

2m11.2839.7

**Université de Montréal**

**L'effet d'une diète faible en sodium sur l'osmorégulation et les récepteurs  
d'angiotensine II chez la rate gestante.**

**par**

**Sophie Bédard**

**Programme de Sciences biomédicales**

**Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures**

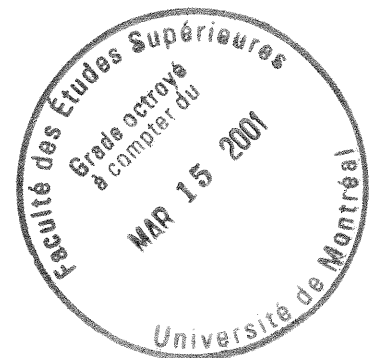
**en vue de l'obtention du grade de**

**Maître ès sciences (M.Sc.)**

**en Sciences biomédicales**

**Août, 2000**

**©Sophie Bédard, 2000**



W

4

U58

2001

V.021

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'EFFET D'UNE DIETE FAIBLE EN SODIUM SUR L'OSMOREGULATION ET LES  
RECEPTEURS D'ANGIOTENSINE II CHEZ LA RATE GESTANTE.**

présenté par :

Sophie Bédard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Tremblay	Président rapporteur
Dr Pierre Moreau	Membre du jury
Dr Michèle Brochu	Membre du jury

Mémoire accepté le :

18.12.2000

## SOMMAIRE

Plusieurs modifications hémodynamiques accompagnent la grossesse autant chez le rat que chez l'humain. Parmi ces altérations maternelles, on note une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Dans notre laboratoire, nous avons voulu déterminer l'effet d'une activation supplémentaire du SRAA sachant que ce dernier est déjà stimulé au cours de la gestation normale. Ainsi, une diète faible en sodium a été donnée à des rates gestantes pour la dernière semaine de gestation. Malgré cette stimulation supplémentaire du SRAA, l'augmentation du volume plasmatique n'était pas observée et ces rates gestantes donnaient naissance à des ratons de petits poids. Un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) fut découvert. Le but de mon travail était de mieux caractériser ce modèle de RCIU.

Puisqu'une diminution du volume plasmatique a été notée dans le modèle de RCIU, nous avons porté un intérêt sur la physiologie rénale. Nous croyons que, suite à une diète faible en sodium, la rate gestante tente d'atteindre un équilibre hydrique et sodique entraînant une diminution du volume circulant et affectant la croissance fœtale. En second lieu, nous savons que le SRAA est fortement activé dans ce modèle, et que l'origine du RCIU serait probablement relié à l'impact d'une telle diète sur le volume circulant et la croissance fœtale. Ainsi, nous avons voulu voir l'effet d'un haut niveau d'angiotensine II (All) plasmatique sur ses propres récepteurs, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, dans différents tissus maternels. Nous suggérons que l'interaction survenant entre la gestation et la diète faible en sodium modifie l'efficacité de

l'Angiotensin II (Ang II) à produire une réponse biologique et ce, par une modulation différente des récepteurs d'Ang II.

Sur le plan d'une approche méthodologique, deux aspects ont été analysés. Pour effectuer l'étude de la physiologie rénale, des paramètres physiologiques reliés au volume, des analyses sanguines, urinaires et hormonales ont été mesurés. Pour ce qui est de l'aspect moléculaire de l'étude, nous avons mesuré les niveaux d'acide ribonucléique messager (ARNm) et de protéines, soit l'expression et la quantité des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> par les techniques d'essai à la protection RNase et de marquage par photoaffinité, respectivement.

Nos travaux sur le plan physiologique ont démontré que, chez les rates non-gestantes, la diète faible en sodium augmente le SRAA et diminue l'excrétion urinaire sodique. Ceci permettant de limiter les variations de volume tout en maintenant normale la concentration de sodium plasmatique. Par contre, chez les rates gestantes, malgré une activation supplémentaire du SRAA par la diète, les niveaux de sodium plasmatique sont diminués. L'hématocrite est augmenté suggérant une contraction volumique. De plus, la clairance rénale de la créatinine et de l'urée est diminuée.

L'étude des niveaux d'ARNm et de protéines des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> a révélé une modulation différente selon le tissu étudié. Une gestation normale, comparativement à une rate non-gestante, a induit une augmentation du niveau d'ARNm de l'AT<sub>1</sub> dans l'hypothalamus et l'hypophyse, mais une diminution dans les artères utérines. Le niveau de protéine de l'AT<sub>1</sub> fut diminué dans le rein de rate gestante. Une baisse des

niveaux d'ARNm et de protéine du récepteur AT<sub>2</sub> fut également notée dans le cortex surrénalien. Ces modulations hypothalamo-hypophyso-surréaliennes pourraient suggérer un rôle dans les altérations au niveau du volume plasmatique observées lors d'une gestation normale. Dans le modèle de RCIU, une diminution du nombre de protéines AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans l'hypophyse, de protéine AT<sub>1</sub> dans le placenta, et de l'AT<sub>2</sub> au niveau du cortex surrénalien furent observées. Ces résultats pourraient suggérer que la modulation des récepteurs AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> au niveau placentaire soit impliquée dans la régulation des facteurs de croissance fœtale.

