

Université de Montréal

**Le remodelage morphologique et fonctionnel  
des cardiomyocytes isolés du ventricule gauche  
lors de la gestation chez la rate**

par

Valérie Bassien-Capsa

Département de Physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en physiologie  
option Physiologie et Biophysique moléculaires

Août 2004

© Valérie Bassien-Capsa, 2004





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal

Faculté des Etudes Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le remodelage morphologique et fonctionnel  
des cardiomyocytes isolés du ventricule gauche  
lors de la gestation chez la rate**

présenté par

Valérie Bassien-Capsa

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean-Louis Schwartz (Ph.D)  
Président-rapporteur

Dr Alzbeta Chorvatova (Ph.D)  
Directrice de recherche

Dr Lucie Parent (Ph.D)  
Co-directrice de recherche

Dr Jean Saint-Louis (Ph.D)  
Membre du jury

*A ma famille,  
ce mémoire est l'accomplissement du soutien  
constant et inestimable que vous m'avez  
apporté et qui m'accompagne chaque jour.*

## ***RESUME***

---

Lors de la grossesse, des changements hémodynamiques se mettent en place pour subvenir aux besoins métaboliques de la mère et du fœtus. L'augmentation de la charge volumique qui résulte de ces altérations hémodynamiques induit une réponse adaptative du cœur qui est l'hypertrophie. Notre hypothèse est que cette adaptation du myocarde implique des modifications structurales et fonctionnelles de ses cellules. Notre but est de déterminer, à l'échelle d'un cardiomyocyte, les altérations gestationnelles de la morphologie et du fonctionnement du myocarde, en particulier la contractilité, l'homéostasie du  $\text{Na}^+$ , les courants potassiques et leurs répercussions sur le potentiel d'action. Pour cette étude, les cardiomyocytes du ventricule gauche de rates nullipares et gestantes en fin de gestation furent isolés. D'après les mesures morphologiques effectuées, pendant la gestation, les cardiomyocytes subissent un remodelage de type excentrique. Ce remodelage est corrélé à des altérations du fonctionnement cellulaire. En effet, la contractilité des cardiomyocytes des rates gestantes diminue bien que la densité du courant calcique  $I_{\text{Ca-L}}$  demeure la même. Le  $\text{Na}^+$  intracellulaire augmente et une modification du nombre et/ou de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pourrait être impliquée, puisque la densité de son courant basal diminue. La diminution de la densité des courants potassiques  $I_{\text{to}}$  n'a pas altéré le profil du potentiel d'action. Par contre, celle des courants potassiques  $I_{\text{K1}}$  concorde avec le ralentissement de la phase de repolarisation du potentiel d'action observé. Quant au courant potassique  $I_{\text{SUS}}$ , sa densité n'est pas affectée. L'ensemble de nos résultats confirme que des modifications morphologiques et fonctionnelles des cardiomyocytes se produisent lors de la gestation. Comprendre les adaptations cardiovasculaires lors de la grossesse normale permettra de déterminer leurs variations lors des pathologies cardiovasculaires de la grossesse.

Mots-clés : grossesse • cardiomyocytes • ventricule gauche • remodelage • contractilité • homéostasie du sodium • canaux ioniques • potentiel d'action

## ***SUMMARY***

---

Major adaptations in the maternal cardiovascular system are essential for the normal course of pregnancy. Notably, the plasma volume expansion leads to an adaptive cardiac hypertrophy. We hypothesize that structural and functional modifications of cardiac cells underlie this adaptation of the myocardium. Our aim is to determine the pregnancy induced alterations of the myocardium at a cardiomyocyte level. We focused on the cardiomyocytes morphology and their functioning, especially their contractility, their  $\text{Na}^+$  homeostasis, their potassium currents, and the possible repercussions of the potassium currents on the action potential. In this study, left ventricle cardiomyocytes were isolated from nulliparous and pregnant female rats in late pregnancy. Our morphological data indicate that, during pregnancy, cardiomyocytes undergo an eccentric remodelling which is associated with modifications of their functioning. Indeed, the contractility of cardiomyocytes from pregnant rats decreases although the density of the calcium current  $I_{\text{Ca-L}}$  remains unchanged. As the same time, the intracellular  $\text{Na}^+$  increases. Modifications of the number and/or the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase could account for this  $\text{Na}^+$  increase, given that a decrease of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase steady-state current density was observed. The lowering of the density of the potassium currents  $I_{\text{K1}}$ , is consistent with the slowed repolarisation phase of the action potential. The density of the potassium currents  $I_{\text{to}}$  was also decreased without significantly affecting the action potential profile. As for the potassium current  $I_{\text{sus}}$ , its density was found unaltered. Obtained results confirm that morphological and functional modifications of cardiomyocytes occur during pregnancy. A better knowledge of the cardiovascular adaptations during normal pregnancy is crucial to understand their variations in pregnancies complicated by cardiovascular disease.

Key-words: pregnancy • cardiomyocytes • left ventricle • remodelling • contractility • sodium homeostasis • ionic channels • action potential

## ***TABLE DES MATIERES***

---

<b>TITRE .....</b>	<b>i</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. LES ADAPTATIONS HÉMODYNAMIQUES LORS DE LA GROSSESSE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Le débit cardiaque et fréquence cardiaque .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Le volume sanguin.....</b>	<b>4</b>



1.3.	La pression artérielle et la résistance vasculaire.....	5
2.	LES ADAPTATIONS DU CŒUR.....	6
2.1	Différents types d'hypertrophie.....	6
2.2.	L'hypertrophie lors de la grossesse .....	7
3.	FONCTIONNEMENT DES CARDIOMYOCYTES .....	9
3.1.	Le potentiel d'action des cardiomyocytes .....	10
3.1.1.	La phase 0 du potentiel d'action.....	11
3.1.2.	La phase 1 du potentiel d'action.....	11
3.1.3.	La phase 2 du potentiel d'action.....	12
3.1.4.	La phase 3 du potentiel d'action.....	12
3.1.5.	La phase 4 du potentiel d'action.....	13
3.2.	Particularités des systèmes de transport étudiés.....	14
3.2.1.	Canal calcique de type L .....	14
3.2.2.	Les canaux potassiques.....	15
3.2.2.1.	Canal potassique transitoire sortant.....	15

3.2.2.2.	Canal potassique soutenu.....	16
3.2.2.3.	Canal potassique à rectification entrante.....	16
3.2.3.	La pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.....	17
3.4.	Le couplage excitation-contraction.....	18
4.	Objectifs de l'étude.....	19
II.	MATERIEL Et METHODES .....	21
1.	MODÈLE ANIMAL .....	22
2.	ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES DU VENTRICULE GAUCHE.....	22
2.1	Description du système de perfusion .....	22
2.2	Perfusion rétrograde du cœur.....	24
2.2.1.	1 <sup>ère</sup> étape de la perfusion rétrograde : l'élimination du sang résiduel.....	24
2.2.2.	2 <sup>e</sup> étape de la perfusion rétrograde: l'arrêt des contractions .....	25

2.2.3.	3 <sup>e</sup> étape de la perfusion rétrograde: la dissociation tissulaire.....	25
2.2.3.1.	Mode d'action des enzymes utilisées .....	25
2.2.3.2.	La dissociation du myocarde .....	26
2.2.3.3.	L'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche .....	27
3.	MICROSCOPIE CONFOCALE .....	28
3.1.	Principe .....	28
3.2.	Observer des cellules vivantes.....	30
3.3.	Microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510 .....	31
3.4.	Sondes fluorescentes.....	34
3.4.1.	Na Green .....	34
3.4.2.	Mérocyanine 540 .....	35
3.5.	Mesures morphologiques.....	35
3.5.1	Mesure du volume des cardiomyocytes.....	35

3.5.2. Détermination du nombre et de la longueur des sarcomères .....	37
3.6. Mesure du sodium intracellulaire.....	39
3.7. Mesure des contractions .....	41
4. PATCH-CLAMP.....	42
5. SOLUTIONS .....	47
5.1 Solutions pour l'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche.....	47
5.2 Milieu extracellulaire.....	48
5.3 Remplissage de la pipette de patch perforé .....	49
6. ANALYSES STATISTIQUES.....	50
III. RESULTATS .....	51
1. MORPHOLOGIE DES CARDIOMYOCYTES.....	52
2. CONTRACTILITÉ DES CARDIOMYOCYTES.....	54

<b>3. HOMÉOSTASIE DU SODIUM.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Na<sup>+</sup> intracellulaire .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 La pompe Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPase : son courant <math>I_{Na,K}</math> et son inhibition .....</b>	<b>58</b>
<b>4. POTENTIEL D'ACTION ET COURANTS DES CARDIOMYOCYTES.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Potentiel d'action.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Courants potassiques sortants <math>I_{to}</math> et <math>I_{sus}</math> .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Courants potassiques sortants <math>I_{K1}</math> .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4 Courants <math>I_{Ca-L}</math> .....</b>	<b>71</b>
<b>IV. DISCUSSION.....</b>	<b>73</b>
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>86</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>90</b>

## ***LISTE DES TABLEAUX***

---

### **II. MATERIEL ET MÉTHODES**

<b>Tableau I. Composition des solutions pour l'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche .....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau II. Composition de la solution extracellulaire .....</b>	<b>48</b>
<b>Tableau III. Composition de la solution pour le remplissage de la pipette de patch perforé .....</b>	<b>49</b>

### **III. RESULTATS**

<b>Tableau IV. Effet de la gestation sur la morphologie des cardiomyocytes .....</b>	<b>55</b>
--	-----------

## ***LISTE DES FIGURES***

---

### **I. INTRODUCTION**

**Figure 1.Représentation schématique du potentiel d'action cardiaque.. 11**

**Figure 2.Transport des ions  $Ca^{2+}$  dans les myocytes ventriculaires..... 19**

### **II. MATERIEL ET MÉTHODES**

**Figure 3.Système de perfusion du coeur ..... 23**

**Figure 4.Principe du microscope confocale ..... 30**

**Figure 5.Microscope confocal à balayage laser LSM 510 ..... 33**

**Figure 6.Détermination du nombre et de la longueur des sarcomères ... 39**

**Figure 7.Les quatre configurations de la technique du patch-clamp..... 44**

### **III. RESULTATS**

**Figure 8.Morphologie des cardiomyocytes ..... 54**

**Figure 9.Effet de la gestation sur la contractilité des cardiomyocytes .... 57**

**Figure 10.Effet de gestation sur l'homéostasie du sodium ..... 59**

<b>Figure 11. Altération de l'activité de la <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPase lors de la gestation .....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 12. Effet de la gestation sur le potentiel d'action des cardiomyocytes .....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 13. Effet de la gestation sur l'activation des courants potassiques sortants <math>I_{\text{to}}</math> et <math>I_{\text{sus}}</math> .....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 14. Effet de la gestation sur l'inactivation des courants potassiques sortants <math>I_{\text{to}}</math> .....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 15. Effet de la gestation sur les courants potassiques entrants <math>I_{\text{KI}}</math> .....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 16. Effet de la gestation sur les courants calciques de type L <math>I_{\text{Ca-L}}</math> .....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 17. Schéma récapitulatif des altérations des cardiomyocytes chez la rate en fin de gestation.....</b>	<b>88</b>



## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

---

AM	Acétoxyméthylester
ATP	Adénosine triphosphate
BaCl <sub>2</sub>	Chlorure de barium
BAPTA-AM	acide-1,2-bis(2-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'- Tétraacétique -(acétoxyméthylester)
BSA	Bovine Serum Albumin
Cl <sup>-</sup>	Ion chlore
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium
CICR	«Calcium Induced Calcium Release»
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentration intracellulaire de Ca <sup>2+</sup>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	Concentration extracellulaire de Ca <sup>2+</sup>
[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentration intracellulaire de K <sup>+</sup>
[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	Concentration extracellulaire de K <sup>+</sup>
E <sub>K</sub>	Potentiel d'équilibre du K <sup>+</sup>
E <sub>Na</sub>	Potentiel d'équilibre du Na <sup>+</sup>
E <sub>Na+/Ca<sup>2+</sup></sub>	Potentiel d'inversion de l'échangeur Na <sup>+</sup> / Ca <sup>2+</sup>
EGTA	acide éthylèneglycol-bis (-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'- tétra-acétique
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane sulfonique
I	Courant
I <sub>Ca-L</sub>	Courant calcique de type L
I <sub>K1</sub>	Courant potassique entrant

$I_{K(ATP)}$	Courant potassique inhibé par [ATP]
$I_{K(Ach)}$	Courant potassique activé par le récepteur M2 de l'acétylcholine (ACh)
$I_{Na}$	Courant sodique entrant
$I_{sus}$	Courant potassique soutenu
$I_{to}$	Courant potassique transitoire sortant
$K^+$	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
$\lambda_{ex/em}$	Longueurs d'onde d'excitation/émission
MCBL	Microscope confocal à balayage laser
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Hexahydrate de chlorure de magnésium
$Na^+$	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
$NaH_2PO_4$	Phosphate de sodium monobasique
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCX	Echangeur $Na^+/Ca^{2+}$
PA	Potential d'action
RS	Réticulum sarcoplasmique
SERCA	Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum $Ca^{2+}$ -ATPase
$\Sigma$	Somme
$Sr^{2+}$	Ion strontium
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

TEA	Tétraéthylammonium
V	Potentiel membranaire
<b>Unités</b>	
°C	degré Celsius
A	ampère
g	gramme
g	intensité de la pesanteur
Hz	hertz
h	heure
L	litre
m	mètre
min	minute
M	molaire
s	seconde
tr.min <sup>-1</sup>	tours par minute
U	unité enzymatique
V	volt

# **I. INTRODUCTION**

## ***I. INTRODUCTION***

---

La grossesse est un état physiologique complexe associé à des changements significatifs de la fonction cardiovasculaire en réponse aux besoins métaboliques de la mère et du fœtus. Ces altérations ont la particularité d'être réversibles mais leurs mécanismes de mise en place sont peu connus. La connaissance des adaptations cardiovasculaires au cours de la grossesse est cependant essentielle car l'incapacité de produire ou de prolonger ces changements peut résulter en des complications mettant en péril la vie de la mère et du fœtus.

Nos travaux visent à déterminer à l'échelle cellulaire les mécanismes impliqués dans l'adaptation du myocarde lors de la grossesse normale.

### **1. Les adaptations hémodynamiques lors de la grossesse**

D'importantes adaptations hémodynamiques de la circulation maternelle sont constatées tout au long de la grossesse <sup>1,2</sup>. La fréquence cardiaque et le débit cardiaque augmentent tandis que la résistance périphérique et la pression artérielle diminuent <sup>3,4</sup>. Ces adaptations ont pour finalité d'optimiser la perfusion placentaire afin de permettre au fœtus de se développer dans des conditions optimales. Une adaptation hémodynamique inadéquate est associée à des complications gestationnelles telles que la restriction de croissance fœtale et l'hypertension gestationnelle <sup>5</sup>.

La rate a souvent été utilisée comme modèle animal pour l'étude de la grossesse car les changements hémodynamiques qui se produisent chez la rate gestante sont similaires à ceux observés chez la femme enceinte. De plus, sa

période gestationnelle présente l'avantage d'être relativement courte puisqu'elle dure trois semaines et de permettre d'établir des correspondances avec les trois trimestres de grossesse de la femme.

### **1.1. Le débit cardiaque et fréquence cardiaque**

Le débit cardiaque est le produit de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection, par conséquent l'augmentation de ces deux paramètres au cours de la grossesse contribue à son augmentation.

Un des changements les plus précoces est l'augmentation de la fréquence cardiaque qui se produit dès la 4<sup>e</sup> semaine de grossesse chez la femme et se poursuit jusqu'en fin de grossesse où elle atteint son pic. A terme, elle est environ 20 % supérieure aux valeurs pré-gestationnelles ce qui correspond à une augmentation de 15 battements/min<sup>6,7</sup>. La fréquence cardiaque retourne à sa valeur de base à la 12<sup>e</sup> semaine du post-partum<sup>7</sup>. Chez la rate, lors de la gestation, la fréquence cardiaque augmente de 360 à 420 battements/min<sup>8</sup>.

L'augmentation du volume d'éjection systolique est liée à l'augmentation de la volémie, donc de la précharge et à la baisse de la postcharge par diminution de la résistance artérielle. Le volume d'éjection augmente graduellement chez la femme de la 8<sup>e</sup> à la 24<sup>e</sup> semaine puis atteint un plateau. A 1 an post-partum, il est proche de sa valeur pré-gestationnelle mais il lui est encore supérieur<sup>7</sup>.

L'accroissement du débit cardiaque est de 30 à 45 % en moyenne au repos de la 10<sup>e</sup> semaine à la 24<sup>e</sup> semaine où il atteint un plateau. Au cours du travail et de l'expulsion, le débit cardiaque s'accroît. La fréquence cardiaque s'accélère sous l'effet de la douleur et de l'anxiété. La précharge du ventricule gauche augmente à chaque contraction en raison de la remise en circulation de 400 à 600 mL de sang stockés dans l'utérus et de la levée de la compression de la veine cave inférieure par l'utérus qui augmente le retour veineux<sup>9,10</sup>. Le débit

cardiaque est encore 23 % supérieur à sa valeur pré-gestationnelle à 1 an post-partum <sup>7</sup>.

## 1.2. Le volume sanguin

L'expansion progressive du volume plasmatique, qui se produit chez les femmes enceintes et les rates gestantes <sup>11,12,13</sup>, est nécessaire pour le cours normal de la grossesse <sup>14</sup>.

Chez la femme enceinte, le volume sanguin augmente à partir de la 6<sup>e</sup> semaine de grossesse et atteint un plateau à 50 % environ de volume excédentaire au début du troisième trimestre. Le volume des globules rouges augmente moins causant «l'anémie physiologique» de la grossesse <sup>15</sup>. Le volume plasmatique ne revient à sa valeur de base qu'entre la 6<sup>e</sup> et la 8<sup>e</sup> semaine post-partum <sup>16,17</sup>.

Chez la rate, l'augmentation du volume sanguin est en moyenne plus importante que chez la femme, puisqu'elle se situe entre 50 et 70 %. De plus, ces changements n'interviennent pas en même temps chez la femme et la rate. En effet, l'expansion volumique commence à partir du 11<sup>e</sup> ou 12<sup>e</sup> jour de gestation mais l'essentiel du gain volumique se produit au cours de la dernière semaine de gestation <sup>18-21</sup>.

L'hypervolémie, lors de la grossesse et de la gestation chez la rate, résulte d'une rétention plus importante d'eau et de Na<sup>+</sup> due à des changements de l'osmorégulation et en partie à l'activation du SRAA (Système Rénine Angiotensine Aldostérone) <sup>22,23</sup>. Chez la femme, il a été démontré que les grossesses compliquées par la restriction de croissance fœtale, la prééclampsie ou les deux sont caractérisées par une expansion réduite du volume plasmatique <sup>24,25</sup>. Chez la rate, la restriction de sodium inhibe

l'expansion du volume et est nuisible au cours à la grossesse surtout à l'approche de son terme <sup>26</sup>.

### **1.3. La pression artérielle et la résistance vasculaire**

Paradoxalement, en dépit de l'augmentation du volume sanguin et de l'activation du SRAA, la gestation chez la rate et la grossesse chez la femme sont caractérisées par une baisse de la pression artérielle <sup>3,7</sup>. Cette chute ne se produit pas à la même période chez les deux espèces. Chez la femme, la pression artérielle baisse dès le premier trimestre. Elle atteint son plus bas niveau à la 16<sup>e</sup> semaine pour ensuite revenir au niveau initial à terme <sup>7</sup>. Chez la rate, la pression ne change pas avant le 17<sup>e</sup> jour et diminue graduellement jusqu'à terme c'est-à-dire le 22<sup>e</sup> jour de gestation <sup>27</sup>.

Plusieurs études suggèrent que la diminution de la pression artérielle serait due à une baisse significative du tonus vasculaire <sup>28</sup>. D'ailleurs, lors de la gestation et de la grossesse, une diminution de la résistance vasculaire est observée et elle est accompagnée d'une diminution de la réponse aux agents vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II <sup>29,30</sup> et une augmentation de la réponse aux agents vasodilatateurs <sup>31</sup>.

Chez la femme, la résistance vasculaire périphérique diminue à partir de la 8<sup>e</sup> semaine et atteint son plus bas niveau à la 16<sup>e</sup> semaine, tout comme la pression artérielle, pour ne plus changer jusqu'au terme de la grossesse <sup>7</sup>. La résistance vasculaire périphérique augmente ensuite progressivement et est 30 % inférieure à sa valeur pré-gestationnelle à 1 an post-partum <sup>7</sup>.

Chez la rate, la résistance vasculaire périphérique diminue d'environ 23 % au 13<sup>e</sup> jour puis continue de descendre progressivement jusqu'en fin de gestation <sup>32</sup>.



## 2. Les adaptations du cœur

Chez les humains et les rongeurs la grossesse est associée à des changements structuraux et fonctionnels du cœur et des vaisseaux<sup>33,34</sup>. Les adaptations hémodynamiques présentées précédemment vont entraîner une augmentation du travail cardiaque qui induit une réponse adaptative du cœur qui est l'hypertrophie. Cette hypertrophie physiologique résulterait d'altérations significatives de la charge volumique du ventricule gauche<sup>34</sup>, d'où notre intérêt pour l'étude des cardiomyocytes du ventricule gauche. La grossesse représente, par conséquent, un excellent modèle d'hypertrophie physiologique consécutive à une surcharge hémodynamique.

### 2.1 Différents types d'hypertrophie

Il y a trente ans environ, Grossman et coll.<sup>35</sup> ont émis l'hypothèse que l'hypertrophie ventriculaire était un processus biologique initié par un événement mécanique. Selon l'équation de La Place, le stress de la paroi est égal au produit de la pression et du rayon de la cavité ventriculaire divisé par le double de l'épaisseur de la paroi. En se basant sur ce paradigme, Grossman et coll.<sup>35</sup> ont établi la théorie selon laquelle l'augmentation de la pression ventriculaire produit un signal mécanique qui se traduit par la réplication des sarcomères en parallèle, accroissant de ce fait l'épaisseur de la paroi. Par contre, la surcharge de volume induirait la réplication des sarcomères en série et par conséquent un allongement des myocytes.

Les expériences cliniques et une pléthore de données ont confirmé ces concepts de base à partir desquels deux types d'hypertrophie ont été définis.

L'hypertrophie développée suite à une surcharge volumique est dite de type excentrique<sup>33,36,37</sup>. La surcharge de volume augmente la pression ventriculaire gauche au cours du remplissage et étire ainsi la paroi

ventriculaire<sup>38</sup>. Le cœur s'adapte en allongeant les myocytes existants et en augmentant ainsi les dimensions internes du ventricule gauche. Cela s'accompagne généralement d'un épaissement de la paroi, adaptation qui réduit le stress s'exerçant sur la paroi. Ainsi la surcharge de volume peut conduire au remodelage d'un ventricule caractérisé par une paroi épaisse et une cavité plus large, tout en ayant un rapport normal de l'épaisseur de la paroi sur le diamètre interne<sup>38</sup>.

À l'inverse, la surcharge de pression augmente le stress sur la paroi au cours de la systole, conduisant à une prolifération myocytaire et un épaissement de la paroi avec soit une préservation soit une réduction du volume normal de la cavité. L'hypertrophie concentrique diffère de l'hypertrophie excentrique par le fait que l'augmentation de la masse du ventricule n'est pas associée à une dilatation proportionnelle de la cavité<sup>33</sup>.

## **2.2. L'hypertrophie lors de la grossesse**

Selon Mone et coll.<sup>39</sup>, le remodelage hypertrophique du cœur observé chez les femmes enceintes serait similaire à celui observé chez les athlètes féminines, en particulier les athlètes soumis à un exercice d'endurance tels que les coureurs de marathon<sup>35</sup>. Le remodelage hypertrophique du cœur suite à l'entraînement est connu sous le nom de «cœur d'athlète»<sup>40</sup>. Chez les athlètes soumis à un exercice d'endurance, une élévation de la précharge due à un retour veineux accru mène au développement d'une hypertrophie de type excentrique avec une augmentation de l'épaisseur ventriculaire proportionnelle à celle de la cavité ventriculaire<sup>35</sup>.

Chez la femme enceinte, la masse du ventricule gauche augmente de 16 % au 3<sup>e</sup> trimestre par rapport au 1<sup>er</sup> trimestre et retourne à sa valeur pré-gestationnelle vers 8 à 10 semaines post-partum<sup>41</sup>. Les femmes enceintes sont soumises à une surcharge hémodynamique similaire à celle des coureurs

de longue distance au repos, c'est-à-dire avec une précharge réduite, une postcharge normale<sup>39</sup>.

L'hypertrophie du ventricule gauche développée lors de la grossesse étant proportionnelle aux changements hémodynamiques, le myocarde peut rapidement inverser l'hypertrophie et le remodelage de telle sorte qu'il n'y ait pas de conséquences à long terme de la grossesse. Cependant, ce n'est pas le cas de certaines maladies qui surviennent lors de la grossesse, telle que la pré-éclampsie, dans laquelle l'hypertrophie du myocarde est exagérée et son retour à la taille normale plus lent<sup>45</sup>.

Il n'est pas encore établi avec précision si la contractilité du myocarde est altérée lors de la gestation chez la femme puisque des études sur le cœur entier ont montré une diminution<sup>33,39</sup>, une augmentation<sup>34</sup>, ou encore aucun changement significatif<sup>42</sup>. En dépit du fait que la surcharge volumique naturelle lors de la grossesse mène à une hypertrophie réversible physiologique du ventricule gauche<sup>45</sup>, l'étendue de l'hypertrophie varie et certains modèles ne montrent aucune différence de poids du ventricule gauche<sup>45</sup>. En ce qui concerne la rate, les données sur la contractilité du myocarde maternel lors de la gestation sont toujours manquantes.

