Zhou, Y., Damsky, C. H. & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J. Clin. Invest* 99, 2152-2164 (1997).

277. Sacks, G. P., Studena, K., Sargent, K. & Redman, C. W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179, 80-86 (1998).
278. Hayman, R., Brockelsby, J., Kenny, L. & Baker, P. Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 6, 3-10 (1999).
279. Wang, Y. & Walsh, S. W. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J. Reprod. Immunol.* 32, 157-169 (1996).
280. Knight, M., Redman, C. W., Linton, E. A. & Sargent, I. L. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105, 632-640 (1998).
281. Smarason, A. K., Sargent, I. L., Starkey, P. M. & Redman, C. W. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 100, 943-949 (1993).
282. Chesley, L. C. & Cooper, D. W. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93, 898-908 (1986).
283. Salonen, R. H., Lichtenstein, P., Lipworth, L. & Cnattingius, S. Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am. J. Med. Genet.* 91, 256-260 (2000).
284. Ward, K. *et al.* A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat. Genet.* 4, 59-61 (1993).
285. Jeunemaitre, X. *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71, 169-180 (1992).
286. Lachmeijer, A. M. *et al.* Polymorphisms in the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha gene region and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 98, 612-619 (2001).
287. Lachmeijer, A. M. *et al.* Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 394-402 (2001).
288. Savvidou, M. D., Vallance, P. J., Nicolaidis, K. H. & Hingorani, A. D. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension* 38, 1289-1293 (2001).

289. Yu, C. K. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a nested case-control study and a meta-analysis. *BMC. Pregnancy. Childbirth.* 6, 7 (2006).
290. Trupin, L. S., Simon, L. P. & Eskenazi, B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7, 240-244 (1996).
291. Robillard, P. Y. *et al.* Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 344, 973-975 (1994).
292. Uzan S, Beaufile M & Uzan M *Obstétrique*. Papiernik E, Carbol D & Pons JC (eds.), pp. 793-824 Flammarion, Paris, France,1998).
293. Sikkema, J. M. *et al.* Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 304-308 (2001).
294. Wang, Y. & Walsh, S. W. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 19, 581-586 (1998).
295. Myatt, L. *et al.* Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* 28, 488-493 (1996).
296. Hubel, C. A. *et al.* Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174, 975-982 (1996).
297. Sharma, J. B. *et al.* Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 94, 23-27 (2006).
298. Hubel, C. A. Plasma vitamin E in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 484-485 (1997).
299. Hubel, C. A., Kagan, V. E., Kisin, E. R., McLaughlin, M. K. & Roberts, J. M. Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 597-609 (1997).
300. Walsh, S. W. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 223-232 (2004).
301. Baker, P. N., Davidge, S. T., Barankiewicz, J. & Roberts, J. M. Plasma of preeclamptic women stimulates and then inhibits endothelial prostacyclin. *Hypertension* 27, 56-61 (1996).
302. St-Louis, J., Sicotte, B., Beausejour, A. & Brochu, M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction.* 131, 331-339 (2006).

303. Auger, K., Beausejour, A., Brochu, M. & St Louis, J. Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287, H1848-H1856 (2004).
304. Bilodeau, J. F. & Hubel, C. A. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 25, 742-750 (2003).
305. Walsh, S. W. & Wang, Y. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 1456-1461 (1993).
306. Wang, Y. & Walsh, S. W. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 206-212 (2001).
307. Beausejour, A., Bibeau K, St Louis, J. & Brochu, M. Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta* In press, (2006).
308. Walsh, S. W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 93-104 (1998).
309. Hubel, C. A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 222-235 (1999).
310. Little, R. E. & Gladen, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 13, 347-352 (1999).
311. Kharb, S. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 93, 37-39 (2000).
312. Moncada, S. & Vane, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30, 293-331 (1978).
313. Bruun, N. E. *et al.* Normal renal tubular response to changes of sodium intake in hypertensive man. *J. Hypertens.* 8, 219-227 (1990).
314. Hertzan-Levy, S. *et al.* Glomerular basement membrane anionic sites in adriamycin nephropathy: effect of saline loading and nitric oxide modulation. *Nephron* 84, 354-361 (2000).
315. Ortiz, P. A. & Garvin, J. L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 282, F777-F784 (2002).
316. Liang, M. & Knox, F. G. Nitric oxide activates PKC α and inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Am. J. Physiol* 277, F859-F865 (1999).