En conclusion, nous suggérons que les rates gestantes sont plus sensibles que les rates non-gestantes à une restriction sodique. Un réajustement des fonctions rénales maternelles devrait survenir pour compenser la diminution du sodium ingéré. Cependant, les réponses physiologiques compensatrices de la contraction volumique sont incapable de prévenir la RCIU. De plus, suite à une stimulation supplémentaire du SRAA dans notre modèle de RCIU, nous avons démontré une modulation tissu-spécifique des récepteurs d'Ang II. Nous suggérons que ces altérations, comparées à une gestation normale, sont corrélées avec les changements physiologiques et morphologiques associés à la RCIU. Des études ultérieures devront être effectuées chez le fœtus afin de déterminer comment la forte activation du SRAA chez la mère, par une diète faible en sodium, a pu affecter le fœtus lors de son développement in utero et quelles en seront les conséquences dans sa vie adulte.

## TABLE DES MATIERES

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Grossesse.....	2
1.1.1 Relation foeto-maternelle.....	2
1.1.2 Modifications hémodynamiques maternelles.....	3
1.2 Physiologie rénale.....	5
1.2.1 Anatomie et fonctions du rein.....	6
1.2.2 Régulation de l'osmolalité et de la natrémie.....	10
1.2.2.1 Osmorécepteurs et vasopressine.....	12
1.2.2.2 Mécanisme de la soif.....	14
1.2.3 Changements rénaux au cours de la grossesse.....	16
1.3 Système rénine-angiotensine (SRA).....	19
1.3.1 Composantes du SRA.....	19
1.3.2 Fonctions biologiques de l'angiotensine II (All).....	22
1.3.3 Description des récepteurs d'All.....	24
1.3.3.1 Récepteurs d'All de type I (AT <sub>1</sub> ).....	25
1.3.3.2 Récepteurs d'All de type II (AT <sub>2</sub> ).....	29
1.3.4 Distribution tissulaire des récepteurs d'All.....	33
1.3.5 Altérations du SRA lors de la grossesse.....	35
1.4 Diète faible en sodium.....	38

1.4.1	Altération de l'osmorégulation.....	38
1.4.2	Régulation du SRA et de ses récepteurs .....	39
1.4.3	Impact sur la grossesse .....	42
1.5	La restriction de croissance intra-utérine.....	42
1.5.1	Modèle animal de RCIU.....	43
1.6	Hypothèses de travail.....	44
2.	<b>ARTICLE 1 : <i>Alterations of maternal body fluids volume and composition in a model of intrauterine growth restriction induced by low-sodium diet.</i></b> .....	46
3.	<b>ARTICLE 2 : <i>Modulation of maternal angiotensin II receptor subtypes in a model of intrauterine growth restriction in rat.</i></b> .....	80
4.	<b>DISCUSSION</b> .....	128
5.	<b>CONCLUSION</b> .....	140
6.	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	143
7.	<b>REMERCIEMENTS</b> .....	158
8.	<b>ÉTAT DE PUBLICATION DES MANUSCRITS</b> .....	159



**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Facteurs régulant la sécrétion de l'hormone antidiurétique.....	14
Tableau II. Facteurs régulant le mécanisme de la soif.....	15
Tableau III. Actions biologiques engendrées par l'angiotensine II.....	24
Tableau IV. Distribution tissulaire des récepteurs d'Ang II, AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> .....	34

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1. Anatomie du rein et identification des structures fonctionnelles du néphron.....	6
Figure 2. Étapes menant à la formation de l'urine (filtrat) au travers les diverses parties du néphron.....	7
Figure 3. Les différents sites de réabsorption et de sécrétion des solutés le long du tubule rénal.....	8
Figure 4. Neuroanatomie de l'hypothalamus, où l'hormone antidiurétique (ADH) est synthétisée, et la neurohypophyse, où est relâché l'ADH.....	13
Figure 5. Résumé des changements tubulaires dans le néphron durant la gestation.....	18
Figure 6. Composantes du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	22
Figure 7. Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II.....	26
Figure 8. Mécanismes de signalisation des sous-types de récepteurs d'angiotensine II.....	31
Figure 9. Impact d'une diète faible en sodium sur l'osmorégulation.....	41

**LISTE DES ABREVIATIONS**

- AA : acide arachidonique
- ACTH : corticotrophine (*adrenocorticotrophine hormone*)
- ADH : hormone antidiurétique
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
- AI : angiotensine I
- AII : angiotensine II
- AIII : angiotensine III
- AIV : angiotensine IV
- AMPc : adénosine 3',5'-cyclique monophosphate
- ANP : peptide natriurétique auriculaire
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- AT<sub>1</sub> : récepteur de l'angiotensine II de type I
- AT<sub>2</sub> : récepteur de l'angiotensine II de type II
- AT<sub>3</sub> : récepteur de l'angiotensine III
- AT<sub>4</sub> : récepteur de l'angiotensine IV
- AVP : vasopressine
- Ca<sup>+2</sup> : calcium
- Cl<sup>-</sup> : chlore
- CML : cellule musculaire lisse
- CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire
- DAG : diacylglycérol

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine  
FSR : flot sanguin rénal  
GMPc : guanosine 3',5'-cyclique monophosphate  
H<sup>+</sup> : hydrogène  
H<sub>2</sub>O : eau  
IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate  
JG : juxtaglomérulaire  
K<sup>+</sup> : potassium  
kDa : kilodalton  
LH : hormone lutéinisante  
MC : myocyte cardiaque  
Na<sup>+</sup> : sodium  
NaCl : chlorure de sodium  
NO : oxide nitrique  
PGs : prostaglandines  
PKC : protéine kinase C  
PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>  
PLC : phospholipase C  
PLD : phospholipase D  
PTP : protéine tyrosine phosphatase  
RCIU : restriction de croissance intra-utérine  
SNA : système nerveux autonome  
SRA : système rénine-angiotensine  
SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

TFG : taux de filtration glomérulaire

TSH : thyroïdostimuline (*thyroid-stimulating hormone*)

## **1. INTRODUCTION**

## **1.1 Grossesse**

La grossesse représente un état physiologique où des adaptations maternelles prennent place. En effet, de profonds changements physiologiques au niveau de divers systèmes interdépendants, tel que le système endocrinien et cardiovasculaire, surviennent. Tout au long de la grossesse, ces modifications s'installent dans l'organisme maternel pour maintenir un environnement adéquat pour le bien-être in utero du fœtus sans trop compromettre la santé de la mère.