L'avènement de l'échographie en mode M a permis de définir des modèles géométriques du ventricule gauche<sup>46,47</sup> et d'utiliser la forme du ventricule gauche comme outil diagnostique. Des études récentes ont d'ailleurs établi une corrélation entre les altérations de la géométrie du ventricule gauche, en particulier le remodelage et l'hypertrophie concentriques, et l'augmentation de la mortalité et la morbidité fœto-maternelles chez des patientes atteintes d'hypertension gestationnelle<sup>47</sup>.

Les adaptations cardiovasculaires de la grossesse rendent difficile le diagnostic des cardiomyopathies du péripartum qui se développent lors la grossesse. Il est, de ce fait, nécessaire de développer des outils de diagnostic plus précis. Une meilleure compréhension du remodelage des cardiomyocytes lors de la grossesse permettrait d'élaborer des traitements plus appropriés en apportant des connaissances sur les changements structuraux et fonctionnels se produisant au niveau d'une cellule cardiaque.

Les études fonctionnelles menées jusqu'à ce jour sur les cardiomyocytes isolés lors de la grossesse portent seulement sur les cardiomyocytes fœtaux et non sur les cardiomyocytes maternels. Ainsi, une connaissance du fonctionnement des cardiomyocytes est nécessaire pour pouvoir déterminer les altérations de ce fonctionnement propres à la grossesse. Ce fonctionnement est décrit dans les sections suivantes.

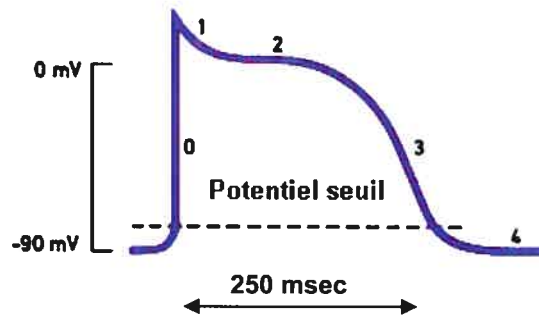
### 3. Fonctionnement des cardiomyocytes

Les événements mécaniques qui permettent au cœur d'assurer sa fonction de pompe sont initiés par des changements des propriétés électriques des cellules cardiaques. Le tissu cardiaque est composé de deux types de cellules : les cellules musculaires ou fibres à réponse rapide et les fibres à réponse lente, douées d'automaticité. L'automatisme est la propriété exclusive des cellules possédant une dépolarisation diastolique lente spontanée. A l'état normal, ce sont les cellules pacemaker du nœud sinusal, les plus rapides, qui imposent la fréquence cardiaque et inhibent les centres automatiques moins rapides (phénomène «d'overdrive»). Ces cellules génèrent le stimulus électrique qui est ensuite transmis par les oreillettes au nœud auriculo-ventriculaire. Le myocarde ventriculaire reçoit le stimulus électrique via le réseau de fibres de His-Purkinje <sup>48</sup>.

Lors de ce processus, tandis que les cellules sont stimulées par les impulsions, le potentiel membranaire change de telle sorte que les cellules voisines sont à leur tour excitées et l'impulsion électrique se propage. Les cellules ont un potentiel de repos négatif proche de  $-80$  mV. Quand le stimulus de dépolarisation est assez grand pour que le potentiel de repos s'élève au-dessus de la valeur seuil, il génère un potentiel d'action (PA). Le PA est d'un grand intérêt pour les électrophysiologistes non seulement car il participe au couplage excitation-contraction mais aussi parce que les changements du PA cardiaque peuvent induire des arythmies <sup>48</sup>.

### **3.1. Le potentiel d'action des cardiomyocytes**

Les PA qui se propagent le long des membranes plasmiques des cardiomyocytes sont générés par une séquence de changements de potentiels électriques entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. La dépolarisation, une diminution de degré d'électronégativité de la cellule au repos, se produit quand les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  entrent dans le cytosol et génèrent des courants entrants. La repolarisation se produit quand les courants sortants restaurent le potentiel de repos. Dans les cardiomyocytes, les courants repolarisants sont dus à l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  majoritairement et l'influx d'ions  $\text{Cl}^-$  <sup>49</sup>. Le PA des cellules myocardiques est plus long chez l'homme que chez le rat, avec une durée de 200 à 300 ms <sup>48</sup> chez l'homme et de 80 à 90 ms chez le rat <sup>50</sup>. Cependant, chez les deux espèces le PA est composé de cinq phases (Fig.1) : la phase 0 est la phase ascendante ou phase de dépolarisation rapide, la phase 1 est la phase de repolarisation précoce, la phase 2 est la phase de plateau, la phase 3 est la phase de repolarisation finale et la phase 4 le potentiel de repos.



**Figure 1. Représentation schématique du potentiel d'action cardiaque**

### 3.1.1. La phase 0 du potentiel d'action

Dans les cellules ventriculaires, la phase 0 qui est la portion ascendante du PA est due à l'ouverture rapide des canaux  $\text{Na}^+$ . Ces canaux génèrent des courants entrants ( $I_{\text{Na}}$ ). Le potentiel membranaire passe de alors de  $-80 \text{ mV}$  à  $+40 \text{ mV}$ , c'est-à-dire proche du potentiel d'équilibre de  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ). L'augmentation transitoire de l'influx de  $\text{Na}^+$  dure environ 1 à 2 ms. Quand la  $[\text{Na}^+]_i$  et les charges intracellulaires positives augmentent de sorte que le potentiel membranaire atteigne  $E_{\text{Na}}$ , il n'y a plus d'influx de  $\text{Na}^+$  <sup>48</sup>. Les canaux calciques de type T contribuent aussi à cette phase. Cependant il n'y a peu de canaux calciques de type T dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats <sup>51</sup>.

### 3.1.2. La phase 1 du potentiel d'action

Suite à la phase 0, le potentiel membranaire retourne rapidement mais transitoirement à environ  $0 \text{ mV}$ . Cette repolarisation précoce et rapide, qui correspond à la phase 1, est contrôlée par l'ouverture de canaux  $\text{K}^+$  qui médient les courants transitoires sortants ( $I_{\text{to}}$ ). Cependant l'inactivation des canaux  $I_{\text{Na}}$  contribue aussi à cette phase <sup>48</sup>. Cette phase est très prononcée chez le rat par rapport aux autres mammifères et constitue une des particularités de son potentiel d'action <sup>50</sup>.

### 3.1.3. La phase 2 du potentiel d'action

La phase 1 est suivie par une phase de plateau ou phase 2 du PA. Pendant cette période, la conductance membranaire de la majorité des ions diminue. Celle des ions  $\text{Na}^+$  est faible car les canaux  $\text{Na}^+$  sont inactivés après la dépolarisation initiale. Durant la phase de plateau, certains canaux  $\text{K}^+$  à rectification retardée ne sont pas encore ouverts, en raison de la lenteur de leur cinétique d'activation<sup>48</sup>. Les canaux calciques de type L s'activent et l'influx des ions  $\text{Ca}^{2+}$  génère des courants entrants ( $I_{\text{Ca-L}}$ ) qui contrecarrent les forces de repolarisation. Les canaux calciques de type T contribuent aussi à cette phase mais dans une moindre mesure. Cette phase est brève chez le rat, ce qui constitue là aussi une distinction de son potentiel d'action par rapport à celui des autres mammifères<sup>50</sup>.

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est un autre acteur de cette phase. Suite à la dépolarisation, le potentiel membranaire devient supérieur au potentiel d'inversion de l'échangeur ( $E_{\text{Na/Ca}}$ ) qui fonctionne en mode inverse et génère de ce fait un courant sortant ( $I_{\text{Na/Ca}}$ ): sortie de trois ions  $\text{Na}^+$  et entrée d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci se poursuit jusqu'à ce que le potentiel membranaire soit égal à  $E_{\text{Na/Ca}}$  durant la repolarisation soit environ égal à  $-20 \text{ mV}$ <sup>53</sup>.

Les phases 1 et 2 correspondent à la période réfractaire absolue pendant laquelle la cellule ne peut être à nouveau dépolarisée. La période réfractaire absolue est donc proportionnelle à la durée du plateau<sup>48</sup>.

### 3.1.3. La phase 3 du potentiel d'action

Le profil et la vitesse de repolarisation du potentiel d'action sont contrôlés par différents types de canaux  $\text{K}^+$  qui se distinguent par leur cinétique et leur densité dans la membrane cellulaire. La vitesse de repolarisation terminale est augmentée après la phase de plateau par l'augmentation de la conductance du canal  $\text{K}^+$  à rectification retardée rapide de  $I_{\text{sus}}$  et  $I_{\text{K}}$  et du canal à rectification entrante de  $I_{\text{K1}}$ <sup>53,54</sup>. L'activation de la contraction chez le rat nécessite une

augmentation transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$  d'environ  $0.6 \mu M$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  diastolique étant d'environ  $0.1 \mu M$ <sup>55</sup>. Durant cette phase, la  $[Ca^{2+}]_i$  cytosolique étant plus élevée, l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  génère alors un courant entrant  $I_{Na/Ca}$  : entrée de trois ions  $Na^+$  et sortie d'un ion  $Ca^{2+}$ .

### 3.1.4. La phase 4 du potentiel d'action

A l'état de repos, la membrane des cardiomyocytes a une perméabilité plus élevée pour les ions  $K^+$  et le potentiel de membrane est proche du potentiel d'équilibre électrochimique de  $K^+$  ( $E_K$ ) qui est d'environ  $-80$  mV. Cette perméabilité aux ions  $K^+$  est due à l'ouverture des canaux potassiques rectification entrante ( $I_{K1}$ ) qui laissent entrer les ions  $K^+$  à des potentiels dépolarisants et en fonction du  $K^+$  extracellulaire. La grande conductance entrante aux potentiels au-dessous de  $E_K$  empêche l'hyperpolarisation excessive. Aux potentiels membranaires légèrement positifs à  $E_K$ ,  $I_{K1}$  génère des courants sortants. Pour ces raisons, le potentiel de repos est maintenu proche de  $E_K$ <sup>48</sup>.

Un autre facteur important qui maintient une  $[K^+]_i$  élevée et une  $[Na^+]_i$  faible est la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase. Cette pompe utilise l'ATP comme source d'énergie, pour le transport de trois ions  $Na^+$  en-dehors de la cellule et deux ions  $K^+$  dans la cellule, produisant un courant sortant net hyperpolarisant<sup>48</sup>.

Les canaux  $I_{K(ATP)}$ , qui s'ouvrent quand la  $[ATP]_i$  devient inférieure à  $1.0$  mM et les canaux  $I_{K(Ach)}$  activés par le récepteur muscarinique (M2) de l'acétylcholine peuvent dans certaines conditions influencer le potentiel de repos. Après le retour de potentiel membranaire à sa valeur de repos, la cellule peut à nouveau être dépolarisée<sup>48, 56</sup>.



### 3.2. Particularités des systèmes de transport étudiés

Dans les myocytes cardiaques, chez l'homme et le rat, la repolarisation étant majoritairement contrôlée par les canaux  $K^+$  dépendants du voltage. Ces dernières jouent un rôle important dans l'excitabilité et dans la conduction et la repolarisation du PA, d'où notre intérêt pour les courants  $I_{to}$ ,  $I_{sus}$  et  $I_{K1}$ . De plus, étant donné que le développement de la force contractile dépend de la  $[Ca^{2+}]_i$ , nous nous sommes intéressées au canal calcique de type L qui joue un rôle important dans l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  et le couplage excitation-contraction dans les myocytes cardiaques. La régulation de la  $[Na^+]_i$  est importante pour le fonctionnement des cardiomyocytes de part le fait que l'énergie générée par son gradient électrochimique est utilisée par plusieurs systèmes de transport comme les canaux  $Na^+$  et les transporteurs qui couplent le transport du  $Na^+$  à ceux d'autres ions et molécules. C'est la raison pour laquelle, la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase qui assure le maintien du gradient de  $Na^+$  a aussi été étudiée.

Nous verrons dans les sections suivantes les caractéristiques de ces systèmes de transport.

#### 3.2.1. Canal calcique de type L

Le couplage excitation-contraction et la force contractile du myocarde dépendent de l'activation initiale des canaux calciques de type L présents dans le sarcolemme<sup>57</sup>. Ces canaux et dans une moindre mesure les canaux calciques de type T des cardiomyocytes servent à apporter le  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Cet influx de  $Ca^{2+}$  constitue un courant entrant ( $I_{Ca-L}$ ) qui tend à rendre le potentiel membranaire plus positif, mais surtout sert de second messenger dans le couplage excitation-contraction, (tel que décrit dans la section 3.4) qui mène à l'activation de la contraction cellulaire<sup>57</sup>. Ces canaux sont fermés au potentiel de repos et s'ouvrent suite à la dépolarisation membranaire lors du PA. Leur inactivation est lente et ils sont inhibés par l'ion cadmium<sup>58</sup>, les phénylalkylamines<sup>59</sup> et par la plupart des

dihydropyridines telles que la nifédipine<sup>57</sup>. Cependant, certaines dihydropyridines telles que le Bay K 8644, le S-202-791 et le CGP 28392 augmentent  $I_{Ca-L}$  en prolongeant la durée d'ouverture des canaux calciques<sup>57</sup>. Mitchell et coll.<sup>60</sup> ont démontré que ralentir l'inactivation de  $I_{Ca-L}$  en remplaçant  $Ca^{2+}$  par le  $Sr^{2+}$  prolonge le PA chez le rat en raison du maintien de la phase de plateau. Cela démontre que  $I_{Ca-L}$  peut directement influencer le profil du PA.

### 3.2.2. Les canaux potassiques

L'amplitude et la durée du potentiel d'action dans le myocarde des mammifères sont déterminées en grande partie par les canaux potassiques dépendants du voltage. En effet, la repolarisation cardiaque est causée par des courants potassiques contrôlés par ces canaux.

L'interaction entre le potentiel de membrane et l'ouverture et la fermeture des canaux potassiques cardiaques est généralement décrite en termes de leur capacité de rectifier le flux de courant à travers la membrane. Les canaux sont dits à rectification sortante quand ils favorisent la sortie d'ions potassiques. Au contraire, d'autres canaux potassiques sont dits à rectification entrante si ils facilitent l'entrée d'ions potassiques<sup>49</sup>.

#### 3.2.2.1. Canal potassique transitoire sortant

L'activation des canaux potassiques transitoires sortants joue un rôle important dans la repolarisation des myocytes ventriculaires de plusieurs espèces dont l'homme et le rat<sup>61-64</sup>. En effet, leur courant  $I_{to}$  (to signifiant «outward transient») est responsable de la repolarisation rapide (phase 1 du PA) entre la phase ascendante et le plateau du PA<sup>65</sup>.  $I_{to}$  s'active rapidement par la dépolarisation mais s'inactive aussi rapidement. Il est inhibé par la 4-aminopyridine<sup>66</sup>.

Etant donné sa contribution à la phase de repolarisation précoce,  $I_{to}$  affecte la densité du courant  $I_{Ca-L}$  et par conséquent module les processus du couplage excitation-contraction, de la contractilité du myocarde ainsi que la repolarisation.  $I_{to}$ , de part son rôle dans le contrôle du potentiel membranaire, peut aussi altérer la densité des courants potassiques à rectification retardée<sup>67-69</sup>. Le canal reste inactivé jusqu'à ce que le potentiel membranaire revienne à sa valeur de repos, à laquelle les canaux retrouvent leur état activé.  $I_{to}$  influence la durée et le profil du PA chez l'homme et le rat<sup>58,64</sup> : son inhibition mène à une prolongation significative du potentiel d'action<sup>60,61</sup>. Ainsi, les changements de densité de  $I_{to}$  peuvent modifier la durée du potentiel d'action.

### 3.2.2.2. Canal potassique soutenu

Après l'inactivation rapide du courant  $I_{to}$ , un autre courant sortant est toujours présent, le courant  $I_{sus}$ , (sus signifiant «sustained»).  $I_{sus}$  permet de diminuer la composante initiale du plateau et l'amplitude de sa composante tardive<sup>70,71</sup>.  $I_{sus}$  s'active rapidement à des potentiels similaires à ceux de  $I_{to}$ , mais ne s'inactive pas pendant le potentiel d'action<sup>70</sup>. De ce fait, il constitue un courant de maintien.  $I_{sus}$  n'est pas sensible à la 4-aminopyridine comme  $I_{to}$  mais est inhibé par le TEA (tétraéthylammonium) externe<sup>70</sup>.

### 3.2.2.3. Canal potassique à rectification entrante

Le courant entrant  $I_{K1}$  joue un rôle important dans la stabilité du potentiel de repos des cellules excitables<sup>58</sup>. Ces canaux médient un flux réduit de courants sortants à des potentiels plus négatifs que son potentiel d'inversion, ce qui permet le développement de la phase de plateau du potentiel d'action<sup>72</sup> et établit le seuil d'excitabilité des courants dépolarisants<sup>73</sup>. La conductance du courant sortant diminue progressivement quand le potentiel membranaire devient plus positif que  $E_K$ <sup>54</sup>. De plus, les courants entrants  $I_{K1}$  contribuent aussi à la phase finale de repolarisation du potentiel d'action à cause de la

forte pente de sa relation courant-voltage, entre -70 et -40 mV <sup>74-76</sup>. Cependant, quand la cellule devient dépolarisée, les canaux qui génèrent  $I_{K1}$  ont une conductance sortante plus faible que la conductance entrante, le potentiel de membrane est alors libre de changer. Le courant  $I_{K1}$  peut être inhibé par l'ion  $Ba^{2+}$  <sup>58</sup>.

### 3.2.3. La pompe $Na^+/K^+$ -ATPase

La pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase est une enzyme ubiquitaire qui assure le maintien du gradient des ions  $Na^+$  et  $K^+$  entre le cytosol et le milieu extracellulaire. La  $Na^+/K^+$ -ATPase a deux sous-unités principales  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  (~110 kDa) possède les sites de liaison pour l'ATP,  $Na^+$ ,  $K^+$  et les inhibiteurs. La sous-unité  $\beta$  (~50 kDa) module l'activité ATPasique et est importante pour l'insertion de la pompe dans la membrane. Il existe quatre isoformes de  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ) et trois de  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ). Toute combinaison de ces deux sous-unités aboutit à la formation d'une protéine fonctionnelle <sup>77</sup>.

La conservation des gradients de  $Na^+$  et  $K^+$  est un pré-requis pour l'homéostasie ionique des cellules, pour la régulation du volume et pour le transport secondaire de divers solutés. Dans le cas des cellules excitables, la création et le maintien du gradient des ions  $Na^+$  et  $K^+$  sont nécessaires pour établir le potentiel de repos ainsi que pour la genèse et la propagation du PA <sup>77</sup>. Lors de chaque cycle, une molécule d'ATP est hydrolysée et trois ions  $Na^+$  sont transportés hors de la cellule tandis que deux ions  $K^+$  sont transportés dans le cytosol. De ce fait, le cycle de la pompe résulte en un courant net sortant qui hyperpolarise de quelques millivolts la membrane.

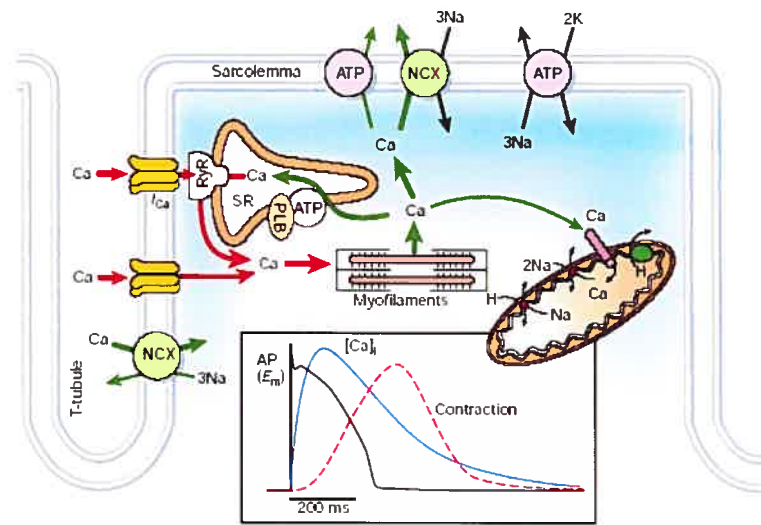
La  $Na^+/K^+$ -ATPase est le récepteur de glycosides cardiaques qui exercent un effet inotrope en inhibant l'activité de l'enzyme. Cette inhibition mène à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Na^+$  <sup>78</sup>. Ainsi, l'activité de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  est affectée de sorte que moins d'ions  $Ca^{2+}$  soient

transportés hors de la cellule. De ce fait, plus d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  s'accumulent dans le réticulum sarcoplasmique et sont disponibles pour les contractions de la cellule, ce qui mène l'augmentation de la force de contraction <sup>79</sup>.

#### 3.4. Le couplage excitation-contraction

La contraction cardiaque est initiée par une élévation transitoire du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire libre déclenchée par le PA. L'ensemble des événements qui couple la dépolarisation du sarcolemme à l'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  et au déclenchement de la contraction cardiaque est désigné comme le couplage excitation-contraction <sup>55</sup>.

Pendant le PA cardiaque, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  entrent dans la cellule par les canaux calciques activés par la dépolarisation, les canaux calciques de type L et de type T dans une moindre mesure (Fig.2). Le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant induit la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique (RS) par sa liaison aux récepteurs aux ryanodines présents sur la membrane du RS <sup>55</sup>. Ce phénomène est connu sous l'acronyme de « CICR » qui signifie « Calcium Induced Calcium Release » ou libération du calcium induite par le calcium. La combinaison de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de sa libération augmente la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ce qui permet au  $\text{Ca}^{2+}$  de se lier à la troponine C, protéine des myofilaments, qui active ensuite l'appareil contractile. Pour que la relaxation se produise la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  doit diminuer afin de permettre au  $\text{Ca}^{2+}$  de se dissocier de la troponine. Cela requiert le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  hors du cytosol par quatre voies : la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du RS, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du sarcolemme ainsi que l'unipporteur mitochondrial <sup>80</sup>. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messenger ubiquitaire essentiel à l'activité électrique cardiaque. Une altération de la teneur du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les myocytes est une cause importante de dysfonctionnement contractile et d'arythmies dans les conditions pathophysiologiques <sup>79</sup>.



**Figure 2. Transport des ions  $Ca^{2+}$  dans les myocytes ventriculaires.**

Dans l'encadré, représentation d'un potentiel d'action, d'un transitoire calcique et de la contraction mesurés dans un cardiomyocyte ventriculaire de lapin à 37°C.  $I_{Ca}$  canal calcique dépendant du voltage; NCX, échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ ; ATP, ATPase; PLB, phospholamban; RyR, récepteur ryanodine; SR, sarcoplasmic reticulum. Extrait de Bers, DM, 2002<sup>55</sup>. Imprimé avec la permission de Donald Bers et de Nature Publishing Group.

#### 4. Objectifs de l'étude

Les cardiomyocytes isolés ont été utilisés comme modèle depuis maintenant deux décennies pour caractériser l'activité électrique, le couplage excitation-contraction et l'effets de médicaments sur le cœur<sup>83,84</sup>. Cependant, en dépit des difficultés à diagnostiquer et traiter les cardiomyopathies du péripartum, qui présentent un tableau clinique similaire à celui de l'insuffisance cardiaque<sup>83</sup>, les modifications morphologiques et fonctionnelles des cardiomyocytes du ventricule gauche durant la grossesse n'ont pas été encore étudiées. Nous supposons que pendant la grossesse les cardiomyocytes du ventricule gauche subissent des modifications structurales et fonctionnelles en réponse à la surcharge volumique. Notre but est de déterminer ces altérations

au niveau d'un cardiomyocyte du ventricule gauche chez la rate en fin de gestation. Nous avons étudié en premier lieu la morphologie des cardiomyocytes puis certains aspects de leur fonctionnement que sont l'homéostasie du sodium, la contractilité, les courants potassiques et leurs répercussions sur le potentiel d'action.

## **II.MATERIEL ET METHODES**



## ***II. MATERIEL ET METHODES***

---

### **1. Modèle animal**

Cette étude a été réalisée avec deux groupes de rates adultes Sprague-Dawley (Charles River, Saint-Constant, Qc, Canada): des rates nullipares âgées de 13-14 semaines (225-275g) et des rates gestantes du même âge (350-450 g), à leur 21<sup>e</sup> jour de gestation, qui dure 22 jours.

L'étude a été approuvée par le CIBPAR (Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche) du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.

### **2. Isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche**

#### **2.1 Description du système de perfusion**

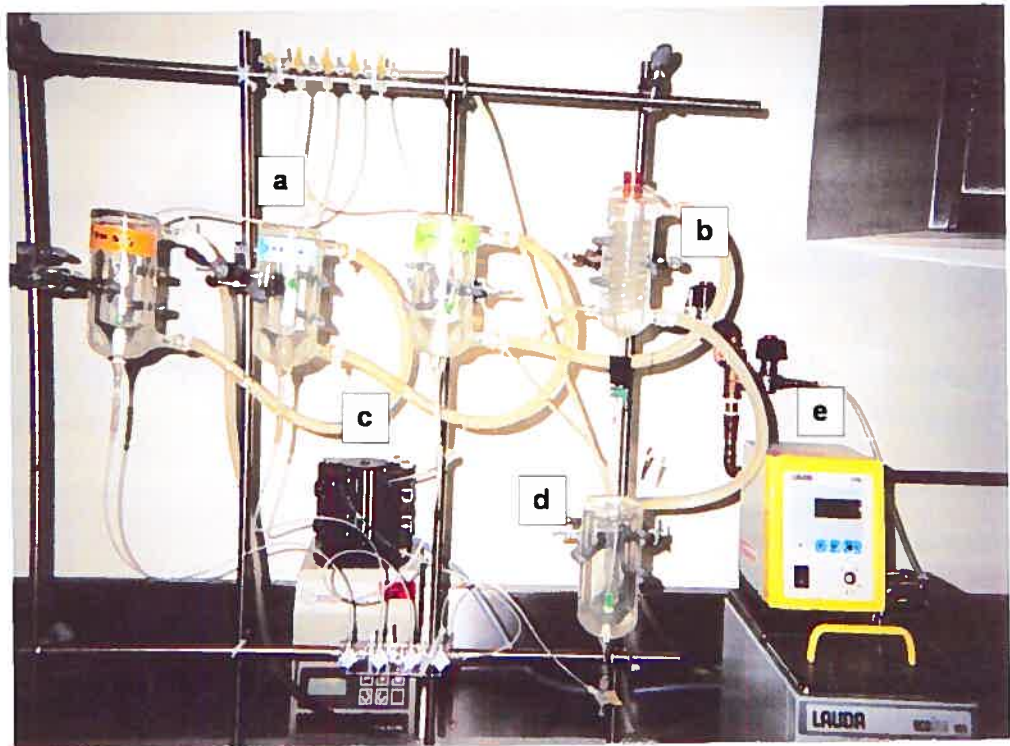
Le système de perfusion utilisé est un système de Langendorff modifié par l'ajout d'une pompe péristaltique Minipuls 3 (Gilson, distribuée par Mandel Ltd, Guelph, ON, Canada) afin d'assurer le maintien du débit (Fig.3).