317. Mishra, O. P., Iivoria-Papadopoulos, M., Cahillane, G. & Wagerle, L. C. Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase active sites for ATP, K⁺, Na⁺, and strophanthidin in vitro. *Neurochem. Res.* 14, 845-851 (1989).
318. Qayyum, I. *et al.* Nitration as a mechanism of Na⁺, K⁺-ATPase modification during hypoxia in the cerebral cortex of the guinea pig fetus. *Neurochem. Res.* 26, 1163-1169 (2001).
319. Millan-Crow, L. A., Crow, J. P. & Thompson, J. A. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37, 1613-1622 (1998).
320. Annunziato, L. *et al.* Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol. Lett.* 139, 125-133 (2003).
321. Li, S. Y. *et al.* Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 49, 1434-1446 (2006).
322. Bassien-Capsa, V., Fournon, J. C., Comte, B. & Chorvatova, A. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc. Res.* 69, 423-431 (2006).
323. Mukherji, S. & Banerjee, S. Blood glutathione and ascorbic acid in normal pregnancy and in pre-eclamptic toxemia. *Indian J. Psychol.* 2, 501-504 (1958).
324. Davidge, S. T., Hubel, C. A., Brayden, R. D., Capeless, E. C. & McLaughlin, M. K. Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 79, 897-901 (1992).
325. Mikhail, M. S. *et al.* Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 150-157 (1994).
326. Chappell, L. C. *et al.* Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 354, 810-816 (1999).
327. Chappell, L. C. *et al.* Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 777-784 (2002).
328. Beazley, D., Ahokas, R., Livingston, J., Griggs, M. & Sibai, B. M. Vitamin C and E supplementation in women at high risk for preeclampsia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 520-521 (2005).

329. Poston, L., Briley, A. L., Seed, P. T., Kelly, F. J. & Shennan, A. H. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 367, 1145-1154 (2006).
330. Atamer, Y., Kocyigit, Y., Yokus, B., Atamer, A. & Erden, A. C. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 119, 60-66 (2005).
331. Bowry, V. W. & Stocker, R. Tocopherol-Mediated Peroxidation. The Prooxidant Effect of Vitamin E on the Radical-Initiated Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 6029-6044 (1993).
332. Bowry, V. W., Ingold, K. U. & Stocker, R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem. J.* 288 (Pt 2), 341-344 (1992).
333. Dad, S., Bisby, R. H., Clark, I. P. & Parker, A. W. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radic. Res.* 40, 333-338 (2006).
334. Banerjee, S., Chambers, A. E. & Campbell, S. Is vitamin E a safe prophylaxis for preeclampsia? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 1228-1233 (2006).
335. Piccinni, M. P. *et al.* Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat. Med.* 4, 1020-1024 (1998).
336. Tasinato, A., Boscoboinik, D., Bartoli, G. M., Maroni, P. & Azzi, A. d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12190-12194 (1995).
337. Han, S. N. *et al.* Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. *Immunology* 100, 487-493 (2000).
338. Malmberg, K. J. *et al.* A short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increases T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 1772-1778 (2002).
339. Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C. & Burton, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3-19 (2002).
340. Ain, R., Canham, L. N. & Soares, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev. Biol.* 260, 176-190 (2003).