### **1.1.1 Relation fœto-maternelle**

Il est établi que l'influence maternelle exerce un grand rôle sur le développement fœtal de même que sur le bien-être du nouveau-né. La croissance et le développement du fœtus doivent être accompagnés par des mécanismes compensatoires maternels. Il a été démontré qu'une augmentation marquée du poids total de l'utérus prend place durant la dernière semaine de gestation chez le rat <sup>1</sup>. L'augmentation majeure du poids fœtal de même que placentaire est également observée dans le dernier tiers de gestation <sup>1</sup>. Bien que l'augmentation de la masse du placenta soit l'un des mécanismes compensatoires maternels, seul, il ne pourrait suffire pour une bonne croissance fœtale. Il en résulte ainsi que le développement fœtal est également supporté par des altérations cardiovasculaires maternelles que nous décrivons ultérieurement.

Une relation d'échange s'installe entre le fœtus et sa mère par le biais de la circulation utérine. Les artères utérines sont les vaisseaux responsables de l'apport sanguin vers l'utérus. Cette vasculature subit d'importantes modifications durant la grossesse. En effet, il a été démontré que, chez une rate gestante, le diamètre des artères utérines arquées augmente de 80%<sup>2</sup>. Un phénomène d'hyperplasie et d'hypertrophie cellulaire est observée dans la paroi des artères utérines lors de la gestation chez la rate<sup>3</sup>. De plus, le flot sanguin utérin augmente de près de 30 fois et compte pour 15-20% de la production maternelle. En effet, à partir du jour 15 de gestation chez le rat, on note une augmentation significative du flot sanguin utérin dont environ 90% est directement dirigé vers la perfusion placentaire<sup>1</sup>. Cette augmentation du flot sanguin utéro-placentaire assure une livraison adéquate de l'oxygène et des nutriments pour une croissance et un développement fœtal normal. Toutefois, un flot utéro-placentaire inadéquat pourrait avoir un impact néfaste sur la croissance du fœtus.

### **1.1.2 Modifications hémodynamiques maternelles**

Un grand nombre de modifications hémodynamiques et physiologiques accompagnent la grossesse autant chez l'humain que chez le rat. Elles se voient toutefois corrigées après l'accouchement. Parmi les altérations cardiovasculaires induites par la grossesse, l'augmentation du volume sanguin est l'une des majeures. L'expansion du volume plasmatique est



d'environ 40-45% chez la femme <sup>4</sup> et 50-70% chez le rat <sup>5</sup>. Bien que chez la femme cette augmentation maximale du volume soit observée en début ou milieu de grossesse, chez la rate près de 50% du volume ajouté est atteint durant la dernière semaine de gestation <sup>5,6</sup>. Ce surplus de volume est nécessaire pour alimenter le flot utéro-placentaire, répondre aux besoins métaboliques du fœtus et perfuser les autres organes nobles, tels les reins. Parallèlement à l'augmentation du poids corporel maternel observée pendant la grossesse <sup>1</sup>, une hausse de la masse érythrocytaire est aussi notée <sup>7,8</sup>. Toutefois, l'expansion volumique exagérée, que l'on observe lors de la grossesse, conduit à une hémodilution physiologique caractérisée par un hématokrite plus faible <sup>9</sup>.

La fréquence, le volume d'éjection, de même que le débit cardiaque, sont augmentés au cours de la grossesse <sup>10,11</sup>. Cette augmentation du débit cardiaque est la conséquence de deux mécanismes : la précharge est augmentée due à l'hypervolémie et de l'autre côté, la postcharge est diminuée due à une baisse de la résistance vasculaire systémique <sup>12</sup>. Malgré l'expansion du volume plasmatique lors de la grossesse, une légère diminution de la pression sanguine se produit en fin de gestation chez la rate <sup>1,13</sup>, et au second trimestre de grossesse chez la femme <sup>14</sup>. La résistance périphérique, quant à elle, représente le ratio de la pression artérielle sur le débit cardiaque. La diminution de la pression sanguine de concert avec l'augmentation du débit cardiaque au cours de la grossesse montre visiblement que la résistance vasculaire périphérique est abaissée, et ce