Les quatre bouteilles et la colonne de perfusion possèdent une double paroi. L'espace entre les deux parois est rempli d'eau chauffée à une température de  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  par un bain circulant ecoline E103 (Lauda distribuée, Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada). Ainsi les solutions perfusées sont maintenues à une température de  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . L'oxygénation des solutions est effectuée par des diffuseurs d'air placés dans chaque bouteille. Trois bouteilles contiennent les solutions de la perfusion et la quatrième placée sous

la colonne de perfusion servira à maintenir le cœur dans un espace chaud et à la recirculation de la solution d'enzymes.

La colonne de perfusion est munie d'une l'aiguille 18 G 1<sup>1/2</sup>, d'une longueur de 1.0 cm environ, sur laquelle le cœur sera attaché.

Le système est lavé avec de l'eau déionisée trois fois avant et après son utilisation. En fin d'expérience, l'eau résiduelle doit être éliminée de toutes les tubulures afin d'éviter le développement de bactéries.



**Figure 3. Système de perfusion du cœur**

Les solutions utilisées lors de la perfusion rétrograde du cœur sont placées dans trois bouteilles (a). Ces solutions sont acheminées jusqu' à la colonne de perfusion (b) par la pompe péristaltique qui maintient le débit (c). La perfusion et l'espace autour du cœur (d) sont maintenus à une température de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  par un bain circulant (e).

## 2.2 Perfusion rétrograde du cœur

Les cardiomyocytes sont isolés par perfusion rétrograde du cœur<sup>84</sup>.

Les animaux sont euthanasiés, le matin, par décapitation rapide sans anesthésie. Le cœur est rapidement excisé puis placé dans un bécher contenant une solution de Tyrode additionnée de  $\text{CaCl}_2$  0.75 mM (cf. Tableau I, section 5. Solutions pour la composition). Le cœur est alors pressé plusieurs fois contre la paroi du bécher pour faire sortir la majorité du sang. Ensuite le cœur est transféré dans un second bécher contenant la même solution.

Avant de placer le cœur sur la colonne de perfusion, il faut commencer la première perfusion avec la solution de Tyrode contenant du  $\text{CaCl}_2$  0.75 mM. Cela permet d'éviter que des bulles d'air s'introduisent dans le cœur. Le cœur est attaché par une canulation aortique sur la colonne de perfusion avec une pince. Il est ensuite noué à l'aiguille avec du fil de soie 4/0 (environ 0.22 mm de diamètre) (Fine science Tools, Vancouver, BC, Canada), pour s'assurer que le cœur reste bien fixé pendant toute l'expérience. La pince peut alors être retirée et la bouteille située sous la colonne de perfusion est remontée pour que le cœur soit dans un espace dont la température est de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Il faut réguler le débit sortant du cœur à 1 goutte/s.

### 2.2.1. 1<sup>ère</sup> étape de la perfusion rétrograde : l'élimination du sang résiduel

La première étape, perfusion de la solution de Tyrode contenant du  $\text{CaCl}_2$  0.75 mM, sert à maintenir les contractions afin d'éliminer le sang résiduel qui pourrait coaguler et de ce fait bloquer la perfusion. Lorsque la goutte sortant du cœur est suffisamment claire, témoignant que le cœur s'est vidé de son sang, la seconde perfusion peut commencer.

### 2.2.2. 2<sup>e</sup> étape de la perfusion rétrograde: l'arrêt des contractions

Le cœur est perfusé, avec une solution de Tyrode sans CaCl<sub>2</sub> et additionnée d'EGTA 0.1 mM, chélateur de l'ion Ca<sup>2+</sup>, qui permet d'arrêter les contractions. Cette solution est perfusée jusqu'à l'arrêt complet des contractions. Dans notre cas, une perfusion de 5 min était suffisante.

### 2.2.3. 3<sup>e</sup> étape de la perfusion rétrograde: la dissociation tissulaire

La dissociation tissulaire, étape majeure du processus d'isolement cellulaire, est effectuée par l'action d'enzymes protéolytiques.

#### 2.2.3.1. Mode d'action des enzymes utilisées

Les préparations de collagénases utilisées pour la dissociation tissulaire ont été extraites de la souche bactérienne *Clostridium histolyticum*. Elles contiennent en plus de la collagénase, des sulfhydrylprotéases, la clostripaïne, des enzymes s'apparentant à la trypsine et des aminopeptidases. Les différentes proportions d'activité d'enzymatique ont permis d'établir des types de collagénase. Ainsi, la collagénase de type 2 (I.U.B 3.4.24.3) qui présente une plus grande activité clostripaïne, est généralement utilisée pour le cœur, les os, le cartilage, les muscles. Différents échantillons de collagénases de type 2 ont été testés afin de trouver l'enzyme ayant une activité adéquate. La combinaison des activités collagénolytique et protéolytique est nécessaire pour détruire les matrices extracellulaires. En effet, seule la collagénase clostridiale est capable de dégrader les triples hélices des fibrilles de collagène au niveau de la liaison X-Gly dans la séquence Pro-X-Gly-Pro- où X est un acide aminé neutre. Ces séquences se retrouvent rarement dans les autres protéines. La présence de l'ion Ca<sup>2+</sup> est nécessaire car il lui sert d'activateur<sup>85</sup>.

Cependant, la collagénase ne peut à elle seule dissocier les tissus en raison de l'hydrolyse incomplète de tous les polypeptides de collagène et de son

activité limitée contre les fortes concentrations des autres protéines retrouvées dans la matrice extracellulaire. Après la fragmentation par la collagénase, le collagène est plus vulnérable à l'action des autres protéases. La protéase de type XIV (E.C.C. 3.4.24.31) extraite de la souche bactérienne *Streptomyces griseus* que nous avons utilisée pour compléter l'action de la collagénase, est un mélange de trois activités protéolytiques incluant une sérine protéase. Les sérine protéases disposent d'un large champ de spécificité de substrats, ce qui les rend efficaces pour hydrolyser les liens peptidiques des différentes protéines de la matrice extracellulaire.

#### **2.2.3.2. La dissociation du myocarde**

Enfin, le cœur est perfusé avec une solution de Tyrode contenant 0.05 mM de  $\text{CaCl}_2$  et les deux enzymes protéolytiques: la collagénase de type 2 (319 U/mg) et la protéase de type XIV (4.9 U/mg).

Le temps de perfusion débute quand la solution d'enzymes colorée, par la présence de la collagénase, arrive au sommet de la colonne de perfusion. Au cours de cette perfusion enzymatique, le cœur se dilate en raison de la dissociation tissulaire. Il est de ce fait nécessaire de surveiller le débit qui devrait alors ralentir, afin de maintenir celui-ci à 1 goutte/sec. Le coût des enzymes étant relativement élevé, au lieu de préparer deux solutions d'enzymes, il est possible de récupérer la solution d'enzymes dans la bouteille située sous le cœur et de la faire circuler à nouveau dans le système. La fin de la perfusion enzymatique se fait quand se produit la transition entre un cœur rigide et souple. Il est, de ce fait, préférable de toucher le cœur à différents temps pour apprécier sa rigidité. Dans notre cas cette transition s'est produite, en général, après 7 à 8 min de perfusion.

### 2.2.3.3. L'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche

Il faut rapidement couper le cœur transversalement à peu près à mi-hauteur pour être certain d'éviter les oreillettes. Le ventricule droit est facilement identifié car lorsque l'on regarde le cœur de haut, il ressemble à un arc de cercle séparé du ventricule gauche par une cavité. Le ventricule gauche représente le reste du cœur. Le ventricule droit est ainsi excisé. Le ventricule gauche est alors coupé en morceaux qui sont placés dans 5.0 mL de la solution d'enzymes présentée ci-dessus et additionnée de BSA (Bovin Serum Albumin) pour une concentration finale de 1.0 %. La BSA inhibe partiellement l'activité de la collagénase. La solution est oxygénée par un apport d'air.

Après une agitation circulaire et manuelle de 5 min dans un bain à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , les cellules sont filtrées à travers du nylon possédant des pores de  $250 \mu\text{m}$  (Cadisch, Royaume-Uni) et le reste du tissu remplacé sous agitation dans les mêmes conditions. Le filtrat contenant les myocytes est complété jusqu'à 10 mL par la solution de Tyrode contenant  $\text{CaCl}_2$  0.75 mM pour diluer la solution d'enzyme et arrêter son action puis centrifugé à  $750 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  (environ 100 g) pendant 2 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot qui contient les cardiomyocytes est dissous dans 5 mL de la solution de  $\text{CaCl}_2$  0.75 mM en aspirant et refoulant le liquide. Cette succession d'étapes est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de tissu. Les cellules se déposent puis sont resuspendues deux fois dans la même solution. Ce processus s'appelle le lavage car il permet d'éliminer l'enzyme restante qui pourrait endommager les cellules. Les cellules sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri à  $4^\circ\text{C}$ , pour diminuer leur dégradation, jusqu'à leur utilisation.

Le pourcentage de survie cellulaire était d'environ 90 % chez les nullipares. Chez les rates gestantes le pourcentage de survie est moins élevé. Les cellules choisies pour l'étude présentaient des striations de sarcomères bien définies et une membrane sans renflements apparents. Elles ne produisaient pas non

plus de contractions spontanées. Les cellules ont été utilisées de 1h à 8h après l'isolement car elles conservent les propriétés contractiles durant cette période.

### 3. Microscopie confocale

#### 3.1. Principe

Le microscope confocal à balayage laser (MCBL) utilisé de nos jours, dérive du premier microscope confocal mis en point par Marvin Minsky en 1952<sup>86</sup>. Pour examiner un tissu en utilisant un microscope conventionnel, il est nécessaire d'effectuer de fines coupes de ce tissu : plus fine est la coupe, plus précise sera l'image. Cependant, dans ce processus de préparation, l'information sur la troisième dimension (la relation physique entre les coupes voisines) est perdue. Le MCBL réalise des sections dites «optiques», c'est-à-dire des sections effectuées dans l'épaisseur d'un échantillon biologique tel qu'un tissu ou des cellules, en faisant varier uniquement la position du plan de mise au point.

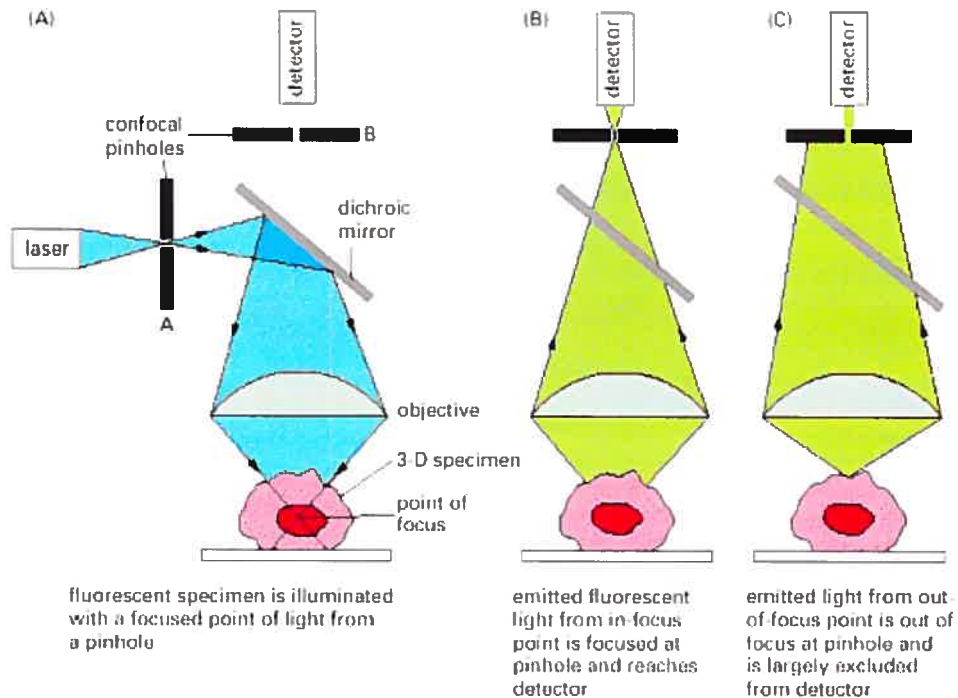
Un MCBL est surtout utilisé en microscopie à fluorescence. Cependant, au lieu d'illuminer l'échantillon entier, comme le font les autres microscopes, à chaque instant, le système optique concentre la lumière en un seul point de l'échantillon, à une profondeur spécifique, en faisant passer la lumière d'un laser par un «pinhole» (trou d'épingle). Etant donné la petite taille du champ d'illumination, le faisceau laser doit être balayé point par point sur l'objet pour constituer une image, d'où la dénomination de microscope confocal à balayage laser (Fig.4).

Le faisceau laser est en général positionné sur la préparation grâce à un couple de miroirs vibrants (miroirs galvanométriques) animés d'un

mouvement en X pour l'un et en Y pour l'autre. Dans une première phase, le mouvement du miroir X crée un déplacement du laser sur une ligne. Lorsque la ligne est terminée, ce miroir revient à sa position initiale et le miroir Y se déplace alors pour qu'une deuxième ligne soit créée par le miroir X.

La fluorescence émise par l'échantillon éclairé est recueillie et passe par un second «pinhole» placé en face du détecteur. L'ouverture de ce second «pinhole» est confocale avec celle du «pinhole» d'illumination, c'est-à-dire précisément placée là où les rayons émis du point de l'échantillon éclairé convergent<sup>87,88</sup>. Cela signifie que seule la fluorescence du point situé dans le plan de mise au point parvient au détecteur: la fluorescence des objets hors du plan de mise au point est arrêtée en grande partie par le diaphragme du détecteur<sup>88</sup>. Les signaux de ces points reçus par un détecteur puis convertis en images par un convertisseur analogique-numérique. Les images de ces points sont enregistrées par une caméra. L'image composite s'affiche ensuite sur l'écran d'un ordinateur et peuvent être sauvegardées dans un ordinateur<sup>89</sup>.





**Figure 4. Principe du microscope confocale**

(A). Un laser éclaire un «pinhole» dont l'image correspond à un seul point l'échantillon. (B). La fluorescence émise à partir de ce point converge vers un second «pinhole». (C). La lumière hors du plan de mise au point, défini par les «pinholes», ne contribue pas à l'image finale. Le balayage du laser permet donc d'obtenir une image précise de ce plan focal.

Extrait de Alberts B et al <sup>87</sup>. © Alberts B et al, 2002.

### 3.2. Observer des cellules vivantes

Lors de l'observation des cellules en microscopie à fluorescence, la lumière fluorescente vient de molécules situées hors du plan focal. Ainsi l'observateur voit une superposition d'images fluorescentes de molécules à différentes profondeurs dans la cellule, rendant difficile la détermination de l'arrangement moléculaire tridimensionnel réel. Le MCBL évite ce problème en permettant de visualiser les molécules fluorescentes dans le plan de mise au point et créant une image plus précise <sup>89</sup>. L'emploi de sondes fluorescentes (libres ou conjuguées à un anticorps) permet de localiser des composants macromoléculaires (protéines, acides nucléiques) mais aussi de petites

molécules (peptides, ions, lipides) <sup>87,88</sup>. Les images acquises par le système peuvent faire l'objet d'analyse et de quantification.

Le MCBL est donc un système de visualisation qui, en permettant la localisation *in-situ* précise de multiples marqueurs moléculaires, s'avère important pour l'étude de l'organisation fonctionnelle des cellules vivantes.

Certaines considérations sont à prendre en compte pour l'observation de cellules vivantes : la sensibilité de la détection, la vitesse d'acquisition et la viabilité de l'échantillon. De plus, en ce qui concerne l'enregistrement d'images tridimensionnelles des cellules, il faut savoir que la résolution du balayage horizontal du MCBL est meilleure que celle du balayage vertical.

### **3.3. Microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510**

L'étude de la morphologie des cardiomyocytes et une partie de celle de leur fonctionnement ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser LSM 510 (Carl Zeiss Ltd, North York, ON, Canada).

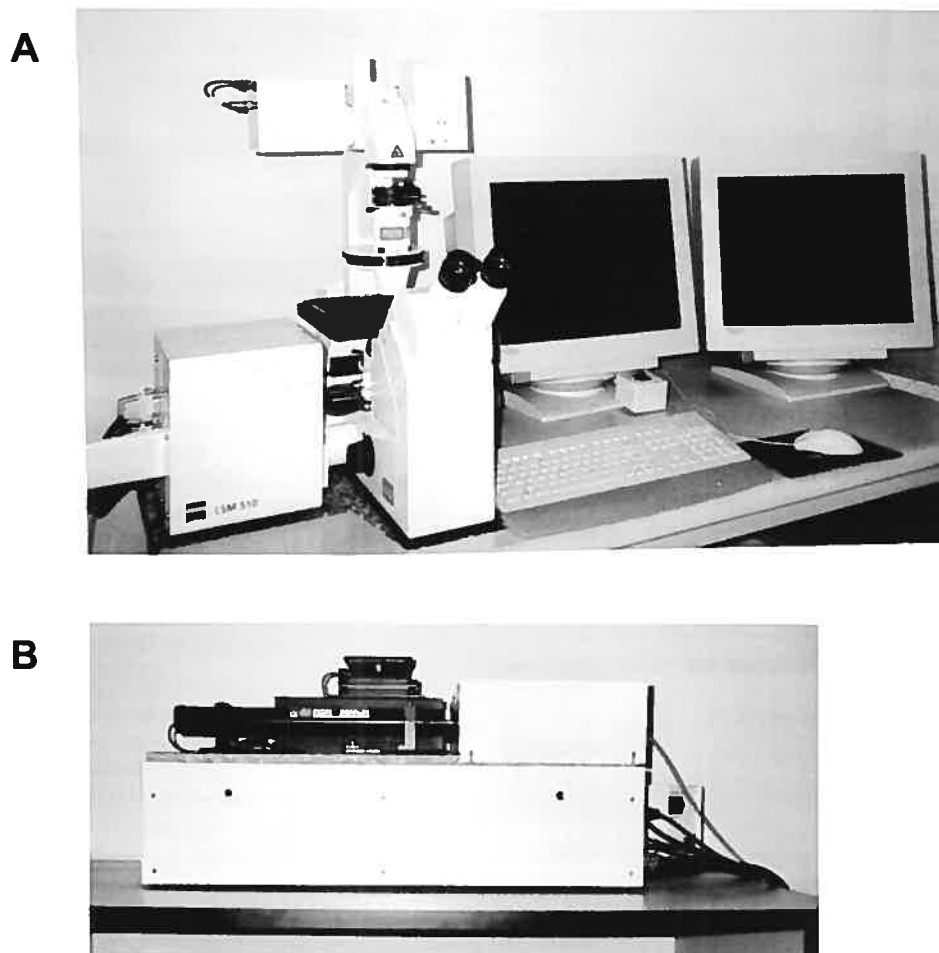
Ce système est basé sur un microscope inversé Axiovert 100 M muni des objectifs suivants : Plan Neofluar 10x/0.30, Plan Neofluar 20x/0.50, LDA-Plan 32x/0.40 et d'un objectif à immersion dans l'huile Plan Aplanachromat 63x/1.4.

Le système est équipé de deux lasers un Argon:ion de 5mW produisant trois raies majeures de 458, 488 et 514 nm et un Hélium-Néon de 1 mW produisant une raie majeure 543 nm. Les filtres BP 505-550 et LP585 permettent d'utiliser un nombre relativement grand de sondes fluorescentes. Cependant, la configuration des lasers ne permet pas l'utilisation de sondes ratiométriques. Les signaux lumineux sont convertis en images numériques par quatre convertisseurs analogique-numérique de 12 bits.

Le détecteur est constitué d'un photomultiplicateur très sensible. Ce photomultiplicateur alterne régulièrement les périodes d'observation et de repos. Cette observation à intervalles réguliers, associée au déplacement du faisceau, aboutit à un découpage de l'objet en plusieurs centaines de milliers de points. Les photons de fluorescence reçus par le photomultiplicateur sont amplifiés puis transformés en un signal électrique dont la valeur en volts est directement proportionnelle au nombre de photons reçus et qui permet la numérisation de la fluorescence. Chaque champ élémentaire de l'objet correspond ainsi à un pixel de l'image numérisée.

Cet instrument est entièrement motorisé, ce qui permet un changement rapide entre différentes méthodes ainsi que des opérations automatiques. Le système est contrôlé par un ordinateur PC Pentium. Le logiciel LSM 510 fourni par la compagnie, possède deux niveaux : l'un relativement simple mode «routine», pour permettre à l'utilisateur débutant d'exécuter des tâches ordinaires et un niveau plus avancé, «mode expert», qui donne accès à l'utilisateur aux complexités du système. Nous avons utilisé le «mode expert» pour établir les protocoles avec l'aide d'un de nos collaborateurs, le Dr. Dusan Chorvat, spécialiste en imagerie.

Le logiciel LSM 510 permet un éventail assez large de fonctions entre autres : enregistrer des images en 2D de cellules, mesures en 3D pour la détermination de volumes, filmer les cellules. Ces images sont enregistrées automatiquement dans une base de données Microsoft access.



**Figure 5. Microscope confocal à balayage laser LSM 510**

**A.** Le microscope confocal Axiovert 100 M est surmonté du système de génération de balayage LSM 510. L'ensemble du système est contrôlé par un ordinateur qui gère de multiples paramètres (vitesse de saisie, format d'image, mise au point...). **B.** Sources des lasers. Le système est équipé de deux lasers un Argon:ion d'une puissance de 5mW produisant trois raies majeures de 458, 488 et 514 nm et un Hélium-Néon d'une puissance de 1 mW produisant une raie majeure 543 nm. Ce microscope est présent dans le Laboratoire d'Innovations biotechnologiques du centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.

### 3.4. Sondes fluorescentes

#### 3.4.1. Na Green

La sonde Na Green ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 507/532 \text{ nm}$ ) est excitable par la lumière visible et permet la détermination fluorimétrique du  $\text{Na}^+$ . Nous avons utilisé la forme tétra-acétate de cette sonde qui peut diffuser à travers la membrane plasmique et de ce fait permet la détermination du  $\text{Na}^+$  intracellulaire.

La sonde Na Green consiste en un analogue de la fluorescéine lié aux atomes d'azote d'un éther en forme de couronne. La taille de la cavité de cet éther confère la sélectivité pour les ions  $\text{Na}^+$ . Suite à sa liaison au  $\text{Na}^+$ , la sonde présente une augmentation de l'intensité de sa fluorescence émise. Na Green possède une plus grande sélectivité pour le  $\text{Na}^+$  que pour le  $\text{K}^+$ . Sa longueur d'onde d'absorption est longue ce qui diminue les photodommages cellulaires éventuels car l'énergie de la lumière d'excitation est plus faible que celle de la lumière ultra-violette requise pour l'excitation des sondes marquant les ions  $\text{Na}^+$  utilisées auparavant. Dans la cellule, les estérases hydrolysent l'acétate pour le convertir une forme acide. Les groupements chargés de sa forme acide diminuent la fuite passive hors de la cellule<sup>90</sup>.

Une solution de 2.0 mM de NaGreen est préparée par dissolution dans le DMSO (Sigma, Oakville, ON, Canada) puis répartie en échantillons de 4.0  $\mu\text{L}$ . L'échantillon est ensuite dissous dans 2.0 mL de la suspension de cellules pour une concentration finale de 4.0  $\mu\text{M}$ .

Les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente NaGreen (4.0  $\mu\text{M}$ ) pendant 1h à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.4.2. Mérocyanine 540

La mérocyanine 540 ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 548/575$  nm) présente une réponse cinétique biphasique aux changements de polarisation membranaire. Elle se lie à la surface des membranes polarisées dans une orientation perpendiculaire, se réorientant quand la membrane se dépolarise pour former des dimères avec un spectre d'absorption altéré<sup>91,92</sup>. La réorientation rapide, de l'ordre des microsecondes, est suivie par une réponse plus lente causée par l'augmentation de l'incorporation de la sonde<sup>80,81</sup>.

La mérocyanine est sensible aux changements de l'organisation des lipides membranaires induits par la chaleur<sup>93</sup>. Une solution de 1.0 mM de mérocyanine est préparée avec de l'eau déionisée. Un échantillon de 2.0  $\mu\text{L}$  est ensuite dissous dans 2.0 mL de la suspension de cellules pour une concentration finale de 1.0  $\mu\text{M}$ . Les cellules sont incubées pendant 15 min à température ambiante.

Les sondes proviennent de la compagnie Molecular Probes distribuée par Invitrogen inc. Canada.

### 3.5. Mesures morphologiques

Pour les mesures morphologiques, il n'a pas été nécessaire de fixer les cellules car elles adhèrent à la lame microscopique lorsque celle-ci est nettoyée avec du méthanol.