341. Adamson, S. L. *et al.* Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 250, 358-373 (2002).
342. Khong, T. Y., De, W. F., Robertson, W. B. & Brosens, I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93, 1049-1059 (1986).
343. Knofler, M., Mosl, B., Bauer, S., Griesinger, G. & Husslein, P. TNF-alpha/TNFR1 in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 21, 525-535 (2000).
344. Whiteside, E. J. *et al.* Elevated concentration of TNF-alpha induces trophoblast differentiation in mouse blastocyst outgrowths. *Cell Tissue Res.* 314, 275-280 (2003).
345. Huber, A. V., Saleh, L., Bauer, S., Husslein, P. & Knofler, M. TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 27, 127-136 (2006).
346. Ntrivalas, E., Kwak-Kim, J., Beaman, K., Mantouvalos, H. & Gilman-Sachs, A. An in vitro coculture model to study cytokine profiles of natural killer cells during maternal immune cell-trophoblast interactions. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13, 196-202 (2006).
347. Ferrara, N. & vis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25 (1997).
348. Takahashi, H. & Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 109, 227-241 (2005).
349. Roberts, W. G. & Palade, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2369-2379 (1995).
350. Bortoloso, E. *et al.* Quantitative and qualitative changes in vascular endothelial growth factor gene expression in glomeruli of patients with type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* 150, 799-807 (2004).
351. Lafayette, R. A. *et al.* Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia. *Kidney Int.* 54, 1240-1249 (1998).
352. Redman, C. W. & Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592-1594 (2005).

353. Tang, Z. *et al.* Significance of vascular endothelial growth factor expression in renal tissue of patients with preeclamptic nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 25, 579-585 (2005).
354. Jauniaux, E. *et al.* Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol.* 157, 2111-2122 (2000).
355. Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C. H., Polliotti, B. M. & Fisher, S. J. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J. Clin. Invest* 97, 540-550 (1996).
356. Athanassiades, A., Hamilton, G. S. & Lala, P. K. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol. Reprod.* 59, 643-654 (1998).
357. Ahmad, S. & Ahmed, A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ. Res.* 95, 884-891 (2004).
358. Maynard, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest* 111, 649-658 (2003).
359. Nagamatsu, T. *et al.* Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 145, 4838-4845 (2004).
360. Li, H., Gu, B., Zhang, Y., Lewis, D. F. & Wang, Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 26, 210-217 (2005).
361. Myles, K. & Funder, J. W. Progesterone binding to mineralocorticoid receptors: in vitro and in vivo studies. *Am. J. Physiol* 270, E601-E607 (1996).
362. Edwards, C. R. *et al.* Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2, 986-989 (1988).
363. McCalla, C. O., Nacharaju, V. L., Muneyyirci-Delale, O., Glasgow, S. & Feldman, J. G. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Steroids* 63, 511-515 (1998).
364. Funder, J. W. RALES, EPHEBUS and redox. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 121-125 (2005).

365. Nagata, K. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 47, 656-664 (2006).
366. Lenfant, C. Working group report on high blood pressure in pregnancy. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich.)* 3, 75-88 (2001).
367. Granger, J. P., Alexander, B. T., Llinas, M. T., Bennett, W. A. & Khalil, R. A. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 38, 718-722 (2001).
368. Masse, J., Giguere, Y., Kharfi, A., Girouard, J. & Forest, J. C. Pathophysiology and maternal biologic markers of preeclampsia. *Endocrine*. 19, 113-125 (2002).
369. Hung, T. H., Skepper, J. N. & Burton, G. J. In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am. J. Pathol.* 159, 1031-1043 (2001).
370. Jeyabalan, A. & Caritis, S. N. Antioxidants and the prevention of preeclampsia--unresolved issues. *N. Engl. J. Med.* 354, 1841-1843 (2006).
371. Rumbold, A. R., Crowther, C. A., Haslam, R. R., Dekker, G. A. & Robinson, J. S. Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N. Engl. J. Med.* 354, 1796-1806 (2006).