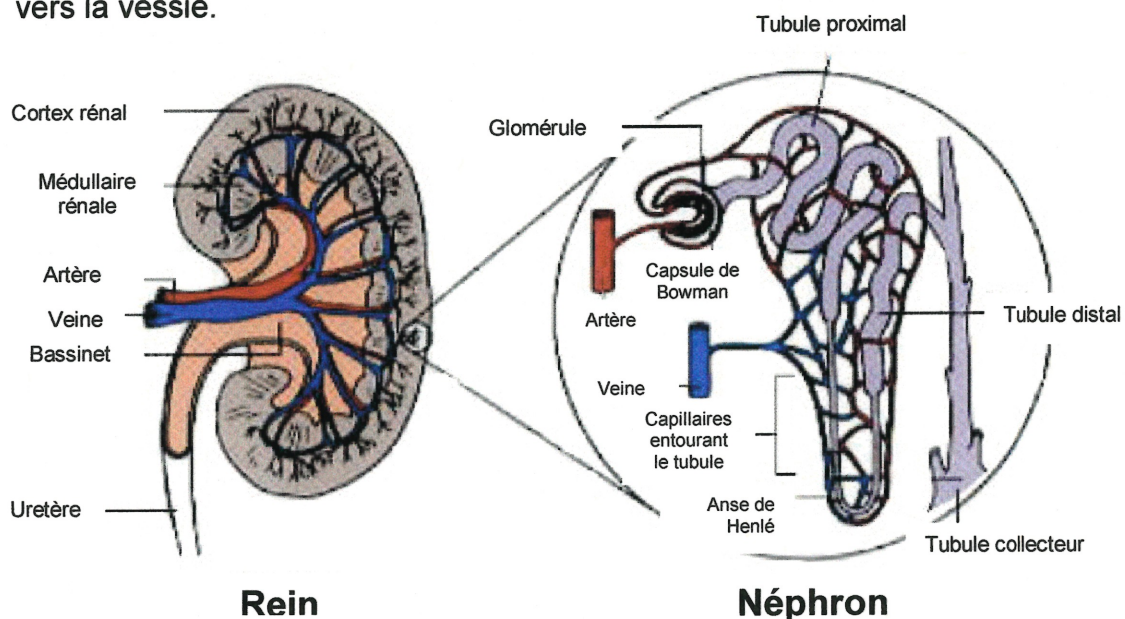
jusqu'au terme de la grossesse<sup>1,11,15</sup>. La baisse de pression artérielle pourrait être reliée à cette diminution de résistance vasculaire systémique suite à la création d'un circuit de faible résistance dans l'utérus gravide, mais cette hypothèse demeure controversée<sup>16</sup>. Quelques hormones reliées à la grossesse, telles les œstrogène, la prolactine ou les prostaglandines (PGs), pourraient également provoquer des effets vasodilatateurs, mais l'implication hormonale dans l'induction de la vasodilatation requiert davantage d'investigations<sup>17</sup>. Une diminution de réponse pressive aux agents vasoconstricteurs (norépinéphrine, angiotensine II) est un autre phénomène observé lors de la grossesse, comme certaines études chez la rate l'ont démontrée<sup>18,19</sup>. Également d'autres systèmes et fonctions de l'organisme sont activés (système rénine-angiotensine-aldostérone) ou altérés (fonction rénale) pendant la grossesse. Ces derniers seront détaillés ultérieurement dans l'introduction.

## **1.2 Physiologie rénale**

Les reins sont des viscères essentiels à la purification du plasma sanguin. Ils permettent de contrôler la concentration de différentes substances du liquide extracellulaire. Une description générale de la structure, des fonctions et de l'osmorégulation rénales sera abordée dans cette section, ainsi que les modifications rénales observées lors de la grossesse.

### 1.2.1 Anatomie et fonctions du rein

Les reins, organes en forme de haricot, sont situés de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils représentent 0.5% du poids total corporel, et reçoivent environ 20-25% du flot sanguin pompé par le cœur. Ils sont composés de deux régions : le cortex formant la partie externe et la médullaire, la partie interne. A l'intérieur du tissu rénal se trouvent des millions de néphrons. Ces derniers constituent l'unité fonctionnelle du rein. Le néphron, tel que décrit à la figure 1, se divise en deux sections : le corpuscule rénal et le tubule rénal. Le corpuscule rénal contient la capsule de Bowman (chambre à double parois) qui enveloppe un réseau de capillaires nommé glomérule. Le tubule rénal, pour sa part, est différencié en plusieurs parties : tubule contourné proximal, anse de Henlé, tubule contourné distal et tubule collecteur. Ce dernier conduit au bassinet du rein où l'urine formée s'échappe vers la vessie.



**Figure 1 : Anatomie du rein et identification des structures fonctionnelles du néphron.** A gauche, on observe les différentes sections du rein sur une coupe longitudinale, et à droite les différentes parties du néphron sont détaillées. Référence :Kennebecasis Valley High School. Site de KVHS [En ligne], <http://personal.nbnnet.nb.ca/kvhs/biology/kidney.html> (page consultée le 13/07/2000)

La formation de l'urine comporte trois processus principaux : la filtration, la réabsorption et la sécrétion (figure 2). La première étape est la filtration glomérulaire. Le sang entre dans le glomérule par l'artériole afférente et la filtration du sang dépend de trois pressions importantes : pression hydrostatique glomérulaire du sang, pression hydrostatique capsulaire et pression osmotique colloïdale du sang. L'eau ( $H_2O$ ), les substances hydrosolubles, les déchets azotés et les petites molécules sont filtrés à travers les pores de la membrane du glomérule pour se retrouver dans la capsule de Bowman, où ils forment le filtrat. Les éléments sanguins ainsi que les macromolécules, comme les protéines, ne sont pas filtrés et retournent ainsi dans la circulation par l'artériole efférente.