#### 3.5.1 Mesure du volume des cardiomyocytes

Des images confocales de cellules incubées avec le Na Green ont été enregistrées à température ambiante. Ces images ont été obtenues à partir d'un balayage horizontal avec un pas de  $0.29 \times 0.29 \mu\text{m}$  et d'un balayage vertical avec un pas de  $2.0 \mu\text{m}$ . L'ouverture du «pinhole» était de  $547 \mu\text{m}$ . Le nombre de sections optiques dans la série z variait selon la cellule mais en

conservant le pas optimal défini par le système d'acquisition soit un pas de 2.0  $\mu\text{m}$ .

Ces images non traitées ont été analysées avec le logiciel LSM 5 Image Browser. L'option d'affichage orthogonal du logiciel LSM 5 Image Browser rend accessible les trois dimensions de la cellule. D'une part, cette option permet d'observer la cellule selon trois modes x-y, x-z et y-z. D'autre part, cette option d'affichage permet aussi de visualiser les différents plans obtenus par le balayage horizontal et vertical (cf. Fig .8 dans la section Résultats), selon trois degrés de mobilité x, y et z. Ainsi, les mesures de la longueur, la largeur et l'épaisseur de la cellule sont possibles. Ces mesures ont été quantifiées en utilisant l'outil «3D distance display mode» qui affiche la mesure et l'option «3D distance start point» qui permet de déterminer le point de départ de la mesure.

La longueur et la largeur ont été mesurées avec le mode visualisation x-y en choisissant, parmi tous les plans enregistrés, le plan permettant d'obtenir leur valeur maximale. En général, il s'agissait du plan correspondant au milieu de la cellule. L'épaisseur a été mesurée avec le mode de visualisation y-z qui est plus précis que le mode x-z.

Ces mesures ont permis d'estimer le volume en appliquant la formule du volume d'un cylindre elliptique telle que décrite dans nos travaux précédents<sup>95</sup>.

$$\text{Volume (pL)} = [\text{longueur } (\mu\text{m}) \times \text{largeur } (\mu\text{m}) \times \text{épaisseur } (\mu\text{m}) \times \pi / 4] \quad (1) \\ \times 10^{-3} \quad (\text{pL}/\mu\text{m}^3)$$

La mérocyanine n'a pas été utilisée pour déterminer le volume car elle générerait un certain degré de cytotoxicité. En effet, les cellules mourraient ou étaient fortement endommagées suite à des hypercontractions au cours de l'acquisition. Ceci est certainement dû à son groupement cyanure qui

interfère avec le métabolisme mitochondrial en inhibant le complexe IV de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale. Dans des cellules marquées avec la sonde Na Green et la mérocyanine, la superposition de leurs signaux attesta que la sonde Na Green se distribuait dans toute la cellule. La sonde Na Green était plus adéquate à la mesure du volume car avec les mêmes paramètres d'acquisition que ceux employés pour la mérocyanine, il n'y avait pas de perte de signal ni de cytotoxicité.

### 3.7. Détermination du nombre et de la longueur des sarcomères

Des images des cellules dans le mode transmission ont été enregistrées avec une précision de 1024 x 1024 c'est-à-dire que l'image est décomposée en 1024 lignes et 1024 colonnes que le laser va parcourir. Ces images ont une résolution élevée car le degré de précision devait être plus important pour visualiser les sarcomères et en déterminer le nombre et la longueur. Ces images n'ont pas été traitées et représentent un seul plan et non pas une moyenne de plans.

Des segments correspondant à la longueur de cinq sarcomères ont été choisis en utilisant l'outil graphique «overlay» du logiciel LSM 5 Image Browser (Fig.6). La longueur de ces segments a été mesurée à l'aide de l'option de mesure de cet outil graphique. Pour chaque cellule, les sarcomères ont été mesurés dans trois régions. La longueur des sarcomères a été déterminée à partir de la moyenne des trois segments.

La longueur moyenne d'un sarcomère ( $L_{\text{sarcomères}}$ ) de la cellule a été déterminée par l'équation suivante :

$$L_{\text{sarcomères}} (\mu\text{m}) = \frac{\text{longueur moyenne de } N \text{ segments de } n \text{ sarcomères}}{n \text{ sarcomères de ce segment}} \quad (2)$$

$N$  représente le nombre de segments de sarcomères choisi et  $n$  le nombre de sarcomères de ce segment.



Ex : Si trois segments de cinq sarcomères correspondent à une longueur respective de 8.9, 8.9 et 8.8  $\mu\text{m}$  (Fig.6), alors la longueur moyenne d'un sarcomère est :

$$L_{\text{sarcomères}} (\mu\text{m}) = \frac{\text{longueur moyenne de N segments de n sarcomères}}{n \text{ sarcomères de ce segment}}$$

$$L_{\text{sarcomères}} = [\Sigma \text{ longueurs des 3 segments de 5 sarcomères} / 3] / 5 \text{ sarcomères}$$

$$L_{\text{sarcomères}} = [(8.9 + 8.9 + 8.8) / 3] / 5 = 1.8 \mu\text{m}$$

Après avoir calculé la longueur moyenne d'un sarcomère de la cellule, le nombre de sarcomères correspondant à la longueur cellulaire ( $N_{\text{sarcomères}}$ ) peut alors être déterminé par l'équation ci-dessous :

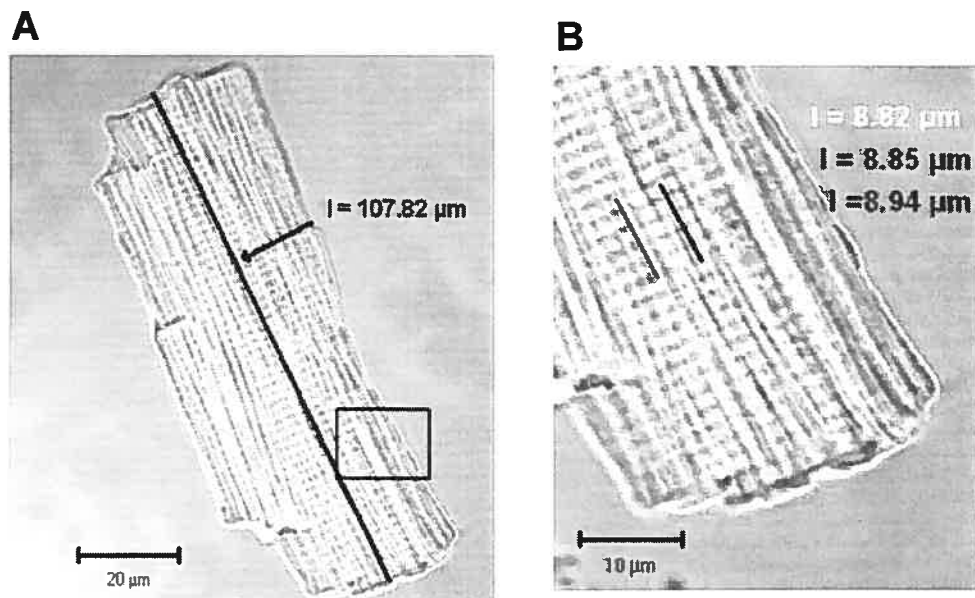
$$N_{\text{sarcomères}} = \text{longueur cellulaire} / L_{\text{sarcomères}} \quad (3)$$

Ex : Si la longueur moyenne d'un sarcomère est de 1.9  $\mu\text{m}$  dans une cellule longue de 107.9  $\mu\text{m}$  alors, le nombre de sarcomères correspondant à la longueur cellulaire est :

$$N_{\text{sarcomères}} = \text{longueur cellulaire} / L_{\text{sarcomères}}$$

$$N_{\text{sarcomères}} = 107.9 \mu\text{m} / 1.9 \mu\text{m}$$

$$N_{\text{sarcomères}} = 44 \text{ sarcomères}$$



**Figure 6. Détermination du nombre et de la longueur des sarcomères**

**A.** Cardiomyocyte de rate nullipare. L'image a été enregistrée en transmission avec une ouverture de «pinhole» de  $679 \mu\text{m}$  et un balayage horizontal  $0.14 \times 0.14 \mu\text{m}$ . La précision de l'image est de  $1024 \times 1024$ . **B.** Agrandissement de la partie encadrée en A. Les trois segments représentent cinq sarcomères. Les trois segments sont normalement choisis dans trois régions différentes de la cellule. Cependant, pour faciliter la représentation les segments ont été choisis dans la même région de la cellule.

Nous avons auparavant vérifié que nos mesures correspondaient effectivement à celles des sarcomères, en superposant les images en transmission et en fluorescence de cellules incubées avec la sonde fluorescente mérocyanine 540 (cf. Fig. 8 section Résultats). La mérocyanine n'a pas été utilisée pour les raisons mentionnées auparavant. Notre méthode de mesure des sarcomères à partir d'images en transmission a ainsi été validée.

### 3.6. Mesure du sodium intracellulaire

Les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente Na Green ( $4.0 \mu\text{M}$ ) pendant 1h à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

La calibration de la sonde a été tentée afin de déterminer la concentration du sodium intracellulaire. Ces résultats ne sont pas présentés. L'amphotéricine B a été utilisée pour perforer la membrane afin d'équilibrer le sodium. L'amphotéricine B est un ionophore qui forme des pores permettant le passage de cations monovalents. La fluorescence maximale,  $F_{\max}$  a été déterminée après saturation de la sonde avec une solution de 50 mM  $\text{Na}^+$  et  $F_{\min}$ , la fluorescence minimale, a été déterminée en absence de sodium, remplacé par 50 mM de chlorure de choline. La concentration du sodium intracellulaire,  $[\text{Na}^+]_i$ , a été calculée dans des myocytes, qui ne se contractaient pas, à température ambiante en utilisant l'équation suivante:

$$[\text{Na}^+]_i = K_D * (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (4)$$

où  $F$  est la fluorescence de la cellule et  $K_D$  la constante de dissociation de la sonde qui est une mesure de l'affinité de la sonde pour le sodium. La  $K_D$  est estimée à 21 mM à 22°C en présence de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  <sup>90</sup>.

La  $[\text{Na}^+]_i$  a été estimée à  $4.2 \pm 0.8$  mM ( $n=24$ ).

Cependant, la saturation de la sonde, chez les nullipares, était plus faible que chez les gestantes. La comparaison entre les deux groupes d'animaux ne fut par conséquent pas possible. De plus, la sonde n'est pas ratiométrique et la configuration des lasers ne permet pas l'utilisation de sondes ratiométriques.

De ce fait, il est plus juste de parler dans notre cas de changements du signal de la sonde fluorescente Na Green plutôt que de parler de changements de la  $[\text{Na}^+]_i$ . Ainsi, l'intensité des signaux fluorescents de Na Green présent dans chaque cellule été quantifiée à partir de leur profil d'intensité à l'aide du logiciel LSM 510, selon une méthode décrite dans nos travaux précédents <sup>96</sup>.

Le changement de fluorescence du Na Green été estimé de la façon suivante :

$$\Delta F_{\text{Na Green}} = (F_{\text{Na Green}} - F_{\text{arrière-plan}}) / F_{\text{arrière-plan}} \quad (5)$$

où  $F_{\text{Na Green}}$  est la fluorescence du Na Green dans la cellule et  $F_{\text{arrière-plan}}$  la fluorescence de l'arrière-plan.

L'autofluorescence, qui est la fluorescence intrinsèque des cellules, a été mesurée dans des cellules sans marquage pour s'assurer qu'une augmentation du signal de la sonde ne provenait pas d'une augmentation de l'autofluorescence.

### **3.7. Mesure des contractions**

Les cellules marquées au NaGreen ont été placées dans un bain d'un volume de 500  $\mu\text{L}$  équipé d'électrodes de stimulation en platine. Les contractions sont mesurées par la technique du «line-scan» en microscopie confocale. Cette technique consiste à choisir une ligne, dans le sens longitudinal de la cellule. Seule la ligne sélectionnée est balayée horizontalement par le laser (0.53 x 0.53  $\mu\text{m}$ ). Ainsi, cette technique permet de visualiser les changements géométriques survenant en chaque point de la ligne sélectionnée. Le nombre d'acquisitions totales était de 2500 et il n'y a avait pas de délai entre elles. L'image représente un seul plan et non pas une moyenne de plans.

Les contractions sont induites par stimulation de champ. Les cellules sont placées dans un bain de 500  $\mu\text{L}$  muni d'électrodes de platine qui transmettent des impulsions de 900 mV émises par un générateur de voltage constant DS2A-MkII (Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada) pendant 10 ms. Ce générateur d'impulsions est relié à un générateur de fréquence DG2 (Digitimer Ltd distribuée par Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada) qui permet d'induire des contractions aux fréquences de 0.5 Hz et de 6.0 Hz. La fréquence 0.5 Hz a été utilisée car elle permet un retour à l'état de repos tandis que la fréquence de 6.0 Hz est la fréquence cardiaque chez les rates<sup>25</sup>.

Les cellules sont sous perfusion du milieu extracellulaire à  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , à un débit de 1.0 mL/min. Le débit et la température sont maintenus par un système chauffant de perfusion rapide SF-28 relié à un système de contrôle de température TC-324B dont la sonde P/N TA 29 est fixée dans le bain, ce qui permet d'observer les variations éventuelles de température et par conséquent

de réajuster la température. Des tubulures de polyéthylène (avec des diamètres interne et externe de 1.4 et de 1.9 mm respectivement) ont été utilisées pour acheminer les solutions au bain (Warner Instruments, distribuée par Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada). Le surplus de volume est aspiré par une pompe péristaltique MPII (Warner Instruments, distribuée par Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada), dont l'extrémité de la tubulure est aussi fixée sur le bain. Les contractions sont induites 2 à 3 minutes avant de commencer la visualisation des cellules pour favoriser le retour à l'état stable de la cellule.

La contractilité, définie comme le pourcentage de changement de la longueur cellulaire ( $\% \Delta L_{\text{cellulaire}}$ ), a été déterminée par l'équation suivante:

$$\% \Delta L_{\text{cellulaire}} = (R_{\text{max}} - L_{\text{cell}}) / (L_{\text{cell}}) \quad (6)$$

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

#### 4. Patch-clamp

Neher et Sakmann ont mis au point la technique du «patch-clamp» en 1981<sup>97</sup>. Cette technique permet d'étudier les courants circulant à travers des canaux individuels d'un petit morceau de membrane appelé «patch». Le terme «clamp» est utilisé car le potentiel membranaire est maintenu à une valeur déterminée pendant l'enregistrement des courants ioniques.

Une pipette de verre, ayant une extrémité d'environ 1  $\mu\text{m}$ , est placée au contact de la membrane. L'application d'une légère succion dans la pipette permet d'obtenir un scellement serré, de telle sorte que la résistance électrique de part et d'autre du morceau de membrane est l'ordre du gigaohm,

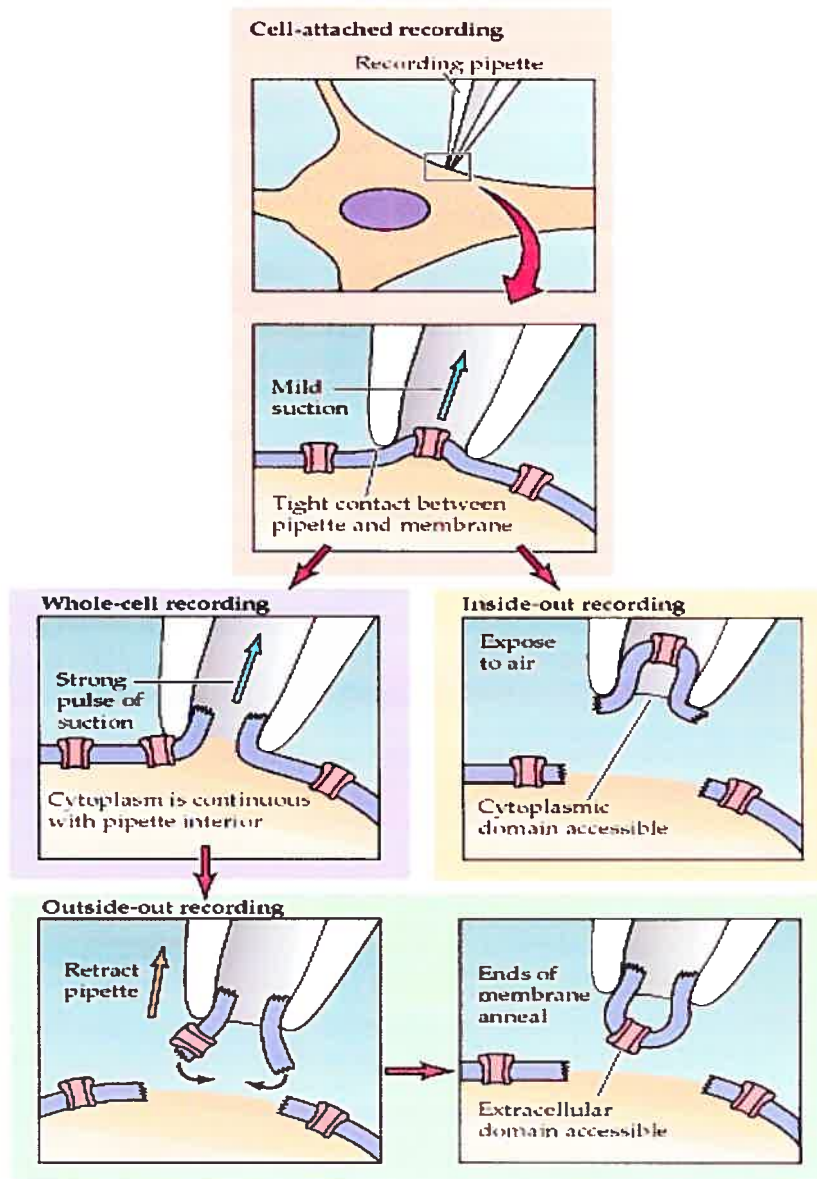
ce qui permet d'isoler électriquement ce morceau de membrane du reste de la membrane cellulaire. Ainsi, seuls les courants traversant les canaux présents dans le « patch » passeront à travers la pipette. Ces courants ioniques peuvent alors être mesurés à l'aide d'un amplificateur connecté à la pipette, puis étudiés. Etant donné que les courants sont enregistrés quand le morceau de membrane est attaché au reste de la membrane cellulaire, on parle alors d'une configuration « cellule attachée » (ou « cell attached »). Il est évident que suivant la dimension du « patch », le morceau de membrane peut renfermer un ou plusieurs canaux ioniques de nature identique ou différente<sup>58,98</sup>.

Il existe différentes configurations du patch-clamp (Fig.7). Si la membrane sous la pipette est rompue par l'application d'une succion brève et forte, une connexion électrique est établie entre la pipette et le cytoplasme de la cellule. Cette configuration permet d'enregistrer les courants de toute la cellule et de ce fait est dite « cellule entière » (ou encore « whole cell »)<sup>58,98,99</sup>. La configuration « cellule entière » rend possibles les échanges entre la pipette et le milieu intracellulaire, fournissant une méthode pratique pour injecter des substances dans la cellule<sup>99</sup>.

Il est aussi possible d'exciser les fragments de membrane sans rompre le scellement dans deux configurations distinctes. En tirant sur la pipette qui est dans la configuration « cellule attachée », une petite vésicule membranaire reste attachée à la pipette. L'exposition de la pointe de la pipette à l'air entraîne l'ouverture de la vésicule qui reforme ensuite un morceau de membrane dont le côté intracellulaire se retrouve au contact du milieu. Cette configuration est dite « inside-out » (ce qui signifie « l'intérieur à l'extérieur »)<sup>98,99</sup>.

De la même façon, tirer sur une pipette, dans la configuration « cellule entière », entraîne la formation d'un morceau de membrane dont le côté extracellulaire est exposé au milieu. Cette configuration est dite « outside-

out» (qui signifie «l'extérieur à l'extérieur») <sup>97,100</sup>. L'avantage de ces méthodes de «patch» excisé est de pouvoir modifier la composition du milieu auquel la surface membranaire est exposée. Il devient alors possible de tester les effets de différentes molécules intracellulaires, dans la configuration « inside-out », ou extracellulaires dans la configuration « outside-out », sur l'activité des canaux <sup>100</sup>.



**Figure 7. Les quatre configurations de la technique du patch-clamp**  
Extrait de Purves, D et al. Neurosciences. © Sinauer Associates, Inc. 2001.

Toutes nos expériences ont été réalisées en patch perforé dans la configuration «cellule entière», la pipette était remplie d'une solution intracellulaire contenant l'amphotéricine B qui favorise l'accès électrique de la pipette au milieu intracellulaire<sup>100</sup>. L'amphotéricine B est un antibiotique qui se lie aux lipides membranaires pour former des pores permettant le passage de cations monovalents<sup>101</sup>. Cette spécificité des pores possède l'avantage de conserver les molécules régulatrices dans le milieu intracellulaire. En configuration cellule entière, étant donné que la portion de la membrane sous la pipette est rompue, les courants calciques diminuent très souvent des enregistrements car le milieu intracellulaire et la solution de la pipette se mélangent<sup>102</sup>. Avec l'amphotéricine B, ce problème est éliminé et de longs enregistrements de courants calciques sont possibles, ce qui était particulièrement intéressant dans notre cas pour mesurer les courants  $I_{Ca-L}$ .

Les cardiomyocytes ont été incubés pendant 15 min à la température ambiante avec du BAPTA-AM (10  $\mu$ M) (Sigma, Oakville, ON, Canada), un chélateur des ions  $Ca^{2+}$  qui minimise les variations du calcium intracellulaire. Les pipettes ont été fabriquées à partir de filaments de verre de borosilicate (GC150TF-15, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, QC, Canada) afin d'obtenir une résistance initiale de 1 M $\Omega$ , lorsque remplies de la solution intracellulaire. Ces pipettes possèdent une ouverture relativement grande de 2  $\mu$ m environ car l'accès électrique est de moins bonne qualité en patch perforé. Malgré cela, cet accès électrique chez les cellules de rates gestantes était plus difficile à obtenir.

Les cellules étaient placées dans un bain d'un volume de 500  $\mu$ L. Les solutions extracellulaires (cf. section 5. Solutions. Tableau II) sont perfusées par gravité à un débit de 1.0 mL. min<sup>-1</sup> et chauffées à  $35 \pm 1^\circ$ C, par un système chauffant de perfusion rapide, le SHM-6, dont l'extrémité possède un volume mort est 30  $\mu$ L (Warner Instruments, distribuée par Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada). Des tubulures de polyéthylène (avec



un diamètre interne et externe de 1.57 et 1.14 mm respectivement) ont été utilisées pour acheminer les solutions (Warner Instruments, distribuée par Harvard Apparatus Saint-Laurent, QC, Canada). Les autres éléments du système de perfusion et la pompe péristaltique sont identiques à ceux décrits dans la section 3.5 Mesure des contractions.

Les potentiels d'action ont été enregistrés dans le mode dit courant imposé et les courants ioniques membranaires dans le mode dit voltage imposé, avec l'amplificateur Axopatch 200B et le convertisseur analogique-numérique Digidata 1322 A (Axon instruments, Foster City, CA, USA). Lors des enregistrements des courants ioniques, le potentiel membranaire a été maintenu à -40 mV pour empêcher l'activation des canaux sodiques et que ceux-ci ne puissent interférer dans les enregistrements. La densité des courants ioniques enregistrés a été rapportée à la valeur la capacité membranaire de chaque cellule (exprimée en pF). Ainsi, la différence de taille entre les cellules n'affecte pas la valeur de la densité des courants enregistrés. Les courants ioniques sont par conséquent exprimés en pA/pF.

Les cellules dont les courants de fuite étaient de 250 pA ou plus ont été exclues. Le logiciel Clampex 9.0 a été utilisé pour établir les protocoles de stimulation ainsi que pour l'acquisition des données (Axon instruments, Foster City, CA, USA). Tous les enregistrements ont été effectués avec une fréquence de filtrage des signaux de 2 KHz à l'exception de ceux de la capacité membranaire dont la fréquence était de 10 KHz.

L'analyse de tous les enregistrements a été effectuée avec le logiciel Clampfit 9.0 (Axon instruments, Foster City, CA, USA).

## 5. Solutions

### 5.1 Solutions pour l'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche

Les solutions sont préparées avec de l'eau déionisée, la veille de l'expérience (Tableau I). Cependant, l'ajout des enzymes dans la solution se fait le jour de l'expérience. Les volumes finaux des solutions sont indiqués entre parenthèses. Les volumes des solutions de CaCl<sub>2</sub> et EGTA sont suffisants pour deux expériences et celui de la solution d'enzymes pour une expérience. Les solutions sont conservées à 4°C.

**Tableau I. Composition des solutions pour l'isolement des cardiomyocytes du ventricule gauche**

	<i>Isolement des cardiomyocytes</i>			
	Tyrode (1000 mL)	Tyrode + CaCl <sub>2</sub> (400 mL)	Tyrode + EGTA (250 mL)	Tyrode + enzymes (50 mL)
NaCl <sup>a</sup>	130.0	130.0	130.0	130.0
KCl <sup>a</sup>	5.4	5.4	5.4	5.4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.4	0.4
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	1.4	1.4	1.4	1.4
Taurine <sup>a</sup>	20.0	20.0	20.0	20.0
Créatine <sup>a</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
Glucose <sup>a</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
CaCl <sub>2</sub> <sup>a</sup>	–	0.75	–	0.05
EGTA <sup>a</sup>	–	–	0.1	–
BSA % <sup>a</sup>	–	–	–	1.0
Collagénase (mg) <sup>b</sup>	–	–	–	42.0
Protéase <sup>a</sup> (mg)	–	–	–	3.0
HEPES <sup>a</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
pH	7.30 (NaOH 1.0M) <sup>a</sup>			

Les concentrations sont exprimées en mM sauf exception.

<sup>a</sup> Sigma, Oakville, ON, Canada ; <sup>b</sup> Worthington, Lakewood, NJ, USA.

## 5.2 Milieu extracellulaire

Les solutions sont préparées avec de l'eau déionisée et sont conservées à 4°C (Tableau II). La solution extracellulaire standard a été utilisée pour l'étude morphologique et celle de la contractilité des cardiomyocytes ainsi que pour les enregistrements de patch perforé en conditions témoins. Le milieu faible en KCl a été utilisé pour enregistrer le courant de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Ces solutions extracellulaires peuvent être conservées à 4°C pour une durée maximale de deux semaines.

La solution standard a été additionnée de BaCl<sub>2</sub> (1.0 mM) pour inhiber les courants potassiques  $I_{K1}$  et de CdCl<sub>2</sub> (0.3mM) pour l'inhibition des courants calciques de type L lors des enregistrements en patch perforé. La strophantidine (0.05 mM) a été ajoutée à la solution standard pour inhiber la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. L'ajout de ces trois composés s'effectue le jour même de l'expérience.

**Tableau II. Composition de la solution extracellulaire**

	<i>Milieu extracellulaire</i>	
	Standard	Faible en KCl
NaCl	140.0	140.0
KCl	5.4	0.5
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
Glucose	10.0	10.0
CaCl <sub>2</sub>	2.0	2.0
HEPES	10.0	10.0
pH	7.35 (NaOH 1.0M)	

Les concentrations sont exprimées en mM. Les produits proviennent de la compagnie Sigma (Oakville, ON, Canada).

### 5.3 Remplissage de la pipette de patch perforé

La solution de remplissage exempte d'amphotéricine est préparée avec de l'eau déionisée pour un volume de 50 mL (Tableau III). Ce volume est réparti en échantillons de 1.0 mL qui sont ensuite congelés à -20°C.

Il est préférable que la préparation de la solution d'amphotéricine s'effectue sous un éclairage minimum car l'amphotéricine est sensible à la lumière. Une solution de 500 mM d'amphotéricine est préparée en dissolvant 2.5 µg d'amphotéricine dans 30 µL de DMSO. L'amphotéricine est cependant difficile à dissoudre et forme des agrégats. Ainsi, la dissolution complète est achevée par deux ou trois passages de 3 min dans un sonicateur. La solution est répartie en échantillons de 3.0 µL qui sont recouverts de papier d'aluminium avant d'être congelés à -20°C. Chaque échantillon sera dissous dans 1.0 mL de la solution sans amphotéricine pour une concentration finale d'amphotéricine de 250 µM.

**Tableau III. Composition de la solution pour le remplissage de la pipette de patch perforé**

<i>Remplissage de la pipette de patch perforé</i>	
NaCl	10.0
KCl	20.0
CaCl <sub>2</sub>	1.0
L-glutamate	120.0
HEPES	10.0
Amphotéricine B	0.25
pH	7.25 (KOH 1.0M)

Les concentrations sont exprimées en mM. Tous les produits proviennent de la compagnie Sigma (Oakville, ON, Canada).

## 6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel OriginLab™ (OriginLab Corporation Northampton, MA USA). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Elles ont été comparées en utilisant le test t de Student. Les résultats ont été considérés comme significatifs (\*) si  $p < 0.05$ .

### **III. RESULTATS**

### ***III. RESULTATS***

---

#### **1. Morphologie des cardiomyocytes**

Le volume des cardiomyocytes a été déterminé à partir d'images tridimensionnelles en microscopie confocale, les cellules ayant été préalablement incubées avec la sonde fluorescente Na Green (Fig 8.A).

Le volume des cardiomyocytes augmente lors de la gestation de  $38.80 \pm 2.4$  pL (n = 27) à  $46.3 \pm 2.7$  pL (n = 26 ; p<0.05), (Tableau IV).

D'après l'équation (1) (cf. 3.5.1 Mesure du volume des cardiomyocytes dans la section Matériel et Méthodes), le volume est le produit de trois paramètres morphologiques, la longueur, la largeur et l'épaisseur, qui peuvent par conséquent contribuer à cette expansion volumique. Dans notre cas, l'accroissement volumique résulte essentiellement d'un allongement cellulaire : la longueur moyenne d'un cardiomyocyte chez les rates nullipares étant de  $120.9 \pm 2.5$   $\mu\text{m}$  (n = 27) et de  $128.1 \pm 2.8$   $\mu\text{m}$  (n = 28 ; p<0.05), chez les rates gestantes (Tableau IV).

Le sarcomère est l'unité contractile des cardiomyocytes et est constitué de filaments d'actine et de myosine. Leur nombre et longueur ont été déterminés à partir d'images en transmission (Fig 8.B).

Le nombre de sarcomères augmente mais cette augmentation n'est pas significative :  $64.0 \pm 1.0$  (n = 37) chez les nullipares et  $67.0 \pm 2.0$  (n = 29) chez les gestantes (Tableau IV).

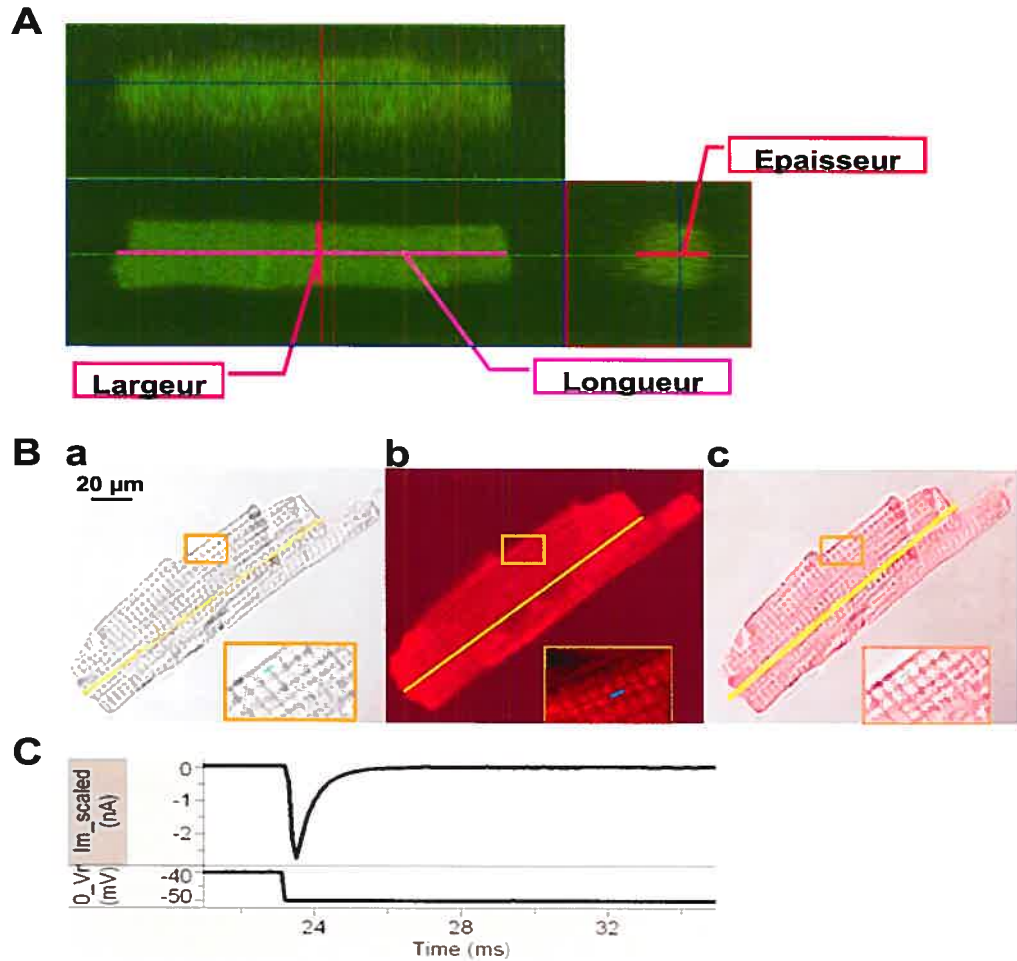
La longueur des sarcomères est par contre identique entre les deux groupes :  $1.9$   $\mu\text{m}$  chez les nullipares (n = 37) et les gestantes (n = 29 ; p<0.05.) (Tableau IV).

La capacité membranaire est un indicateur de la surface membranaire totale, la majorité des membranes ont une capacité de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . La capacité membranaire peut être déterminée à partir du courant capacitif des cellules. Ainsi, le courant capacitif de chaque cellule été enregistré en patch perforé à  $35^\circ\text{C}$ , en réponse à une impulsion hyperpolarisante de 10 mV, les cellules étant maintenues à un potentiel de -40mV. La capacité membranaire a été calculée à partir de l'intégrale du courant capacitif enregistré et en divisant par 10 mV, voltage imposé à la cellule (Fig 8.C).

Bien que la valeur de la capacité soit augmentée, la différence n'est pas significative entre les rates nullipares et les gestantes:  $134.7 \pm 8.8$  pF (n = 35) chez les rates nullipares vs  $144.0 \pm 8.6$  pF (n = 17 ;  $p < 0.05$ ) chez les rates gestantes (Tableau IV).

Le rapport volume/capacité a été déterminé afin d'estimer la part de la surface membranaire que représentent les invaginations du sarcolemme appelées tubules transverses («t-tubules») et identifier une diminution ou une augmentation du périmètre membranaire. Ce facteur est similaire entre les deux groupes :  $0.29$  pL / pF chez les nullipares et  $0.32$  pL / pF chez les gestantes (Tableau IV). La surface membranaire attribuée aux «t-tubules» doit par conséquent être dans les mêmes proportions pour les cellules des rates gestantes et nullipares.





**Figure 8. Morphologie des cardiomyocytes**

**A.** Représentation tridimensionnelle d'un cardiomyocyte de rate nullipare incubé avec la sonde fluorescente Na Green ( $4.0\mu\text{M}$ ). Une série de plans confocaux de la cellule a été enregistrée à la température de la pièce suite à un balayage tridimensionnel du laser ( $0.29 \times 0.29 \times 2.0 \mu\text{m}$ ) et avec une ouverture de «pinhole» de  $547 \mu\text{m}$ . **B.** Cardiomyocyte de rate nullipare **(a)** sans marquage, **(b)** avec la mérocyanine 540 ( $1.0 \mu\text{M}$ ) et **(c)** en superposition. Cette image, enregistrée en transmission à la température ambiante, représente un seul plan obtenu à partir d'un balayage bidimensionnel du laser ( $0.14 \times 0.14 \mu\text{m}$ ), avec une ouverture de «pinhole» de  $679 \mu\text{m}$ . L'encadré représente un agrandissement d'une partie de la cellule et de ses sarcomères. **C.** Le courant capacitif a été enregistré en patch perforé à  $35^\circ\text{C}$ , en réponse à une stimulation hyperpolarisante de  $10 \text{ mV}$ . Les cellules étaient maintenues à un potentiel de  $-40 \text{ mV}$ . La capacité membranaire a été déterminée en calculant l'intégrale du courant enregistré et en divisant sa valeur par  $10 \text{ mV}$ , voltage qui a été appliqué.

**Tableau IV. Effet de la gestation sur la morphologie des cardiomyocytes**

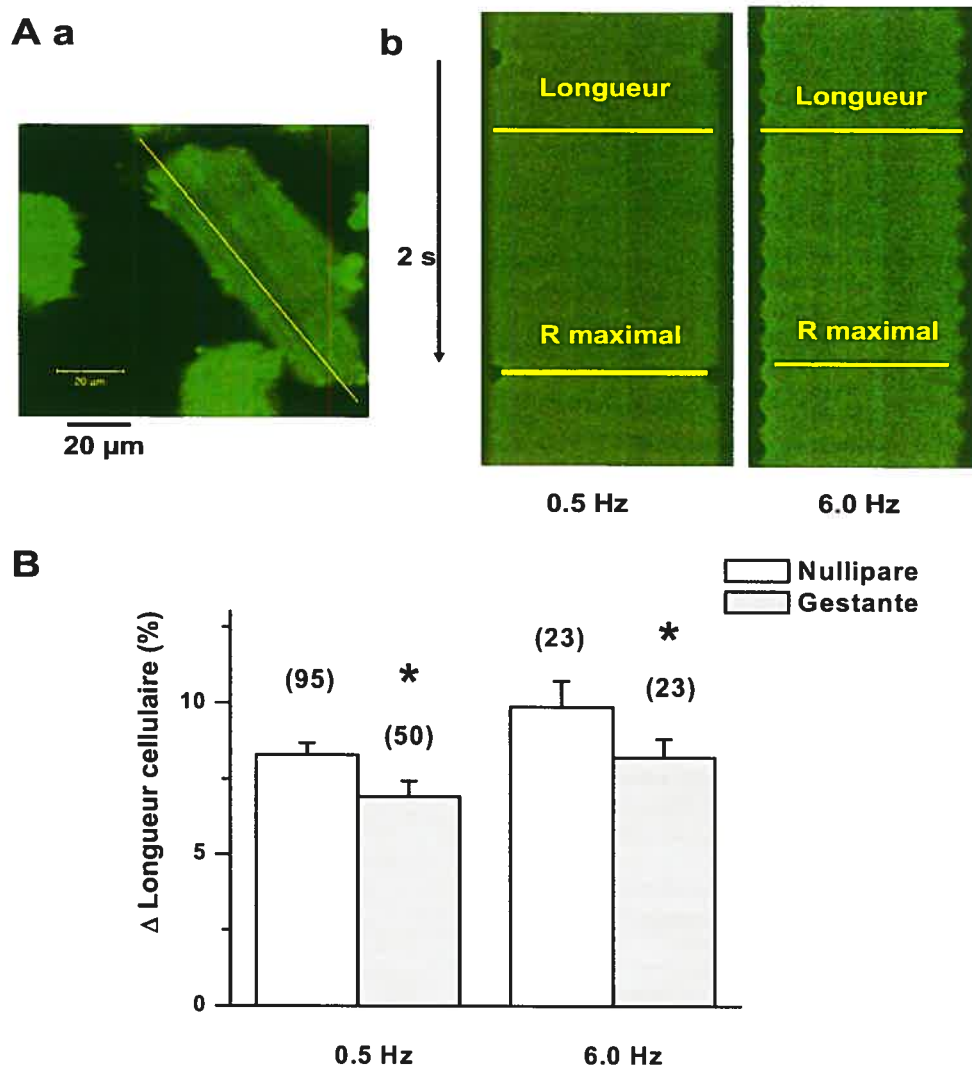
	<b>Nullipares</b>	<b>Gestantes</b>
Longueur cellulaire ( $\mu\text{m}$ )	120.9 $\pm$ 2.5 (n = 27)	128.1 $\pm$ 2.8* (n = 26)
Largeur cellulaire ( $\mu\text{m}$ )	28.7 $\pm$ 1.4 (n = 27)	29.4 $\pm$ 1.5 (n = 26)
Epaisseur cellulaire ( $\mu\text{m}$ )	14.5 $\pm$ 0.6 (n = 27)	15.9 $\pm$ 0.6 (n = 26)
Volume (pL)	38.8 $\pm$ 2.4 (n = 27)	46.3 $\pm$ 2.7 * (n = 26)
Longueur des sarcomères ( $\mu\text{m}$ )	1.9 $\pm$ 0.0 (n = 37)	1.9 $\pm$ 0.0 (n = 29)
Nombre de sarcomères	64.0 $\pm$ 1.0 (n = 37)	67.0 $\pm$ 2.0 (n = 29)
Capacité membranaire (pF)	134.7 $\pm$ 8.8 (n = 35)	144.0 $\pm$ 8.6 (n = 17)
Ratio volume/capacité (pL / pF)	0.29	0.32

Tous les paramètres morphologiques mis à part la capacité ont été déterminés à partir d'images en microscopie confocale (cf. Fig.8A et B). La capacité membranaire a été mesurée en patch perforé à 35°C (Fig.8C). Le nombre entre parenthèses représente le nombre de cellules. \*p<0.05.

## 2. Contractilité des cardiomyocytes

Les contractions induites par stimulation de champ sont mesurées par la technique du «line-scan» en microscopie confocale (Fig.9.A.a). Les cellules sont stimulées en réponse à des impulsions de 900 mV d'une durée de 10 ms. aux fréquences de 0.5 et de 6.0 Hz à 35°C (Fig.9.A.b).

La contractilité des cardiomyocytes a significativement diminué chez les rates gestantes tant à 0.5 qu'à 6.0 Hz (Fig.9.B). En effet, à la fréquence de 0.5 Hz, le pourcentage de changement de la longueur cellulaire est de  $8.3 \pm 0.4$  % (n = 95) chez les nullipares et de  $6.9 \pm 0.5$  % chez les gestantes (n = 50 ; p < 0.05). A la fréquence de 6.0 Hz, ce pourcentage est de  $9.9 \pm 0.9$  % (n = 23) chez les nullipares et de  $8.2 \pm 0.6$  % chez les gestantes (n = 23 ; p < 0.05).



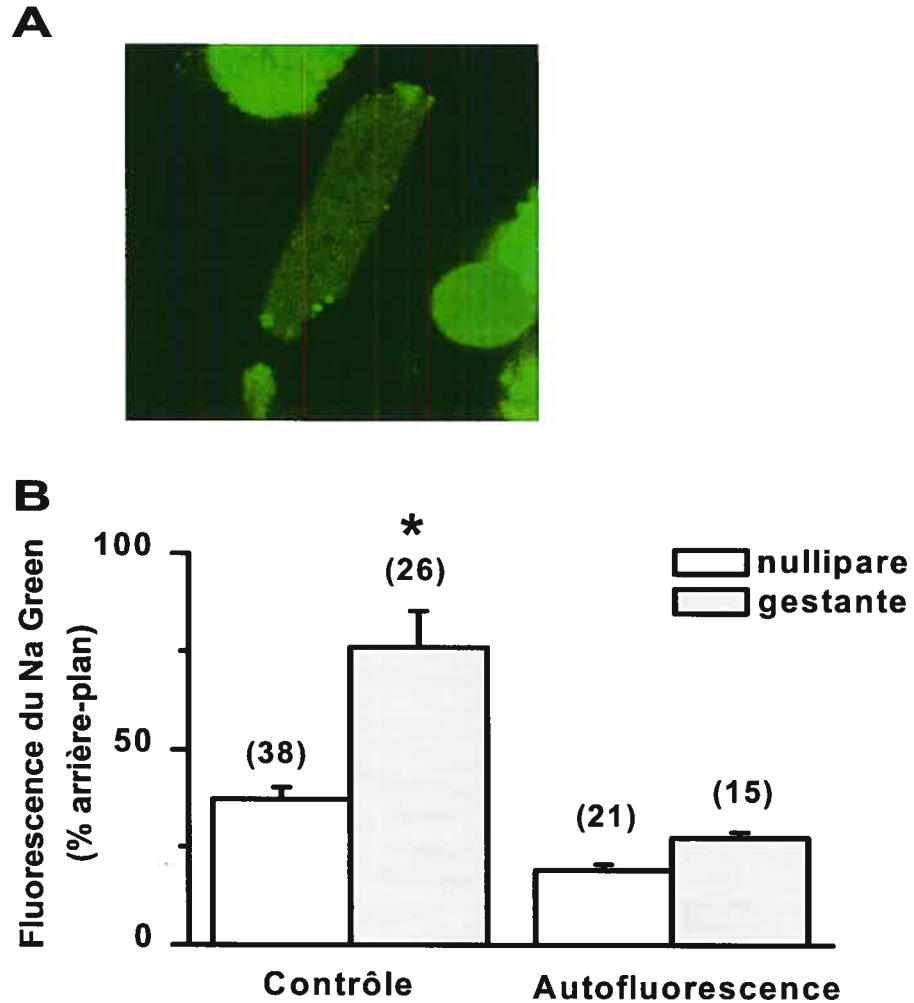
**Figure 9. Effet de la gestation sur la contractilité des cardiomyocytes**

**A.** Les contractions sont mesurées par la technique du «line-scan» en microscopie confocale. La ligne a été balayée horizontalement par le laser ( $0.53 \times 0.53 \mu\text{m}$ ) avec une ouverture de «pinhole»  $679 \mu\text{m}$ . Les 2500 acquisitions ont été effectuées en continu (**a**). Les contractions sont induites aux fréquences de 0.5 et 6.0 Hz, par stimulation de champ à l'aide d'un générateur de fréquences. Le milieu extracellulaire est perfusé à la température de  $35^\circ\text{C}$  (**b**). **B.** La contractilité est déterminée par cette équation :  $\% \Delta L_{\text{cellulaire}} = (R_{\text{max}} - L_{\text{cellulaire}}) / (L_{\text{cellulaire}})$ , où  $L_{\text{cellulaire}}$  représente la longueur cellulaire,  $\% \Delta L_{\text{cellulaire}}$  le pourcentage de changement de la longueur cellulaire et  $R_{\text{max}}$  correspond au raccourcissement maximal de la longueur lors de la contraction. Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules. \* $p < 0.05$ .

### 3. Homéostasie du sodium

#### 3.1 $\text{Na}^+$ intracellulaire

La sonde fluorescente Na Green est un marqueur du  $\text{Na}^+$  intracellulaire (Fig.10.A). Cependant, étant donné que la calibration appropriée de cette sonde n'a pas pu être effectuée, la concentration de  $\text{Na}^+$  intracellulaire,  $[\text{Na}^+]_i$ , n'a pas pu être déterminée. Ainsi, l'intensité des signaux fluorescents de Na Green présent dans chaque cellule été quantifiée. De ce fait, il est plus juste de parler dans notre cas de changements du signal de la sonde fluorescente Na Green plutôt que de parler de changements de la  $[\text{Na}^+]_i$ . Le signal de la sonde Na Green augmente dans les cardiomyocytes de rates gestantes (Fig.10.B). L'autofluorescence des cellules tant dans les cellules de nullipares que de gestantes est restée stable.



**Figure 10. Effet de gestation sur l'homéostasie du sodium**

**A.** Cardiomyocyte de rate nullipare incubé avec la sonde fluorescente Na Green ( $4.0\mu\text{M}$ ) qui marque le  $\text{Na}^+$  intracellulaire. L'image représente un plan résultant d'un balayage horizontal de  $0.29 \times 0.29 \mu\text{m}$ , l'ouverture de «pinhole» étant de  $679 \mu\text{m}$ . **B.** L'autofluorescence a été mesurée dans des cellules sans marquage. La fluorescence relative du Na Green a été estimée de la façon suivante :

$\Delta F_{\text{Na Green}} = (F_{\text{Na Green}} - F_{\text{arrière-plan}}) / F_{\text{arrière-plan}}$ , où F est la fluorescence du Na Green de la cellule et  $F_{\text{arrière-plan}}$  la fluorescence de l'arrière-plan. La fluorescence a été quantifiée à l'aide du logiciel LSM 510. Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules. \* $p < 0.05$ .

### 3.2 La pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase : son courant $I_{\text{Na,K}}$ et son inhibition

Le courant de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $I_{\text{Na,K}}$ , a été enregistré en patch perforé (Fig.11.A.a). Avant l'enregistrement, pendant au moins 5 min, les cellules sont placées dans un milieu extracellulaire faible en potassium contenant 0.5 mM de KCl pour inhiber la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui est activée par le  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ . Ce milieu est additionné de  $\text{BaCl}_2$  (1.0 mM) pour inhiber les courants potassiques  $I_{\text{K1}}$  et de  $\text{CdCl}_2$  (0.3mM) pour inhiber les courants calciques  $I_{\text{Ca-L}}$ . Les cellules sont alors maintenues à un potentiel de -40 mV.

Ce milieu, peu après le début de l'enregistrement qui dure 1 min, est rapidement remplacé par le milieu extracellulaire standard contenant 5.4 mM de KCl et les inhibiteurs susmentionnés. Ce changement rapide est effectué manuellement à l'aide d'un système de perfusion rapide (cf. 4.Patch-clamp de la section Matériel et méthodes). Les cellules sont alors maintenues à -20 mV. Cette augmentation rapide de  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  entraîne l'activation maximale de toutes les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase présentes dans la membrane cellulaire. Cela se manifeste sur l'enregistrement par le pic du courant  $I_{\text{Na,K}}$  (Fig.11.A.a).

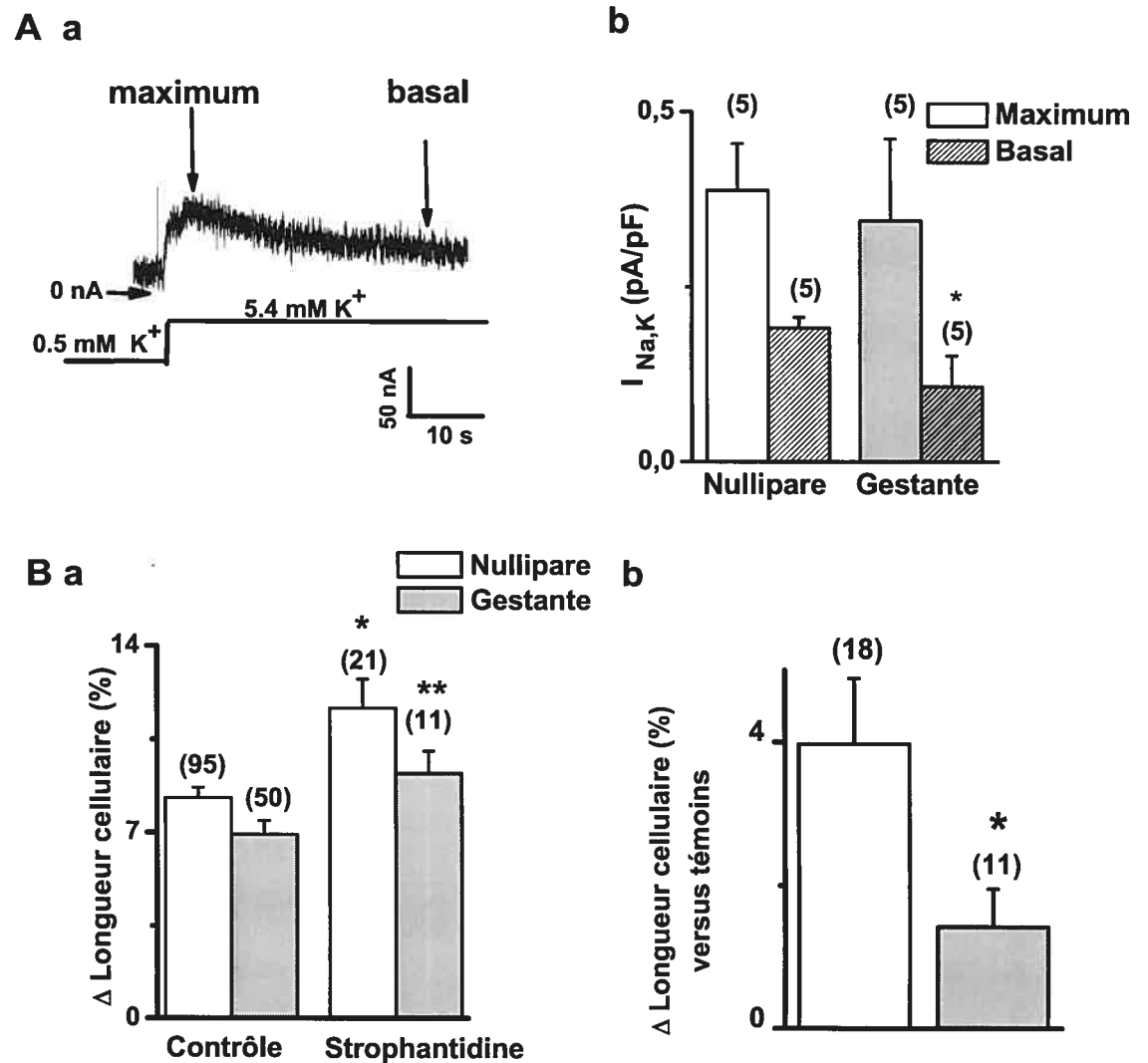
Le courant  $I_{\text{Na,K}}$  maximum a été déterminé par la différence entre la valeur du courant maximum (au pic) et celle du courant en présence de 0.5 mM de KCl. Ce courant maximal est transitoire et le courant  $I_{\text{Na,K}}$  revient à une valeur stable quand les cellules ont rétabli le gradient électrochimique de  $\text{K}^+$ . Ainsi, le courant  $I_{\text{Na,K}}$  basal a été déterminé par la différence entre la valeur du courant après le retour à l'état stable et celle du courant en présence de 0.5 mM de KCl (Fig.11.A.b).