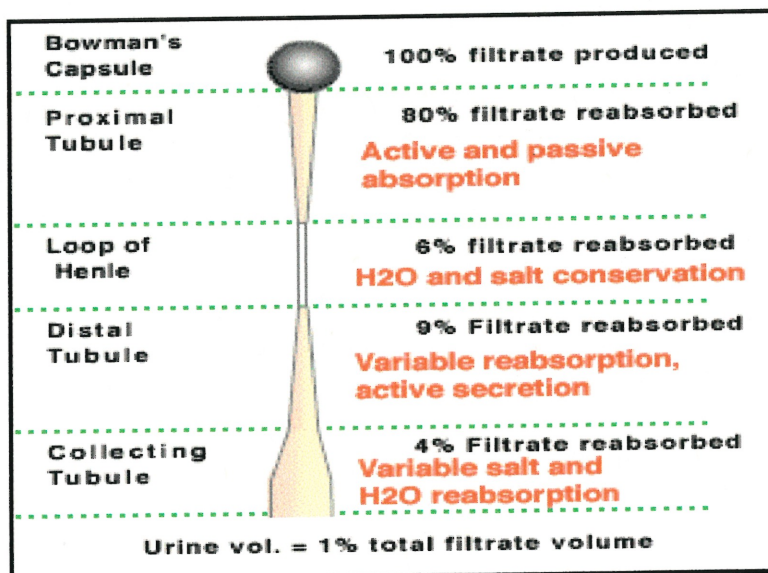
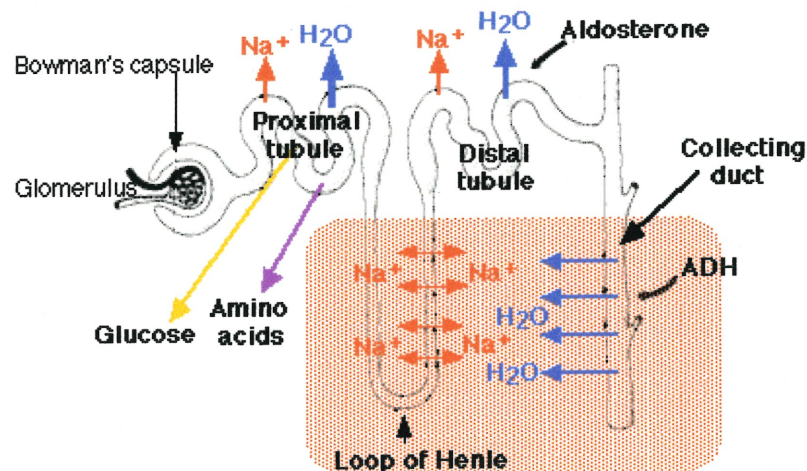


Figure 2 : Étapes menant à la formation de l'urine (filtrat) au travers des diverses parties du néphron.

Par la suite, il y a la réabsorption tubulaire. Le filtrat, collecté dans la capsule de Bowman, coule dans le tubule contourné proximal où 65% de glucose, d'acides aminés et de sels sont réabsorbés au niveau sanguin par

transport actif (figure 3). Parallèlement, l' $H_2O$  suit ces solutés (corps présent en solution) par osmose. Toutefois, seulement 50% de l'urée filtrée va être réabsorbée. Lorsque le filtrat est rendu dans l'anse de Henlé, 25% de sodium ( $Na^+$ ) est réabsorbé, cependant le mouvement parallèle de l' $H_2O$  est grandement réduit. Au niveau du tubule contourné distal, la réabsorption du  $Na^+$  continue par transport actif, et on note une imperméabilité à l' $H_2O$  et l'urée. L'ajustement final de la quantité d' $H_2O$  corporel se produit à la fin du tubule distal et dans le tubule collecteur. Le liquide interstitiel hypertonique entourant le tubule collecteur fournit une forte pression osmotique pour la réabsorption d' $H_2O$ , mais la paroi à ce niveau distal du tubule est imperméable à l' $H_2O$ . Ainsi, l'hormone antidiurétique (ADH), aussi appelée vasopressine (AVP), est nécessaire pour permettre la perméabilité à l' $H_2O$  de la fin du tubule distal et du tubule collecteur. Ceci permet de contrôler le degré de dilution ou concentration de l'urine<sup>20,21</sup>.



**Figure 3 : Les différents sites de réabsorption et de sécrétion des solutés le long du tubule rénal.** La région ombrée rouge représente la partie médullaire du rein. Référence : Kimball's Biology Pages. The kidney [En ligne], <http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/k/kidney.html> (page consultée le 12/07/2000)

Bien que la formation d'urine par le néphron survienne principalement par le mécanisme de filtration-réabsorption, un mécanisme auxiliaire nommé sécrétion tubulaire est aussi impliqué. Les cellules des tubules retirent certaines molécules et ions du sang et les déposent dans le filtrat à l'intérieur du tubule. Ainsi, l'organisme peut éliminer les déchets ou le superflu ionique en les sécrétant directement dans le tubule. La sécrétion tubulaire des ions hydrogène ( $H^+$ ) est d'autant plus importante puisqu'elle maintient constant le pH sanguin <sup>20,21</sup>.