La densité du courant maximum n'est pas significativement altérée pendant la gestation. Par contre, le courant basal diminue chez les rates gestantes.

La strophantidine (0.05 mM) est un inhibiteur de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dérivé de la oubaïne. Elle induit une augmentation de la contractilité autant dans les cellules de nullipares que celles des gestantes, lorsque la contractilité est comparée aux témoins de chaque groupe. Ainsi, le pourcentage de changement de la longueur cellulaire augmente dans les cellules de nullipares, en présence de strophantidine, de  $8.3 \pm 0.4 \%$  (n = 95) à  $11.7 \pm 1.1 \%$  (n = 21,  $p < 0.05$ ) et dans les cellules de gestantes de  $6.9 \pm 0.5 \%$  (n = 50) à  $9.2 \pm 0.9 \%$  (n = 11,  $p < 0.05$ ) (Fig.11.Ba).

Cependant, cet effet de la strophantidine est moins marqué dans les cardiomyocytes de rates gestantes lorsque comparés à ceux des nullipares. En effet, le pourcentage de changement de la longueur cellulaire n'augmente que de  $1.4 \pm 0.5 \%$  (n = 11), alors que celui des cardiomyocytes des rates nullipares augmente de  $4.0 \pm 0.9 \%$  (n = 18,  $p < 0.05$ ) (Fig.11.Bb).





**Figure 11. Altération de l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase lors de la gestation**

**A.** Le courant  $I_{Na,K}$  a été enregistré en patch perforé à 35°C, en présence de BaCl<sub>2</sub> (1.0 mM) et CdCl<sub>2</sub> (0.3mM), les cellules étant maintenues à -20 mV. Le courant a été activé par une augmentation rapide de [K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> de 0.5 à 5.4 mM (**a**). Le courant  $I_{Na,K}$  maximum a été défini comme la différence entre la valeur du courant maximum (au pic) et celle du courant en présence de 0.5 mM de KCl. Le courant  $I_{Na,K}$  basal a été déterminé comme la différence entre la valeur du courant à l'état stable et celle en présence de 0.5 mM de KCl (**b**). **B.** Effet de la strophantidine (50 μM), inhibiteur de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, sur la contractilité des cardiomyocytes des rates gestantes et nullipares (**a**). Comparaison de l'effet de la strophantidine chez les gestantes vs les nullipares (**b**). Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules. \* et \*\* p<0.05.

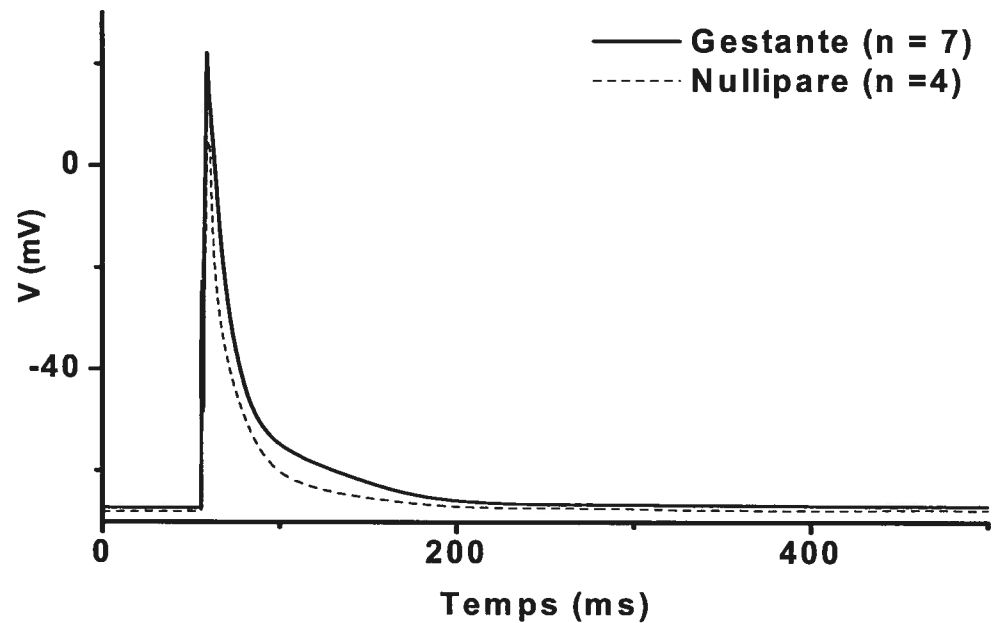
## 4. Potentiel d'action et courants des cardiomyocytes

### 4.1 Potentiel d'action

Le potentiel d'action a été enregistré en patch-clamp perforé à 35°C dans le mode dit courant imposé, «I<sub>clamp</sub>», suite à l'application, toutes les 2 s, de faibles courants d'environ 1 nA, permettant de dépasser la valeur seuil du potentiel membranaire. Le protocole de stimulation consistait en une série de trente enregistrements, d'une durée de 1s chacun. Pour chaque cellule, la moyenne de ces trente enregistrements a été effectuée à l'aide du logiciel Clampfit 9.0, afin d'obtenir un enregistrement final. La figure 12 représente la moyenne des enregistrements finaux des cellules de chaque groupe. Les cellules, qui ne présentaient pas «d'overshoot» (partie du potentiel d'action supérieure à 0 mV suite à l'activation des canaux sodiques) et celles qui n'ont pas généré un potentiel d'action sur la totalité des trente enregistrements, ont été exclues.

Les cardiomyocytes des rates nullipares et gestantes avaient été préalablement incubés avec du BAPTA-AM (10 µM) pour minimiser les variations du calcium intracellulaire et par conséquent inhiber les contractions spontanées.

Un ralentissement de la phase de repolarisation du potentiel d'action est observé chez les rates gestantes (Fig.12). Le potentiel de repos des rates gestantes et des rates nullipares est par contre similaire :  $-68.4 \pm 0.8$  mV (n = 14) chez les rates nullipares et de  $-67.9 \pm 1.3$  mV (n = 17) chez les gestantes (Fig.12).



**Figure 12. Effet de la gestation sur le potentiel d'action des cardiomyocytes**

Le potentiel d'action a été enregistré dans le mode courant imposé suite à l'application de courants de l'ordre de 1 nA, toutes les 2 s pendant 1s. Le protocole consistait en une série de trente enregistrements dont la moyenne constitue un enregistrement final pour chaque cellule. La figure représente la moyenne des enregistrements finaux des cellules. Les cardiomyocytes des rates nullipares et gestantes avaient été incubés au préalable avec du BAPTA-AM (10  $\mu$ M) et par conséquent ne se contractaient pas. Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules.

#### 4.2 Courants potassiques sortants $I_{to}$ et $I_{sus}$

Les courants  $I_{to}$  et  $I_{sus}$  ont été enregistrés en patch perforé à 35°C et en présence de  $CdCl_2$  (0.3 mM) dans le milieu extracellulaire. Chaque impulsion est induite toutes les 5 s et dure 562 ms. Le potentiel membranaire passe de -80 à +80 mV par étape de 10 mV, les cellules étant maintenues à -40mV (Fig.13.A). Le courant  $I_{to}$  a été déterminé par la différence entre la valeur du courant maximum et la celle en fin d'impulsion à 560 ms. Le courant  $I_{sus}$  correspond au courant en fin d'impulsion.

La densité du courant  $I_{to}$  diminue dans les cellules de rates gestantes. Cette différence est significative de +50 mV à +80 mV où la densité de  $I_{to}$  est 1.5 fois plus petite dans les cellules de rates gestantes que dans celles des nullipares  $p < 0.05$ , (Fig 13.B.a). Quant au courant  $I_{sus}$ , sa densité n'est pas significativement altérée lors de la gestation (Fig 13.B.b).

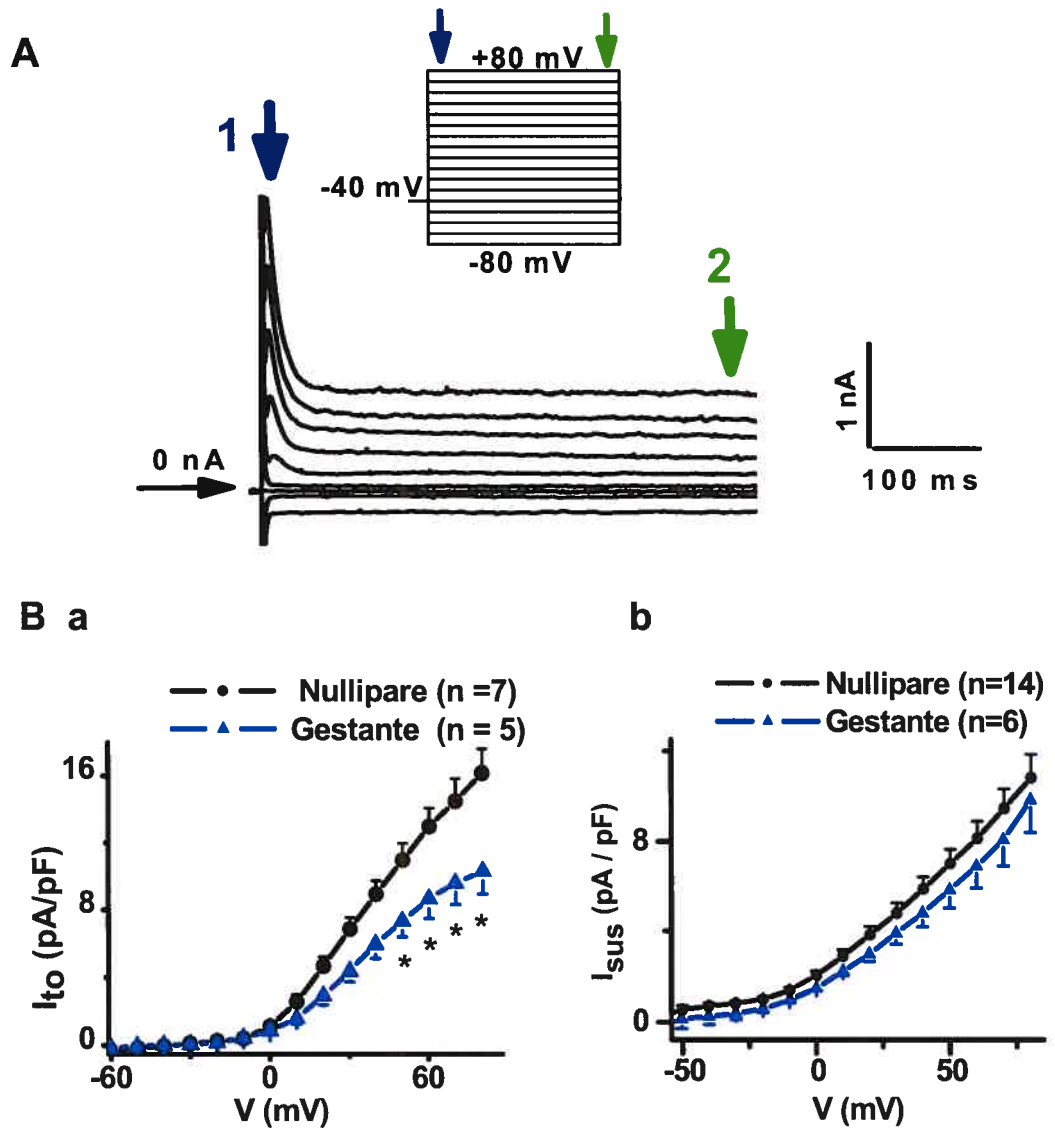
Les propriétés d'inactivation du courant  $I_{to}$  ont été déterminées à partir d'un protocole en deux étapes : la première étape consiste en l'application du même protocole de stimulation que celui employé pour l'activation et la seconde est une repolarisation de la cellule à +50 mV pendant 200 ms (Fig.14.A). Il était de ce fait possible d'obtenir à partir d'un enregistrement d'obtenir les caractéristiques de l'activation et celles de l'inactivation des courants  $I_{to}$ .

L'amplitude du courant  $I_{to}$  à +50 mV a été normalisée avec la valeur de la densité du courant  $I_{to}$  à -80 mV. La courbe d'inactivation a été établie en fonction de la valeur du potentiel de pré-impulsion c'est-à-dire celle du potentiel de la première étape de stimulation et la courbe de tendance a été effectuée en utilisant une régression de Boltzmann (Fig.14.A).

La courbe d'inactivation de  $I_{to}$  est décalée vers la droite, c'est-à-dire déplacée vers des potentiels plus dépolarisants dans les cardiomyocytes de rates

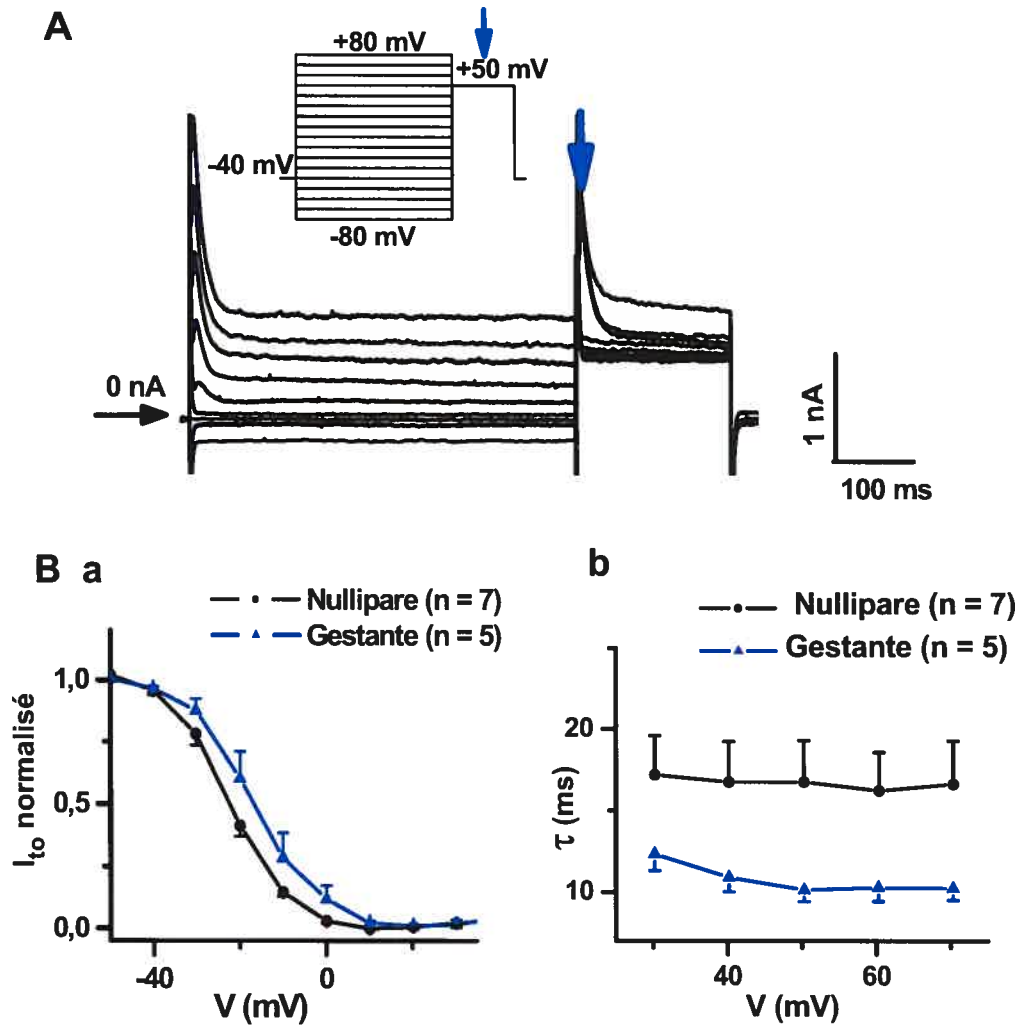
gestantes (Fig 14.B.a). En effet, le potentiel correspondant à la moitié de l'inactivation,  $V_{1/2}$  est de  $-23.5 \pm 0.7$  mV ( $n = 7$ ) dans les cellules de rates nullipares et de  $-18.2 \pm 1.5$  mV ( $n = 5$ ) pour celles des rates gestantes.

$\tau$ , la constante de décroissance de  $I_{to}$ , a été déterminée par une fonction mono-exponentielle pour les valeurs de potentiel membranaire de 30 à 70 mV (Fig 14. B.b). La constante  $\tau$  diminue lors de la gestation mais ce changement n'est pas significatif. La constante  $\tau$  est en moyenne de  $10.8 \pm 0.8$  ms ( $n = 5$ ) dans les cardiomyocytes de rates gestantes et de  $16.7 \pm 2.5$  ms ( $n = 7$ ) dans ceux de rates nullipares.



**Figure 13 Effet de la gestation sur l'activation des courants potassiques sortants  $I_{to}$  et  $I_{sus}$**

A. Les courants  $I_{to}$  et  $I_{sus}$  ont été enregistrés à 35°C en patch perforé en présence de  $CdCl_2$  (0.3 mM). Chaque impulsion est induite toutes les 5 s et dure 562 ms. Le potentiel membranaire passe de -80 à 80 mV par étape de 10 mV, les cellules étant maintenues à -40 mV, (cf. protocole de stimulation présenté au-dessus). 1. amplitude du courant maximum lors de l'activation 2. courant en fin d'impulsion B. Relation I/V de  $I_{to}$  :  $I_{to}$  a été défini comme la différence entre la valeur du courant maximum en A.1 et celle en fin d'impulsion en A.2 (a). Relation I/V de  $I_{sus}$  :  $I_{sus}$  correspond au courant en fin d'impulsion en A.2 (b). Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules. \* $p < 0.05$ .



**Figure 14.** Effet de la gestation sur l'inactivation des courants potassiques sortants  $I_{to}$

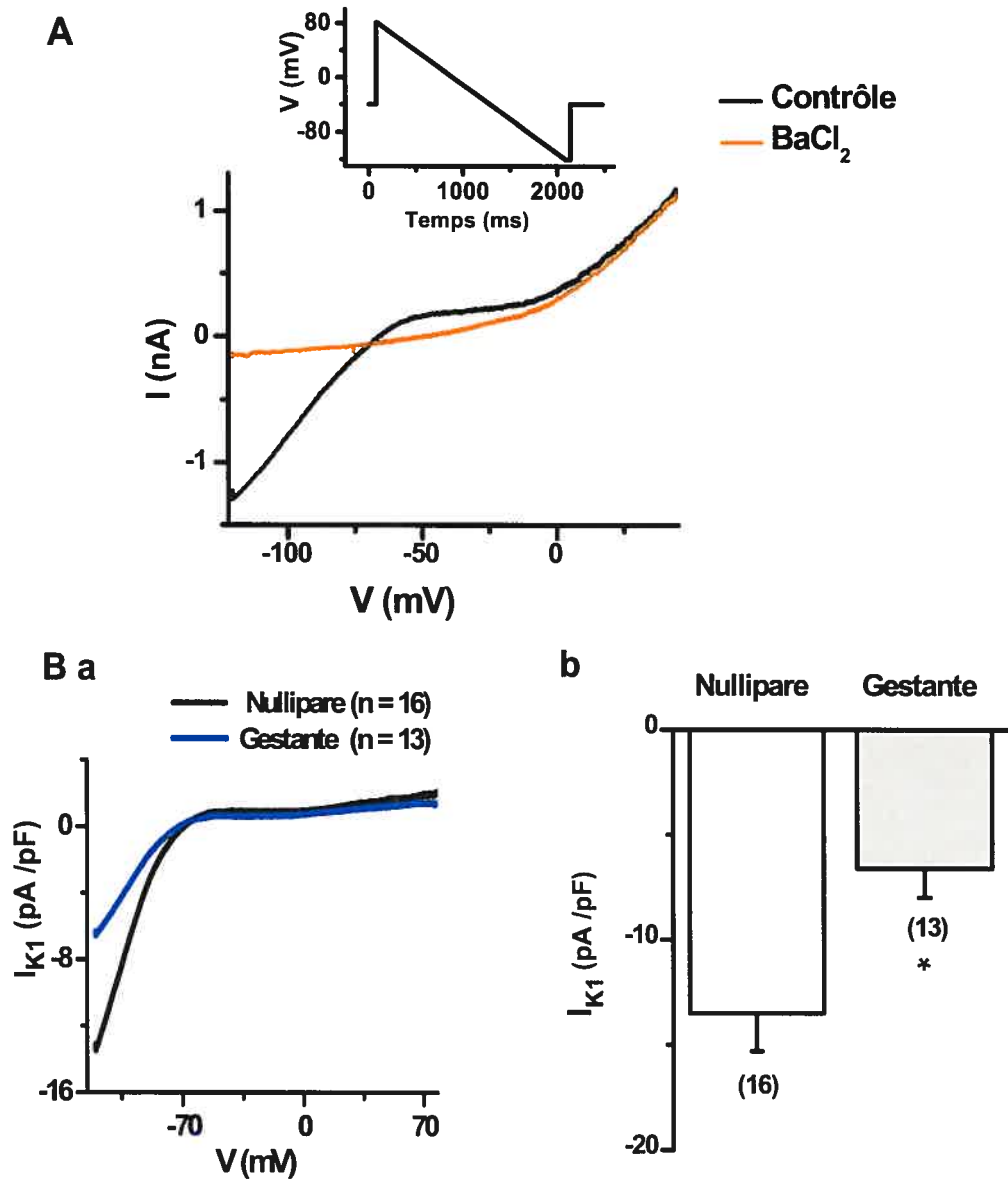
**A.** Les courants  $I_{to}$  ont été enregistrés à 35°C en patch perforé en présence de  $\text{CdCl}_2$  (0.3 mM). L'inactivation du courant  $I_{to}$  a été déterminée à partir d'un protocole en deux étapes : la première consiste en l'application du même protocole de stimulation que celui de l'activation du courant  $I_{to}$  (cf. Fig.13) et la seconde est une repolarisation à +50 mV pendant 200 ms. La flèche bleue indique le courant maximum lors de l'inactivation de  $I_{to}$ . **B.** La densité de  $I_{to}$  à +50 mV a été normalisée avec la valeur de sa densité à -80 mV. La courbe d'inactivation a été établie en fonction de la valeur du potentiel de pré-impulsion. La courbe de tendance a été effectuée en utilisant une régression de Boltzmann (a).  $\tau$ , la constante de décroissance de  $I_{to}$ , a été déterminée par une fonction mono-exponentielle (b). Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules.

### 4.3 Courants potassiques sortants $I_{K1}$

Le courant  $I_{K1}$  a été enregistré en patch perforé à 35°C, suite à un protocole de stimulation qui consistait en une rampe de voltage passant de 80 à -120 mV, appliquée toutes les 10 s, à une vitesse de 100 mV/s, les cellules étant maintenues à -40 mV (Fig.15.A). Ce courant est caractérisé par une rectification entrante importante et une petite composante sortante entre -60 et -20 mV. Les composantes entrante et sortante de  $I_{K1}$  ont été complètement inhibées par le BaCl<sub>2</sub> (1.0 mM) (Fig.15. A). Le courant  $I_{K1}$  est déterminé par la différence entre les courants ioniques en absence et en présence de BaCl<sub>2</sub> (1.0 mM) dans le milieu extracellulaire

La relation I-V de  $I_{K1}$  révèle une diminution significative de sa densité lors de la gestation (Fig 15. B.a). Lorsque comparée à -120 mV, potentiel membranaire correspondant à l'activation maximale des courants potassiques  $I_{K1}$ , la densité moyenne de  $I_{K1}$  est deux fois plus petite chez les gestantes que chez les nullipares (Fig 15. B.b). En effet, dans les cardiomyocytes de rates gestantes, la densité du courant  $I_{K1}$  est de  $6.6 \pm 1.4$  pA / pF (n = 13) et de  $13.5 \pm 1.8$  pA / pF (n = 16, p < 0.05) dans les cellules de rates nullipares.