Bien entendu, la fonction rénale est autorégulée et régulée par les systèmes nerveux et hormonaux. L'autorégulation rénale est la capacité des reins à maintenir le flot sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire (TFG) à un niveau constant malgré les modifications de la pression sanguine artérielle. Cette autorégulation dépend d'une rétroaction négative qui implique l'appareil juxtaglomérulaire (JG) situé à la jonction du tubule distal et de l'artériole afférente. Le TFG dépend principalement au niveau hormonal de l'angiotensine II (All) et du peptide natriurétique auriculaire (ANP), ainsi que du système nerveux sympathique. Parce qu'il est essentiel de maintenir une balance précise entre la réabsorption tubulaire et la filtration glomérulaire, il existe plusieurs mécanismes de contrôle local, hormonal ou nerveux qui régule la réabsorption tubulaire. Il y a, entre autre, le phénomène de balance glomérulotubulaire (contrôle local). Cette habilité intrinsèque au tubule rénal consiste à augmenter son taux de réabsorption en réponse à une élévation du flot tubulaire. Quelques hormones régulent également la réabsorption. Au niveau des tubules distal et collecteur, l'aldostérone augmente la réabsorption

de  $\text{Na}^+$ , d' $\text{H}_2\text{O}$  de même que la sécrétion de potassium ( $\text{K}^+$ ), la vasopressine accroît la réabsorption d' $\text{H}_2\text{O}$  et l'ANP diminue la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et d' $\text{H}_2\text{O}$ . Dans le tubule proximal, l'AlI augmente la réabsorption du  $\text{Na}^+$ , de l' $\text{H}_2\text{O}$  et la sécrétion de  $\text{H}^+$ . Une activation du système nerveux sympathique accroît également la réabsorption de  $\text{Na}^+$ <sup>21</sup>.

Une des principales fonctions du rein est le maintien du volume et de la composition ionique des liquides de l'organisme, afin de contribuer à l'homéostasie. De plus, à travers la clairance rénale, le rein nettoie les liquides corporels en éliminant les déchets métaboliques terminaux, tels l'urée, la créatinine et l'acide urique, de même que les composés ioniques normaux présents en trop grande quantité. Le rein régule également, de façon endocrine, les volumes extracellulaires et la pression artérielle par le biais du système rénine-angiotensine, les prostaglandines rénales et le système kallikréine. L'érythropoïétine et le calcitrol, hormones produites par le rein, permettent le contrôle de la masse érythrocytaire et du métabolisme minéral respectivement. Des fonctions métaboliques de gluconéogenèse ou de dégradation de peptides lui sont aussi attribuées<sup>20,21</sup>.

### **1.2.2 Régulation de l'osmolalité et de la natrémie**

Les liquides intracellulaire et extracellulaire contiennent plusieurs solutés différents, toutefois la concentration totale de ces solutés est égale à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule. Les différences de concentration

existent seulement transitoirement parce qu'elles créent une force responsable du mouvement de l' $H_2O$  à travers les membranes cellulaires, nommée pression osmotique. Cette dernière dépend du nombre total de particules de soluté (osmole) dissoutes en solution, une propriété appelée osmolalité. Le chlorure de sodium (NaCl), le glucose et l'urée sont responsables de la majorité des particules de solutés normalement présentes dans le liquide extracellulaire. En effet, le  $Na^+$  est l'ion le plus abondant du compartiment extracellulaire, tandis que le  $K^+$  celui du milieu intracellulaire. Ainsi, la concentration de  $Na^+$  plasmatique reflète la concentration ou la tonicité des liquides corporels. Étant donné la capacité de l' $H_2O$  à diffuser librement à travers pratiquement toutes les membranes cellulaires, le maintien d'une concentration de  $Na^+$  de même que de l'osmolalité plasmatique relativement constante est essentiel au maintien du volume cellulaire. Une chute importante de l'osmolalité et de la concentration de  $Na^+$  plasmatique, sur une courte durée, crée un gradient osmotique à l'origine du mouvement d' $H_2O$  depuis le secteur extracellulaire vers la cellule, responsable d'un œdème cellulaire. Par conséquent, la régulation de l'osmolalité plasmatique et de son principal déterminant, la concentration plasmatique de  $Na^+$ , est obtenue par des modifications de l'apport en  $H_2O$  ou de son excrétion. Il n'est donc pas étonnant que des altérations de la concentration plasmatique de  $Na^+$  nécessite généralement une modification de l'un des facteurs qui affectent la balance hydrique: la libération d'hormone antidiurétique, la soif et l'aldostérone<sup>22</sup>.



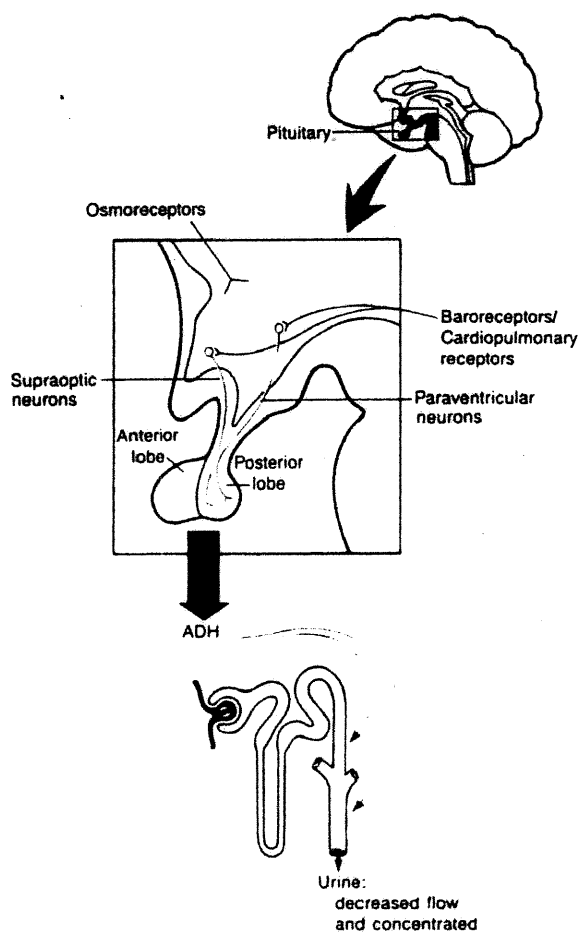
### **1.2.2.1 Osmorécepteurs et vasopressine**

Bien que de multiples mécanismes contrôlent la quantité de  $\text{Na}^+$  et d' $\text{H}_2\text{O}$  excrétés par les reins, un des systèmes primaires impliqués dans la régulation étroite de concentration sodique et d'osmolalité plasmatique est le mécanisme de rétroaction négative osmorécepteurs–vasopressine. Ce système est activé lorsque l'osmolalité (ou  $\text{Na}^+$ ) plasmatique augmente. Ainsi, un rétrécissement cellulaire des osmorécepteurs, localisés dans l'hypothalamus, envoie un signal nerveux à l'hypophyse postérieure pour la relâche d'AVP (figure 4).

Par le biais de la circulation sanguine, l'AVP est transportée jusqu'aux reins où elle augmente la perméabilité des tubules distal (portion terminale) et collecteur. Il en résulte une hausse de réabsorption d' $\text{H}_2\text{O}$  qui est maintenue dans l'organisme, tandis que le  $\text{Na}^+$  et d'autres solutés continuent d'être excrétés dans une urine moindre et concentrée. Ainsi, cette dilution des solutés dans le milieu extracellulaire corrige l'osmolalité trop élevée initialement. La séquence opposée du mécanisme est observée lorsqu'on fait face à une hypo-osmolalité.

Le relâchement d'AVP est aussi contrôlée par des réflexes cardiovasculaires en réponse à une diminution de la pression sanguine et/ou volume sanguin (tableau I). Ils constituent les stimuli non-osmotiques de la sécrétion d'AVP. Ainsi, une chute de pression ou de volume entraîne une grande sécrétion d'AVP qui conduit à une réabsorption d' $\text{H}_2\text{O}$  plus accrue par

les reins pour restaurer la pression et le volume. La relâche d'AVP est toutefois plus sensible aux petits changements osmotiques, et requiert une diminution sévère de volume pour que le réflexe cardiovasculaire joue un rôle majeur dans la stimulation de sécrétion d'AVP <sup>22</sup>.



**Figure 4 : Neuroanatomie de l'hypothalamus, où l'hormone antidiurétique (ADH) est synthétisée, et de la neurohypophyse, où l'ADH est relâchée. L'ADH augmente la perméabilité de la portion terminale du tubule distal de même que le tubule collecteur, ainsi la réabsorption d'H<sub>2</sub>O est augmentée et l'urine moindre et concentrée. (Schéma tiré de la référence 22 p.360)**

**Tableau I : Facteurs régulant la sécrétion de l'hormone antidiurétique.**

(Tableau tiré de la référence 22 p.362)

<b>Augmentation de l'hormone antidiurétique</b>	<b>Diminution de l'hormone antidiurétique</b>
↑ Osmolalité plasmatique	↓ Osmolalité plasmatique
↓ Volume sanguin	↑ Volume sanguin
↓ Pression sanguine	↑ Pression sanguine
Nausée	
Hypoxie	
<u>Médicaments :</u>	<u>Médicaments :</u>
Morphine	Alcool
Nicotine	Clonidine (antihypertenseur)
Cyclophosphamide	Halopéridol (bloqueur dopaminergique)

**1.2.2.2 Mécanisme de la soif**

La prise de liquide est régulée par le mécanisme de la soif, lequel en association avec le mécanisme osmorécepteurs-vasopressine et l'aldostérone, maintient un contrôle précis de l'osmolalité et de la concentration sodique du liquide extracellulaire. Également situés dans l'hypothalamus, les neurones du centre de la soif sont stimulés d'une façon similaire à celle des osmorécepteurs, ce qui déclenche le besoin de boire. Plusieurs stimuli activent le mécanisme de la soif (tableau II). L'un des stimuli majeur est l'augmentation de l'osmolalité plasmatique, laquelle cause une déshydratation intracellulaire dans le centre de la soif et par conséquent, stimule la sensation de boire. Une diminution du volume extracellulaire et de la pression artérielle stimule également la soif par un procédé qui est

indépendant de celui stimulé par la hausse d'osmolalité. Un troisième stimulus de la soif est l'All qui est aussi stimulée par des facteurs associés à l'hypovolémie et à une faible pression sanguine. Le désir de boire est complètement satisfait seulement lorsque l'osmolalité et/ou le volume plasmatique retournent à la normale <sup>22</sup>.

**Tableau II : Facteurs régulant le mécanisme de la soif.**

(Tableau tiré de la référence 22 p.362)

<b>Augmentation de la soif</b>	<b>Diminution de la soif</b>
↑ Osmolalité	↓ Osmolalité
↓ Volume sanguin	↑ Volume sanguin
↓ Pression sanguine	↑ Pression sanguine
↑ Angiotensine II	↓ Angiotensine II
Sécheresse de la bouche	Distension gastrique

L'H<sub>2</sub>O est également perdue par évaporation. Ainsi, il y a toujours une tendance à la déshydratation résultant en une augmentation de l'osmolalité. Lorsque le Na<sup>+</sup> plasmatique augmente de seulement 2 mEq/L au-dessus de la normale, le mécanisme de la soif est activé et cause le désir de boire de l'eau. C'est ce qu'on appelle le seuil de la soif. De cette façon, l'osmolalité et la concentration sodique du liquide extracellulaire sont précisément contrôlées.