**Figure 15.** Effet de la gestation sur les courants potassiques entrants  $I_{K1}$

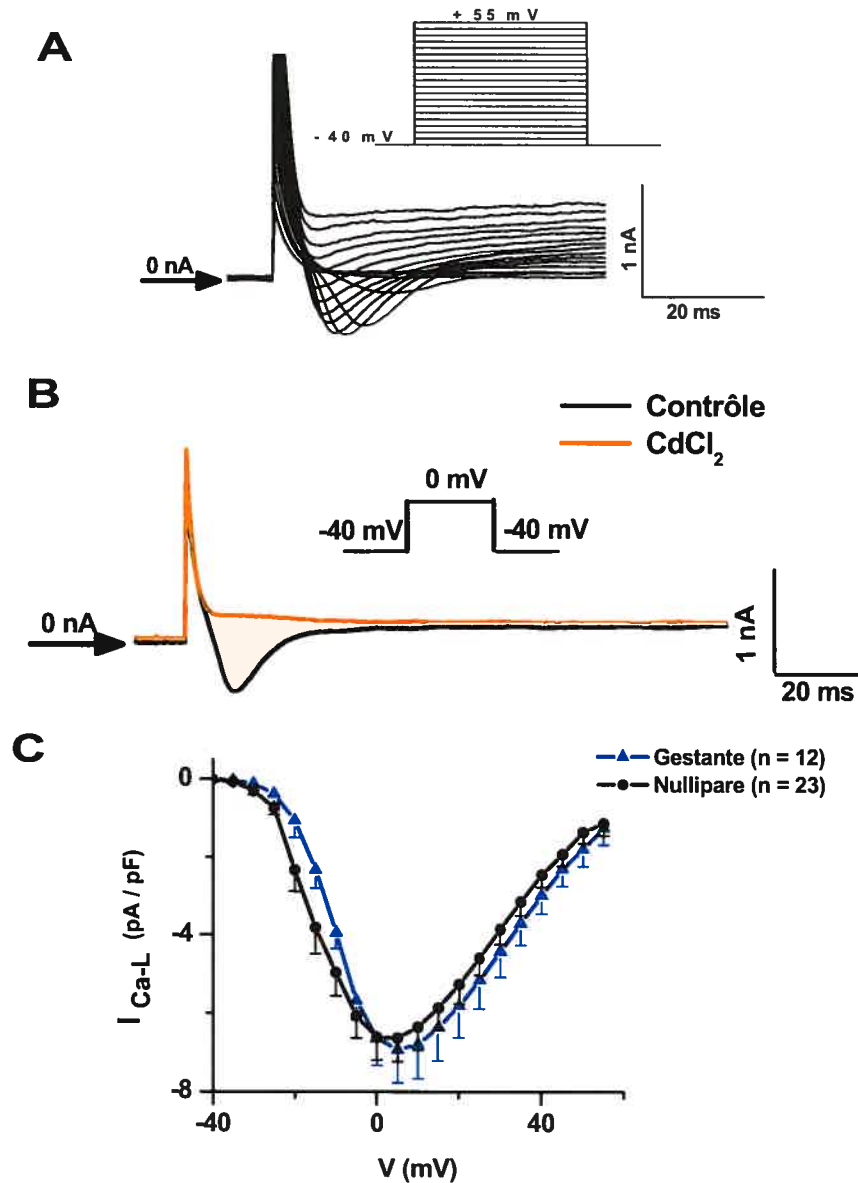
A. Le courant  $I_{K1}$  a été enregistré en patch perforé à 35°C, suite à un protocole de stimulation qui consiste en une rampe de voltages passant de +80 à -120 mV, à une vitesse de 100 mV/s, les cellules étant maintenues à -40 mV. Le courant  $I_{K1}$  a été inhibé par le BaCl<sub>2</sub> (1.0 mM). Il a été enregistré dans la même cellule en absence et en présence de BaCl<sub>2</sub> dans le milieu extracellulaire. B.  $I_{K1}$  est déterminé par la différence entre les courants en absence et en présence de BaCl<sub>2</sub> (a). Comparaison de la densité moyenne de  $I_{K1}$  à -120 mV dans les cardiomyocytes de rates gestantes et nullipares (b). \* $p < 0.05$ .

#### 4.4 Courants $I_{Ca-L}$

Les courants  $I_{Ca-L}$  ont été enregistrés en patch perforé à 35°C. Chaque impulsion est induite toutes les 2 s et dure 600 ms. Le potentiel membranaire passe de -40 à +55 mV par étape de 5 mV, les cellules étant maintenues à -40mV La capacité membranaire n'a pas été compensée (Fig.16.A).

Le courant  $I_{Ca-L}$  a été complètement inhibé par l'ajout de  $CdCl_2$  (0.3mM) (Fig.16.B). Le courant  $I_{Ca-L}$  est déterminé par la différence entre la valeur du courant maximum et la celle en fin d'impulsion à 600 ms, plutôt que par la différence entre la présence et l'absence de  $CdCl_2$  car certains enregistrements étaient contaminés par l'activation du courant potassique  $I_{to}$ .

La courbe I-V du canal calcique de type-L montre que la densité du courant  $I_{Ca-L}$  n'est pas significativement affectée dans les cellules de rates gestantes (Fig.16.C).



**Figure 16. Effet de la gestation sur les courants calciques de type L  $I_{Ca-L}$**   
**A.**  $I_{Ca-L}$  a été enregistré en patch perforé à 35°C. Chaque impulsion est induite toutes les 2 s et dure 600 ms. Le potentiel membranaire passe de -40 à 55 mV par étape de 5 mV (cf. protocole de stimulation au-dessus), les cellules étant maintenues à -40 mV. La capacité n'a pas été compensée. **B.** Inhibition de  $I_{Ca-L}$  par ajout de  $CdCl_2$  (0,3 mM) dans le milieu extracellulaire. Les courants sont enregistrés dans la même cellule selon les conditions présentées en **A**. et sont comparés à 0 mV. **C.** La relation I/V du courant  $I_{Ca-L}$  déterminé par la différence entre la valeur du courant maximum et celle en fin d'impulsion. Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cellules.\* $p < 0.05$ .

## **IV. DISCUSSION**

## ***IV. DISCUSSION***

---

La grossesse est associée à des altérations importantes de la charge hémodynamique et par conséquent représente une opportunité unique d'étudier les effets d'une augmentation transitoire de la charge hémodynamique sur le cœur. L'hypertrophie du ventricule gauche développée par le cœur, qui est une réponse adaptative à ces changements, fait de la grossesse un excellent modèle d'hypertrophie physiologique.

Afin de mieux comprendre ce que représentent ces changements au niveau cellulaire, nous avons étudié à l'échelle d'un cardiomyocyte, les altérations morphologiques et fonctionnelles du ventricule gauche chez la rate en fin de gestation.

### **Morphologie des cardiomyocytes en fin de gestation**

Le volume des cardiomyocytes augmente chez les rates gestantes par rapport aux nullipares et cet accroissement résulte essentiellement d'un allongement cellulaire. Cette croissance en longueur concorde avec les caractéristiques d'un remodelage de type excentrique.

De part la définition de l'hypertrophie excentrique, l'élongation des cardiomyocytes est la conséquence de la synthèse de sarcomères en série <sup>39</sup>. Or, bien que supérieur à celui des rates nullipares, le nombre de sarcomères des rates gestantes n'est pas significativement différent. Néanmoins, on constate que la différence de longueur cellulaire entre les deux groupes est de 7.0  $\mu\text{m}$  environ. Selon nos résultats le remodelage n'affecte pas la longueur des sarcomères qui est la même entre les deux groupes à savoir 1.9  $\mu\text{m}$ , la longueur également mesurée par Semb et coll. <sup>103</sup>. De ce fait, une longueur

de 7.0  $\mu\text{m}$  représente l'ajout de 3-4 sarcomères, ce qui correspond à l'augmentation du nombre de sarcomères des cardiomyocytes des rates gestantes. Ainsi, l'accroissement du nombre de sarcomères pourrait être un des mécanismes impliqués dans le remodelage morphologique des cardiomyocytes. L'ensemble de ces résultats permet de suggérer que les cardiomyocytes subissent un remodelage de type excentrique lors de la grossesse. Ce remodelage est aussi observé aussi chez les femmes enceintes<sup>47</sup> et s'apparente à celui observé chez les athlètes féminines soumises à un exercice d'endurance<sup>35,104</sup>.

La membrane des cardiomyocytes présente un nombre important d'invaginations appelées tubules-transverses. Pour tenir compte de ce facteur morphologique lors de notre détermination de la surface membranaire totale, nous avons mesuré la capacité membranaire. L'accroissement de la capacité membranaire, bien qu'il ne soit pas significatif, concorde avec l'augmentation du volume. Etant donné que les cellules proviennent de toute la paroi myocardique, les variations de taille cellulaire entre les différentes couches du myocarde sont certainement responsables de la valeur élevée de l'écart-type. Dans les expériences futures, nous étudierons séparément les cellules des différentes couches du myocarde.

Le rapport volume/capacité permet d'évaluer la surface cellulaire utilisée par les tubules-transverses, «t-tubules», et de déterminer si il y a eu une expansion ou une réduction de la membrane des tubules-transverses<sup>105</sup>. Ce facteur est important car les altérations des tubules-transverses sont associées à des dysfonctionnements du couplage excitation-contraction<sup>105</sup>. Ce rapport est similaire pour les cellules des rates gestantes et nullipares. Cela permet de suggérer que les «t-tubules» occupent la même quantité de surface membranaire chez les gestantes et les nullipares. Etant donné que le volume des cellules des rates gestantes a augmenté, pour que ce rapport demeure équivalent à celui des rates nullipares, l'accroissement de la surface des

«t-tubules» s'est probablement mis en place en conservant une certaine proportionnalité qui a permis de conserver l'intégrité de la structure cellulaire.

De plus, en associant ce résultat à celui de la longueur des sarcomères qui est aussi similaire entre les deux groupes, il est possible d'envisager que la structure de l'appareil contractile est conservée. Ces données témoignent que le remodelage excentrique observé est physiologique puisque la désorganisation des sarcomères est une des particularités de l'hypertrophie cardiaque pathologique<sup>106</sup>.

Aucune étude n'est parue à ce jour, sur les changements morphologiques des cardiomyocytes lors de la gestation chez la rate. Les voies de signalisation impliquées restent à découvrir. Cependant, une des voies envisageables serait celle présentée par Wang et Proud<sup>107</sup>. Ils ont démontré que l'hormone nommée endothéline et la catécholamine appelée phényléphrine, via leurs récepteurs couplés à une protéine Gq, activent la synthèse protéique menant à l'hypertrophie cardiaque chez le rat. Cette action impliquerait la déphosphorylation du facteur d'élongation EF2, une protéine qui, sous la forme déphosphorylée, médie l'étape de translocation de la synthèse peptidique.

### **Les altérations de l'homéostasie du sodium**

La concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$ ,  $[\text{Na}^+]_i$  est régulée dans les cardiomyocytes par l'équilibre entre les mécanismes d'influx et d'efflux de  $\text{Na}^+$ . Dans les cellules le gradient électrochimique favorise l'influx de  $\text{Na}^+$ . Cette énergie est utilisée par de nombreux systèmes de transport comme les canaux  $\text{Na}^+$  et les transporteurs qui couplent le transport du  $\text{Na}^+$  à ceux d'autres ions et molécules. Ainsi, la régulation de la  $[\text{Na}^+]_i$  est importante pour le fonctionnement des cardiomyocytes.

La gestation semble induire une altération de l'homéostasie du sodium car la fluorescence de la sonde Na Green qui marque le  $\text{Na}^+$  intracellulaire, augmente chez les rates gestantes. Cette augmentation de  $\text{Na}^+$  intracellulaire pourrait être impliquée dans des changements osmotiques qui induiraient l'augmentation du volume cellulaire que nous avons mesurée.

L'homéostasie du sodium est contrôlée par le SRAA chez le rat et l'humain. Or, la grossesse est associée à une activation plus importante du SRAA qui mène à une augmentation de la production d'aldostérone<sup>108</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que les cardiomyocytes possédaient un système endocrinien capable de synthétiser l'aldostérone. Ces données permettent de suggérer que le SRAA dans les cardiomyocytes soit plus actif lors de la grossesse, ce qui expliquerait une rétention de sodium plus élevée<sup>109</sup>.

Etant donné que les ions ne peuvent entrer dans la cellule que par diffusion facilitée ou active, pour augmenter la rétention de sodium, il faut agir sur ses systèmes de transport. Au niveau des cardiomyocytes, il existe plusieurs voies d'entrée du  $\text{Na}^+$  (les canaux  $\text{Na}^+$ , les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ .....). Cependant, la voie principale de sortie du  $\text{Na}^+$  dans les cellules est la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Une augmentation de la  $[\text{Na}^+]_i$  devrait faire intervenir une altération de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

En effet, la densité du courant basal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase diminue chez les rates gestantes. La densité du courant maximum n'est par contre pas significativement affectée par la gestation. Un plus grand nombre de cellules serait toutefois nécessaire pour en avoir la certitude. Ces résultats permettent de suggérer que l'activité des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases présentes sur la membrane des cardiomyocytes des gestantes et nullipares est similaire mais que l'hypertrophie cellulaire en changeant leur position dans la membrane a peut-être altéré leur efficacité d'action.



La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase est localisée dans le sarcolemme périphérique et dans les tubules-transverses. Chez le rat, l'isoforme  $\alpha_1$  est surtout exprimée dans les tubules-transverses, tandis que  $\alpha_2$  est se retrouve dans le sarcolemme et les tubules-transverses <sup>110</sup>. Le niveau d'expression des différentes isoformes et/ou leur localisation cellulaire pourrait avoir des conséquences physiologiques.

Les inhibiteurs de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dérivés de la ouabaine, tels que la strophantidine, sont connus pour l'augmentation de la contractilité qu'ils induisent : l'augmentation de la  $[\text{Na}^+]_i$  résultante entraîne l'inversion du mode fonctionnement de NCX et par conséquent augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . C'est l'effet qu'a induit la strophantidine pour augmenter la contractilité dans les cellules des nullipares et des gestantes. Son effet est néanmoins moins important chez les gestantes.

Les isoformes de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ont une affinité différente pour la ouabaine et ses dérivés. Chez le rat, l'isoforme  $\alpha_1$  est 100 fois plus résistante à cette inhibition que  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . Cette affinité est par contre similaire entre les différentes isoformes de la sous-unité  $\alpha$  chez l'humain. Il a été démontré que l'hypertrophie cardiaque pathologique est associée à des changements d'expressions des isoformes de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, notamment  $\alpha_2$  est remplacée par  $\alpha_3$  qui est exprimée surtout lors du développement et dans les cœurs néonataux <sup>77</sup>. Etant donné que toute combinaison des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  donne lieu à la formation d'une protéine fonctionnelle, il est possible que le remodelage hypertrophique de la grossesse induise l'expression d'une isoforme particulière de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ayant moins d'affinité pour la strophantidine. Cette possibilité pourrait être vérifiée par un immunobuvardage.

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pourrait aussi être à l'origine du remodelage hypertrophique observé lors de la grossesse. En effet, il a été démontré que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pourrait servir d'intermédiaire dans la transduction du signal depuis la membrane jusqu'aux organelles via des interactions avec différentes protéines. Au niveau des cardiomyocytes, les différentes voies de signalisation qu'elle médie résultent en l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1 et  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , la régulation de gènes impliqués dans la croissance, (tels que celui de l'ANP, de la sous-unité  $\alpha_3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et de l' $\alpha$ -actine), la stimulation de la synthèse protéique et par conséquent l'hypertrophie des myocytes.

Ces différentes cascades de réactions peuvent être activées par une inhibition partielle et non toxique par la ouabaïne ou par ses dérivés et sont indépendantes des variations de la  $[\text{Na}^+]_i$  et de la  $[\text{K}^+]_i$ <sup>119-124</sup>. Ainsi, la liaison d'un dérivé endogène de la ouabaïne lors de la gestation pourrait expliquer l'augmentation de la  $[\text{Na}^+]_i$  et l'effet réduit de la strophantidine chez les gestantes, si son site de liaison est déjà occupé. Or, la présence chez le rat d'un dérivé endogène de la ouabaïne à des concentrations sous-nanomolaires proche des concentrations circulantes chez l'humain a été démontrée<sup>124</sup>. De plus, l'hypertrophie cardiaque chez le rat peut être induite par la perfusion de la ouabaïne<sup>124</sup>. Il serait intéressant de mesurer la concentration des dérivés de la ouabaïne dans le sang ou l'urine des rates gestantes pour évaluer si leur concentration augmente lors de la grossesse.

### **Contractilité des cardiomyocytes en fin de gestation**

L'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  consécutive à l'inhibition de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase constitue un second messager pour la voie d'activation de l'hypertrophie induite par la ouabaïne et la régulation des gènes qui lui sont associés. Cette observation et l'augmentation de la  $[\text{Na}^+]_i$  dans nos cellules, permettent de suggérer qu'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et par conséquent de la

contractilité devraient se produire dans les cellules de rates gestantes. Cependant, une diminution de la contractilité a été observée dans les cellules de rates gestantes. Une utilisation plus importante du  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou une augmentation de son stockage dans les réserves intracellulaires telles que le RS ou les mitochondries pourraient être en lien avec la diminution de contractilité.

D'ailleurs, les travaux en cours dans notre laboratoire permettent d'envisager un lien entre les altérations du métabolisme mitochondrial durant la gestation et les changements de contractilité<sup>95</sup>. En effet, les cellules de rates gestantes présentent une réponse plus faible à l'octanoate, un agent activateur du métabolisme mitochondrial, qui diminue la contractilité chez les rates nullipares. Il en est de même pour le cyanure, un inhibiteur du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui augmente la contractilité chez les rates nullipares<sup>95</sup>.

Le développement de la contraction dépend de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>81,112,113</sup>. Or, l'apport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques de type L ne semble pas affecter la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  car il n'y a pas de différence significative au niveau de la densité du courant  $I_{\text{Ca-L}}$ . Le décalage visible sur les courbes I-V est dû au fait que l'accès électrique à la membrane était plus difficile avec les cellules de rates gestantes. En effet, les membranes nécessitaient non seulement une succion plus forte que celles des nullipares pour réaliser le scellement, mais aussi étaient plus fragiles car elles se brisaient plus facilement au cours de la succion. Cependant, l'intervalle entre le début de l'enregistrement et le maximum de la densité de  $I_{\text{Ca-L}}$  («time to peak interval») est d'environ 10 à 15 ms, ce qui est comparable aux valeurs obtenues par Volk et coll<sup>114</sup> chez la rate.

Les études précédentes concernant l'effet de l'hypertrophie cardiaque sur la densité de  $I_{\text{Ca-L}}$  montrent une augmentation<sup>113</sup>, une diminution<sup>115</sup> ou encore

aucun changement <sup>116</sup>. Une des explications possibles à ces observations serait reliée à des différences dans l'étiologie, le degré et la durée de l'hypertrophie. Il semblerait, en effet, qu'une hypertrophie légère augmente la densité de  $I_{Ca-L}$  tandis qu'une hypertrophie sévère la diminue <sup>116</sup>. En se basant sur cette observation, on peut considérer que le remodelage observé dans notre étude induit une hypertrophie se situant entre une hypertrophie légère et une sévère. Les mesures morphologiques du cœur entier effectuées récemment par échocardiographie nous apporteront plus de précision à ce sujet.

Les canaux calciques de type L sont plus abondants dans les tubules-transverses <sup>117,118</sup>. Or, nos résultats laissent supposer que la membrane des tubules-transverses augmente lors de la gestation. Ainsi, un des mécanismes qui pourrait expliquer la préservation de la densité de  $I_{Ca-L}$  serait une insertion additionnelle ou un recrutement plus important de canaux calciques de type L au niveau de la membrane afin de compenser l'augmentation de la taille cellulaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par immunobuvardage.

Il n'est pas encore établi avec précision si la contractilité du myocarde est altérée lors de la grossesse puisque les études ont montré des résultats contradictoires. Les variations induites par la période de la grossesse et les modèles choisis pour l'étude et les techniques utilisées pour mesurer la contractilité entrent certainement en ligne de compte. Cependant, des études réalisées chez des femmes enceintes ont montré que la fin de la grossesse et le début du post-partum sont associées à une diminution réversible de la contractilité du myocarde, la fonction systolique étant maintenue pendant le reste de la grossesse <sup>39</sup>. Nos résultats qui montrent une diminution de la contractilité d'une cellule unique chez la rate en fin de gestation sont concordants avec cette observation.

La diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  libre cytoplasmique pourrait être due à 1) une augmentation de l'activité de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), qui est la voie principale de sortie du  $Ca^{2+}$  lors du processus d'excitation-contraction 2) une augmentation du contenu calcique du réticulum sarcoplasmique via sa  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) ou encore à 3) une augmentation du contenu calcique mitochondrial via son uniporteur. Ces mécanismes mèneraient à une diminution de l'amplitude et la durée des transitoires calciques et/ou à une diminution de la sensibilité des myofilaments au  $Ca^{2+}$  qui induiraient la diminution de la contractilité observée dans les cardiomyocytes des rates gestantes. L'application rapide de la caféine sur les cellules <sup>84</sup>, nous permettrait d'évaluer le contenu des réserves calciques et l'activité de NCX et par conséquent de vérifier ces hypothèses. De plus, la  $[Ca^{2+}]_i$  devrait aussi être mesurée par spectrofluorimétrie.

#### **Altération de la repolarisation membranaire et courants potassiques**

L'altération de l'activité de la  $Na^+/K^+$ -ATPase devrait aussi avoir des répercussions sur le gradient électrochimique du  $K^+$  des cardiomyocytes de rates gestantes. Cette action pourrait être en lien avec les changements de densité des courants potassiques démontrés dans nos travaux <sup>125</sup>.

En effet, une des conséquences est la diminution de la densité de  $I_{to}$ . Les changements morphologiques de nos cellules pourraient aussi être impliqués dans cette diminution. De nombreuses études ont montré que la densité de  $I_{to}$  diminue dans les cas d'hypertrophies cardiaques pathologiques indépendamment de l'étiologie de l'hypertrophie <sup>126-132</sup>.

Le fait que la densité de  $I_{to}$  ne soit pas maintenue permet de suggérer que lors de la gestation, le nombre des canaux potassiques qui médient  $I_{to}$  ne compense pas l'augmentation de la taille cellulaire ou encore que les changements hypertrophiques affectent la position membranaire des canaux de  $I_{to}$  ou des protéines qui l'entourent et qui sont nécessaires à son activité.

Les hormones sexuelles peuvent aussi affecter le remodelage des canaux de  $I_{to}$ . Dans le myomètre, l'expression de l'isoforme Kv 4.3 du canal est diminuée et les œstrogènes seraient responsables de cette diminution <sup>133</sup>. L'action des hormones sexuelles constitue aussi une voie envisageable dans notre cas.

Cette diminution de densité est accompagnée d'un changement de sa courbe d'inactivation : chez les rates gestantes cette courbe est déplacée vers des potentiels plus dépolarisants. De plus, il semblerait que la désactivation des canaux soit plus précoce dans les cardiomyocytes de rates gestantes. En effet, d'après nos résultats préliminaires, lors de la gestation, la décroissance de  $I_{to}$  serait plus rapide puisque les valeurs de la constante de temps  $\tau$  sont inférieures chez les rates gestantes. Ces résultats laissent supposer que l'adaptation du myocarde lors de la grossesse implique une altération des propriétés cinétiques de ces canaux et que les cellules de rates gestantes sont plus résistantes à la dépolarisation.

Une des voies possibles par laquelle l'inactivation pourrait être régulée lors de la grossesse est la phosphorylation des canaux potassiques. En effet, il a été démontré que la phosphorylation par la kinase, CaMKII, dépendante du  $Ca^{2+}$  et de la calmoduline, peut moduler l'inactivation de  $I_{to}$  <sup>134</sup>.

Le courant potassique  $I_{to}$  initie et médie la phase précoce de repolarisation et de ce fait peut influencer la durée du PA <sup>135</sup>. En effet, chez plusieurs espèces dont le rat, la diminution de la densité de  $I_{to}$ , dans les cardiomyocytes ventriculaires, mène à la prolongation du PA <sup>126,127</sup>. Cependant, les cellules étant en présence de BAPTA-AM, la phase de plateau, qui est moins marquée chez le rat, est d'autant plus diminuée. Il est par conséquent difficile d'observer les conséquences de la diminution de la densité de  $I_{to}$ . Des expériences dans des cellules en contractions permettront de le vérifier.

Le courant sortant  $I_{\text{sus}}$  n'est pas significativement altéré lors de la gestation.  $I_{\text{sus}}$  ne serait pas affecté par les changements hypertrophiques ou encore les modifications de la densité de  $I_{\text{sus}}$  ne feraient pas partie des changements nécessaires à l'adaptation du myocarde. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que la densité de  $I_{\text{sus}}$  ne change pas lors de l'hypertrophie cardiaque<sup>126,135</sup>.

La diminution de la densité de  $I_{\text{K1}}$  est par contre paradoxale car une inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase devrait en effet favoriser les courants entrants. Il est possible que la diminution de sa densité contribue à contrebalancer celle des courants sortants  $I_{\text{to}}$  afin de maintenir une  $[\text{K}^+]_i$  et un gradient électrochimique suffisants pour le bon fonctionnement de la cellule.

Les changements morphologiques des cellules peuvent être en lien avec cette diminution qui a été observée dans différents types d'hypertrophies<sup>136,137</sup>.

Le courant  $I_{\text{K1}}$  joue un rôle déterminant dans la stabilité du potentiel de repos des cardiomyocytes ainsi que dans la phase finale de repolarisation. Le potentiel de repos des cardiomyocytes est similaire chez les rates nullipares et les gestantes et proche des valeurs retrouvées par McCrossan et coll.<sup>138</sup>. Cependant, en dépit de la diminution de la densité du courant  $I_{\text{K1}}$  dans les cellules de rates gestantes, le potentiel de repos est le même. Cela signifie que le nombre de canaux diminué et/ou l'activité réduite de ces canaux ne nuit pas au maintien du potentiel de repos.

La diminution de la densité de  $I_{\text{K1}}$  pourrait être impliquée dans le changement de profil du PA, un ralentissement de la phase de repolarisation tardive du PA des cardiomyocytes étant observée chez les rates gestantes. Ces résultats sont concordants avec les études menées chez les femmes enceintes. En effet, Lechmanova et coll.<sup>139</sup> ont démontré que l'intervalle QT était prolongé chez

les femmes en fin de grossesse, suggérant une activité électrique ventriculaire prolongée.



## **V. CONCLUSION**

## V. CONCLUSION

---

Nos données confirment que l'adaptation du ventricule gauche lors de la gestation nécessite la mise en place d'altérations structurales et fonctionnelles des cardiomyocytes. L'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pourrait être un des mécanismes initiateurs ou un messager des adaptations morphologiques et fonctionnelles des cardiomyocytes (Fig.17).

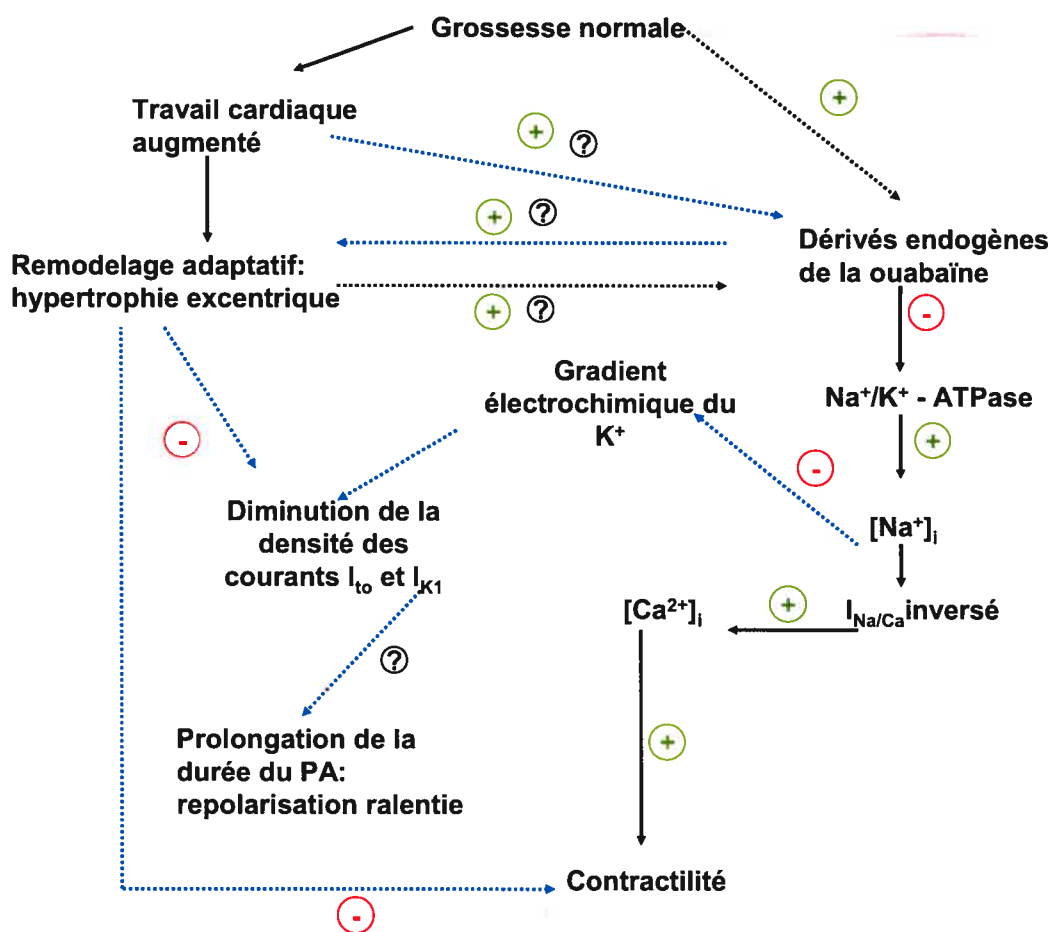
D'une part, elle peut entraîner l'hypertrophie par la régulation des gènes qui lui sont associés via son inhibition par la ouabaïne et ses dérivés. Ainsi, il est probable que l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase soit un des mécanismes initiateurs impliqués dans le remodelage excentrique des cardiomyocytes des rates gestantes que nous avons observé.

D'autre part, le remodelage excentrique des cardiomyocytes pourrait altérer l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et par conséquent affecter le gradient électrochimique de  $\text{K}^+$  suite à l'augmentation de la  $[\text{Na}^+]_i$ . Cette diminution de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pourrait ainsi avoir un lien direct ou indirect avec la diminution de la densité de  $I_{\text{to}}$  et de  $I_{\text{K1}}$ . Ainsi, paradoxalement l'activation des voies qui favorisent une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est associée à une diminution de la contractilité.

Bien que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase semble jouer un rôle important dans les adaptations des cardiomyocytes lors de la grossesse, d'autres voies de signalisation sont possibles, impliquant notamment les nombreux changements hormonaux qui se produisent lors de la grossesse.

La connaissance des adaptations cardiovasculaires au cours de la grossesse est cependant essentielle car l'incapacité de produire ou de prolonger ces changements peut résulter en des complications mettant en péril la vie de la

mère et du fœtus. En permettant une meilleure compréhension de la physiologie cardiaque durant la grossesse, cette étude pourra améliorer la compréhension des altérations qui se produisent lors des pathologies cardiovasculaires de la grossesse. A long terme, cette étude permettra de suggérer la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques menant aux dépistages précoces des troubles cardiaques et à suggérer des traitements mieux adaptés.



**Figure 17. Schéma récapitulatif des altérations des cardiomyocytes chez la rate en fin de grossesse.**

Les flèches en trait plein représentent les connaissances établies. Les flèches en pointillés bleus représentent nos résultats et celles en pointillés noirs d'autres voies possibles.

## ***REMERCIEMENTS***

---

Je remercie ma directrice de recherche Dr. Alzbeta Chorvatova de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir cru que je pouvais développer les aptitudes nécessaires à la réussite de ce projet. J'ai apprécié son enseignement et ses conseils.

Je remercie ma co-directrice Dr. Lucie Parent dont l'aide sur le plan administratif a été précieuse. De plus, j'ai eu le plaisir de l'avoir comme professeur. Ses cours m'ont apporté une vision d'intégration de mon projet de recherche.

Je remercie aussi le Dr. Jean-Claude Lavoie, directeur du Laboratoire d'innovation biotechnologique du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, qui nous a permis d'utiliser le microscope confocal.

Pour l'aide sur le plan technique, je remercie M. Goran Loncar qui a largement contribué au montage du système pour l'isolement des cellules et le Dr. Dusan Chorvat qui a contribué à la mise au point des protocoles pour l'enregistrement des images au microscope confocal.

Ces travaux n'auraient pu se réaliser sans soutien financier. Je remercie à cet effet, le GRSNA (Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome) de l'Université de Montréal et la Fondation du centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine de Montréal qui ont cru en ce projet et m'ont attribué des bourses.

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour évaluer mon mémoire.

## ***REFERENCES***

---

1. Ikayam U. Pregnancy and cardiovascular disease. 5th ed. Braunwald, editor. Heart Disease. Saunders.pp1843-1864.1996.
2. Sullivan JM, Ramanathan K. Management of medical problems inpregnancy-severe cardiac disease. N Engl J Med;313: 304-309.1985.
3. Slangen IB, Out FC, Verkeste CM, Peeters, LL. Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol;270:1779-1784.1996.
4. Van Oppen AC, Van der Tweel I, Alsbach GP, Heethaar RM, Bruinse HW. A longitudinal study of maternal hemodynamics during normal pregnancy. Obstet Gynecol; 88 (1): 40-46.1996.
5. Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G, Donoso E. Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. Obstet Gynecol; 81 (6):1029-1033.1993.
6. Tan J Y-L. Cardiovascular disease in pregnancy. Current Obstetrics & Gynaecology; 11:137-145.2001.
7. Clapp JF 3rd, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. Am J Cardiol; 80 (11):1469-1473.1997.
8. Massicotte G, St Louis J, Schiffrin E.L Heart rate reflex responses during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats following angiotensin II and vasopressin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med; 186: 294-298.1987.
9. Cabanes L. Cœur et grossesse. Ann Cardiol Angéiol; 53:91-96.2004.
10. Thilen U, Olsson SB. Pregnancy and heart disease: a review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol;75(1):43-50.1997.
11. Gallery EDM, Hunyor SM, Gyory AZ. Plasma volume concentration: a significant factor in both pregnancy associated hypertension (pre-eclampsia) and chronic hypertension in pregnancy. Q J Med; 192: 593-602.1979.

12. Lindheimer, MD, Katz AI. Renal physiology and disease in pregnancy. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. DW Seldin and G. Giebisch, eds. New York. 3371-3432.1992.
13. Masilamani, S, Baylis C. Pregnant rats are refractory to the natriuretic actions of ANP. *Am. J. Physiol.* 267 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 36): R1611-R1616.1994.
14. Chesley LC, Lindheimer MD. Renal hemodynamics and intravascular volume in normal and hypertensive pregnancy. In: *Hypertension: Hypertension in Pregnancy*. Elsevier. Amsterdam. vol.10; p 38. 1988.
15. Glasow PF, Carpenter RJ Jr. Pregnancy and cardiovascular disease. Garson, A Jr, Bricker, TJ, McNamara, DG, editors. *The science and practice of pediatric cardiology*. Philadelphia/ London: 2374-2396.1990.
16. Fletcher A, Alkjaersig NK, Burnstein R. The influence of pregnancy upon blood coagulation and plasma fibrinolytic enzyme function. *Am J Obstet Gynecol*; 134:743-751.1979.
17. Gore M, Eldon S, Trofatter KF, Soong SJ, Pizzo SV. Pregnancy-induced changes in the fibrinolytic balance: evidence for defective release of tissue plasminogen activator and increased levels of fast-acting tissue. *Am J Obstet Gynecol*; 156:674-680.1987.
18. Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rats. *Am J Kidney Dis*; 9:296-302.1987.
19. 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.
20. Baylis C. Renal hemodynamics and volume control during pregnancy in the rat. *Semin.Nephrol*; 4:208-220.1984.
21. Hays PM, Cruikshank DP, Dunn LJ. Plasma volume determination in normal and preeclamptic patients. *Am J Obstet. Gynecol*; 151:958-966.1985.
22. Brown M, Nicholson E, Gallery E. Sodium-renin-aldosterone relations in normal and hypertensive pregnancy. *Br J Obstet Gynecol*; 95:1237-1246.1988.

23. Brochu M, Picard S, Jodoin S, and St-Louis J. Effects of dihydropyridines on aldosterone secretion in adrenal capsule preparations from pregnant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E18-E24. 1997.
24. Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Schouten HJ, Peeters LL. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet. Gynecol*; 85:361-367.1995.
25. St-Louis J, Massicotte G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*; 37:1351-1357.1985.
26. Pike RL. Sodium requirement of the rat during pregnancy. In: *Hypertension in Pregnancy*, edited by MD Lindheimer, AI Katz, and FP Zuspan. Wiley & Sons. New York. p.207-215.1976.
27. Carbillon L, Uzan M, Uzan S. Pregnancy, vascular tone, and maternal hemodynamics: a crucial adaptation. *Obstet Gynecol Surv*; 55(9):574-581.2000.
28. Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol*; 247(1 Pt 2):100-108.1984.
29. Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol*; 256:1060-1065.1989.
30. Novak J, Reckelhoff J, Bumgarner L, Cockrell K, Kassab S, Granger J. P. Reduced Sensitivity of the Renal Circulation to Angiotensin II in Pregnant Rats. *Hypertension*; 30(3): 580-584.1997.
31. Kassab S, Miller MT, Hester R, NovakJ, Granger JP. Systemic Hemodynamics and Regional Blood Flow During Chronic Nitric Oxide Synthesis Inhibition in Pregnant Rats *Hypertension*;31(1):315-320.1998.
32. Gilson GJ, Mosher MD, Conrad KP. Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol*;263 (6 Pt 2):1911-1918.1992.
33. Rubler S, Damani PM, Pinto ER. Cardiac size and performance during pregnancy estimated with echocardiography. *Am J Cardiol*; 40:534-540.1977.

34. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*; 56:56-64.1975.
35. Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? *Am J Med*; 69:576-584.1980.
36. Lilly L. Pathophysiology of heart disease. 3rd edition. Lippincot Williams & Wilkins Edition.p 224. 2003.
37. London G, Pathophysiology of cardiovascular damage in the early renal population. *Nephrol Dial Transplant*; 16: 3-6.2001.
38. Meeus F, Kourilsky O, Guerin AP, Gaudry C, Marchais SJ, London GM. Pathophysiology of cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int*; 58 Suppl 76: S140-S147. 2000.
39. Mone SM, Sanders SP, Colan SD. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation*; 15: 94(4):667-672.1996.
40. Pelliccia A, Maron BJ. Outer limits of the athlete's heart: the effect of gender and relevance to the differential diagnosis with primary cardiac diseases. *Cardiol Clin*;15:381-396. 1997.
41. Escudero EM, Favalaro LE, Moreira C, Plastino JA, Pisano O. Study of the left ventricular function in pregnancy-induced hypertension. *Clin. Cardiol*; 11:329-333. 1988.
42. Simmons LA, Gillin AG, Jeremy RW. Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*; 83:1627-1633.2002.
43. Schannwell CM. Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology*; 97:73-78.2002.
44. Morton M, Tsang H, Hohimer R, Ross D, Thornburg K, Faber J, Metcalfe J. Left ventricular size, output, and structure during guinea pigpregnancy. *Am J Physiol*; 246(1 Pt 2):40-48.1984.
45. De Simone G, Devereux RB, Koren MJ, Mensah GA, Casale PN, Laragh JH. Midwall left ventricular mechanics: an independent predictor of cardiovascular risk in arterial hypertension. *Circulation*; 93:259-265.1996.



46. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Battistelli M, Barroccini C, Santucci A, Santucci C, Reboldi G, Porcellati C. Adverse prognostic significance of concentric remodeling of the left ventricle in hypertensive patients with normal left ventricle in hypertensive patients with normal left ventricular mass. *J Am Coll Cardiol*; 25:871-878.1995.
47. Novelli GP, Valensise H, Vasapollo B, Larciprete G, Altomare F, Di Pierro G, Casalino B, Galante A, Arduini D. Left ventricular concentric geometry as a risk factor in gestational hypertension. *Hypertension*; 41(3):469-475.2003.
48. Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J*; 21(1):30-41.1994.
49. Katz AM. Cardiac ion channels. *N Engl J Med*; 328: 1244-1251.1993.
50. Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Arch*; 439(5):588-599. 2000.
51. Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal Ca channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol*; 493:733-746. 1996.
52. Chorvatova Hart G, Hussain M.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current ( $I(\text{Na}/\text{Ca})$ ) and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*; 61(2):278-287.2004.
53. Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated  $\text{K}^+$  channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*; 525 Pt 2:285-298. 2000.
54. Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Molecular biology of  $\text{K}^+$  channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med*; 110(1):50-59.2001.
55. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*; 415: 198-205. 2002.
56. Xie LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*; 272: 1741-1750. 1997.
57. Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*; 42(2):339-360.1999.

58. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Mass: Sinauer Associates Inc: Chap Calcium channels. pp83-114. Chap. Potassium channels and mechanisms of block. pp127-422. Patch-clamp. p89.1992.
59. Glossmann H, Ferry DR, Goll A. Molecular pharmacology of the calcium channel. IUPHAR international congress on pharmacology; 2: 329-336.1984.
60. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, Twist VW. Electrical activity and contraction in cells isolated from rat and guinea-pig ventricular muscle: a comparative study. *J Physiol*; 391: 527-544.1987.
61. Josephson IR, Sanchez Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res*; 54: 157-162.1984.
62. Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JGY. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol*; 88: 93-102.1993.
63. Wettwer E, Amos, G, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human and ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circulation Research*; 75: 473-482.1994.
64. Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol*; 491:31-50.1996.
65. Ravens U, Wettwer E. Electrophysiological aspects of changes in heart rate. *Basic Res Cardiol*; 93 Suppl.1:60- 65.1998.
66. Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch*; 392:352-359.1982.
67. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol*; 275: 301-321.1998.
68. Greenstein JL, Wu R, Po S, Tomaselli GF, Winslow RL. Role of the calcium-independent transient outward current  $I_{to1}$  in shaping action potential morphology and duration. *Circ Res*; 87(11): 1026-1033.2000.
69. Sah R, Ramirez RJ, Kaprielian R, Backx PH. Alterations in action potential profile enhance excitation-contraction coupling in rat cardiac myocytes. *J Physiol*; 533 (Pt 1):201-214.2001.

70. Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*; 97: 973-1011.1991.
71. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*; 73: 386-394.1993.
72. Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol*; 347: 641-657.1984.
73. Delmar M, Ibarra J, Davidenko J, Lorente P, Jalife J. Dynamics of the background outward current of single guinea pig ventricular myocytes: ionic mechanisms of hysteresis in cardiac cells. *Circ Res*; 69:1316-1326. 1991.
74. Ibarra J, Morley GE, Delmar M. Dynamics of the inward rectifier  $K^+$  current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes. *Biophys J*; 60:1534-1539. 1991.
75. Shimoni Y, Clark RB, Giles WR. Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J Physiol*; 448: 709-727.1992.
76. Ishihara K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel  $IK_1$ : the role of weak blocking molecules. *J Gen Physiol*; 109: 229-243.1997.
77. Glitsch HG. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev*; 81(4):1791-1826.2001.
78. Grupp I, Im WB, Lee CO, Lee SW, Pecker MS, Schwartz A. Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *J Physiol*; 360:149-160.1985.
79. Lee CO, Abete P, Pecker M, Sonn JK, Vassalle M. Strophanthidin inotropy: role of intracellular sodium ion activity and sodium-calcium exchange. *J Mol Cell Cardiol*; 17:1043-1053.1985.
80. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual b-adrenergic responsiveness. *Circ. Res*; 88:1159-1167.2001.

81. Dow JW, Harding NG, Powell T. Isolated cardiac myocytes. I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue. *Cardiovasc Res*; 15:483-514.1981.
82. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer. Dordrecht.1991.
83. Hibbard JU, Lindheimer M, Lang RM. A modified definition for peripartum cardiomyopathy and prognosis based on echocardiography. *Obstet Gynecol*; 94(2):311-316.1999.
84. Chorvatova A, Hussain M. Effects of caffeine on potassium currents in isolated rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch*; 446(4):422-428.2003.
85. Takahashi S, Seifter S. Dye-Sensitized Photo-Inactivation of Collagenase A. *Biochim Biophys Acta*; 214(3):556-558. 1970.
86. Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. 10:128-138.1988.
87. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Part III. Methods. Chap.9. Visualizing Cells. Garland Publishing. New York.2002.
88. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics 2*. 2nd ed. Chap.20. Studying human gene structure, expression and function using cultured cells and cell extracts. Oxford UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.1999.
89. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. Chap 5. Biomembranes and the Subcellular Organization of Eukaryotic Cells. W.H. Freeman & Co. New York.1999.
90. Winslow JL, Cooper RL, Atwood HL. Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the  $K(d)$ ,  $F(min)$ ,  $F(max)$  formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium. *J Neurosci Methods*; 118(2):163-75.2002
91. Verkman AS, Frosch MP. Temperature-jump studies of merocyanine 540 relaxation kinetics in lipid bilayer membranes. *Biochemistry*; 24: 7117-7122.1985.

92. Dragsten PR, Webb WW. Mechanism of the membrane potential sensitivity of the fluorescent membrane probe merocyanine 540. *Biochemistry*;17:5228-5240.1978.
93. Stillwell W, Wassall SR, Dumauual AC, Ehringer WD, Browning CW, Janski LJ. Use of merocyanine (MC540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells. *Biochim Biophys Acta*;1146:136-144.1993.
94. Williamson P, Mattocks K, Schlegel RA. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochim Biophys Acta*; 732: 387-393.1983.
95. Bassien-Capsa V, Fournon JC, Chorvatova A. Structure/fonction remodelling of single left ventricular cardiomyocytes during normal pregnancy. Article en préparation qui sera soumis à Cardiovascular Research.
96. Chorvat D Jr, Bassien-Capsa V, Cagalinec M, Kirchnerova J, Comte B, Mateasik A, Chorvatova A. Mitochondrial autofluorescence induced by visible light in single rat cardiac myocytes studied by spectrally-resolved confocal microscopy. *Laser Physics*; 14(2), 220-230.2004.
97. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*; 391(2):85-100.1981.
98. Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer L. *Biochemistry*. Chap 13. Membrane Channels and Pumps. W. H. Freeman and Co. New York.2002.
99. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, La Mantia A-S, McNamara JO, Williams SM. *Neuroscience* 2nd ed. Chap I. Neural Signaling. Sinauer Associates Inc. Sunderland.2001.
100. Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Meth*; 37:15-26.1991.
101. Baron S. *Medical Microbiology*. 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston.1996.
102. Johnston D, Wu S M-S. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. MIT Press.1995.

103. Semb SO, Lunde PK, Holt E, Tonnessen T, Christensen G, Sejersted OM. Reduced myocardial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*; 30(7):1311-28.1998.
104. George KP, Gates PE, Birch KM, Campbell IG. Left ventricular morphology and function in endurance-trained female athletes. *J Sports Sci*;17(8):633-42. 1999.
105. Lipp P, Huser J, Pott L, Niggli E. Subcellular properties of triggered Ca<sup>2+</sup> waves in isolated citrate-loaded guinea-pig atrial myocytes characterized by ratiometric confocal microscopy. *J. Physiol*; 497 (Pt 3), 599-610.1996.
106. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*; 341(17):1276-83.1999.
107. Wang L, Proud CG. Regulation of the phosphorylation of elongation factor 2 by MEK-dependent signalling in adult rat cardiomyocytes. *FEBS Lett*; 531(2):285-289. 2002.
108. Brochu M, Lehoux JG, Picard S. Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology*;138(6):2354-2358.1997.
109. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *Biol Chem*;273(9):4883-4891.1998.
110. McDonough AA, Zhang Y, ShinV, Frank JS. Subcellular distribution of Na pump isoform subunits in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1996;270:C1221-C1227.
111. Solaro R, Rarick, H M. Troponin and tropomyosin proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*; 83:471-480.1998.
112. Moss RL, Buck SH. *Handbook of Physiology*. Oxford Univ. Press. New York. 420-454.2001.
113. Keung EC. Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res*; 64:753-763.1989.

114. Volk T, Ehmke H. Conservation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current characteristics in endo- and epicardial myocytes from rat left ventricle with pressure-induced hypertrophy. *Pflugers Arch*;443(3):399-404. 2002.
115. Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G. Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res*; 42:391-401. 1999.
116. Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res*; 79:461-473.1996.
117. Gu Y, Gorelik J, Spohr HA, Shevchuk A, Lab MJ, Harding SE, Vodyanoy I, Klenerman D, Korchev YE. High-resolution scanning patch-clamp: new insights into cell function. *FASEB J*. 16(7):748-50. 2002.
118. Shacklock PS, Wier WG, Balke CW Local  $\text{Ca}^{2+}$  transients ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks) originate at transverse tubules in rat heart cells. *J Physiol*; 487 (Pt 3):601-8.1995.
119. Peng M, Huang L, Xie Z, Huang W-H, Askari A. Partial inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by ouabain induces the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem*; 271:10372-10378.1996.
120. Huang L, Li H, Xie Z. Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. *J Mol Cell Cardiol*; 29: 429-437.1997.
121. Huang L, Kometiani P, Xie Z. Differential regulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit isoform gene expressions in cardiac myocytes by ouabain and other hypertrophic stimuli. *J Mol Cell Cardiol*; 29(11):3157-3167.1997.
122. Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. *J. BiolChem*; 273(24): 1524-15256.1998.
123. Xie Z, Kometiani P, Liu J, Li J, Shapiro JJ, Askari A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem*; 274(27):19323-19328.1999.

124. Ferrandi M, Molinari I, Barassi P, Minotti E, Bianchi G, Ferrari P. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. *Biol Chem*; 279(32):33306-33314.2004.
125. Bassien-Capsa V, Chorvatova A. Study of Potassium Currents in Rat Left Ventricular Cardiomyocytes in Late Stages of Normal Pregnancy. Soumis à *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* en octobre 2004.
126. Momtaz A, Coulombe A, Richer P, Mercadier JJ, Coraboeuf E. Action potential and plateau ionic currents in moderately and severely DOCA-salt hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*; 28(12):2511-2522.1996.
127. Clark, R B, Bouchard, R ., Salinas, S E, Sanchez, CJ, Giles WR. Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovascular Research*; 27:1795-1799.1993.
128. Benitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C, Lorente P: Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol*; 469:111-138.1993.
129. Tomita F, Bassett AL, Myerburg RJ, Kimura S: Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res*; 75: 296-303.1994.
130. Potreau D, Gomez JP, Fares N: Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res*; 30: 440-448.1995.
131. Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res*; 79: 461-473.1996.
132. Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res*; 28: 1180-1187.1994.
133. Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R, Toro L, Stefani E. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem*; 276: 31883-31890. 2001.



134. Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN. Regulation of the transient outward  $K^{+}$  current by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 85: 810-819. 1999.
135. Donohoe P, Hendry BM, Walgama OV, Bertaso F, Hopster DJ, Shattock MJ, James AF. An altered repolarizing potassium current in rat cardiac myocytes after subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol*;11(9):1589-1599.2000.
136. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of  $K^{+}$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73: 379-385. 1993.
137. Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G. Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res* 42: 391-401. 1999.
138. McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res*; 63(2): 283-92.2004.
139. Lechmanova M, Parizek A, Halaska M, Slavicek J, Kittnar O. Changes of the electrical heart field and hemodynamic parameters in the 34th to 40th weeks of pregnancy and after delivery. *Arch Gynecol Obstet*; 266(3):145-51. 2002.