Normalement, les mécanismes de la soif et des osmorécepteurs-vasopressine fonctionnent en parallèle pour une régulation précise de l'osmolalité et de la concentration de Na<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire.

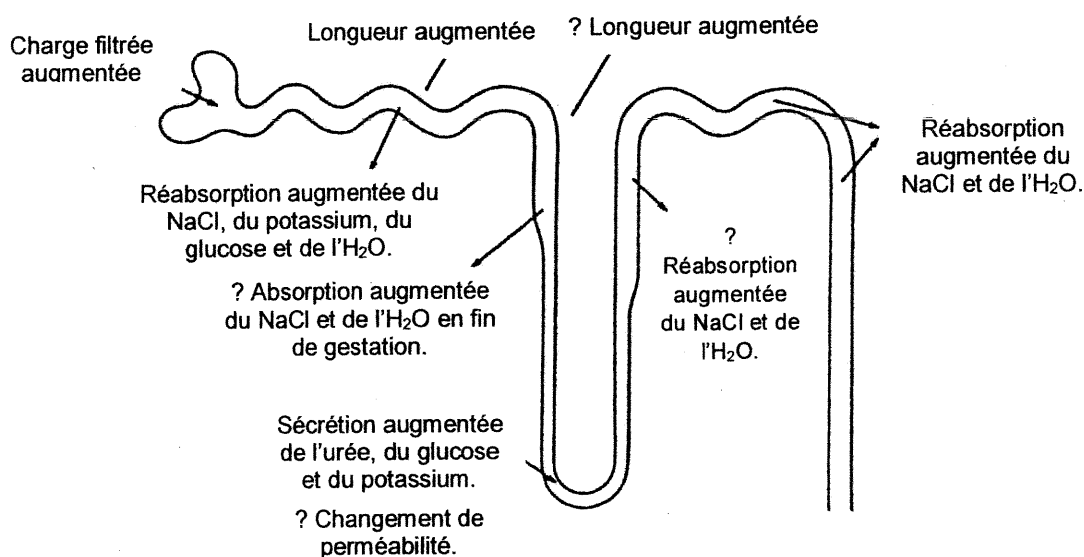
Cependant, si les deux mécanismes faisaient défaut simultanément aucun contrôle adéquat ne pourrait être assuré par les reins <sup>22</sup>.

### **1.2.3 Changements rénaux au cours de la grossesse**

Des altérations au niveau de la fonction rénale et de l'homéostasie sodique sont induites au cours de la grossesse. Le rein maintient la balance hydrique et retient le sodium, ainsi un réajustement des mécanismes contrôlant le volume doit survenir lors de la grossesse pour s'adapter aux nombreux changements physiologiques engendrés, tel l'expansion du volume plasmatique. Autant chez la femme que chez le rat, la grossesse entraîne une hausse du flot sanguin rénal (FSR) <sup>23,24</sup>. Le taux de filtration glomérulaire se voit également élevé de 20-30% chez la rate gestante <sup>25</sup>, et d'environ 50% chez la femme enceinte <sup>23</sup>. Le moment où cette hausse du TFG atteint son maximum, chez la rate, est controversé dans la littérature. Baylis et al. <sup>24</sup> rapporte que la hausse maximale du TFG correspond au milieu de la gestation (entre jour 6 et 12), tandis que le groupe d'Alexander <sup>25</sup> observe cette augmentation en fin de gestation. Une légère diminution du TFG serait toutefois notée près du terme de la gestation chez la rate <sup>26</sup>. Plusieurs mécanismes affectent cette augmentation du TFG lors de la grossesse. On pourrait croire que l'expansion volumique conduise à cette hausse du TFG suite à une vasodilatation rénale. Cependant, Baylis <sup>24</sup> a démontré qu'il n'existait aucune relation directe entre l'augmentation du TFG gestationnel et l'expansion du volume plasmatique maternel en fin de gestation. Au jour 12

de gestation chez la rate, il a été rapporté que l'augmentation du TFG est due à une hausse proportionnelle du FSR tandis qu'aucun changement n'est observé dans d'autres déterminants de l'ultrafiltration glomérulaire <sup>27</sup>. Ajouté à l'expansion du volume, d'autres facteurs (pas bien déterminés à ce jour) sont probablement impliqués dans la hausse du TFG, soient des hormones maternelles ou des produits d'origine placentaire <sup>24-26</sup>.

Cette hausse de filtration glomérulaire entraîne une charge importante d'H<sub>2</sub>O, d'ions et de solutés dans le rein. Ainsi, la réabsorption survenant dans les tubules rénaux doit être modifiée pour prévenir une carence dans l'organisme maternel <sup>27</sup>. De plus, pendant la grossesse, la rétention nette de Na<sup>+</sup>, chlore (Cl<sup>-</sup>), K<sup>+</sup>, d'H<sub>2</sub>O et de solutés est sans doute associée à une augmentation de la réabsorption rénale. Green et Hatton <sup>28</sup> ont rapporté des modulations de la réabsorption le long du tubule rénale lors de la gestation (figure 5). Une augmentation de réabsorption de NaCl et d'H<sub>2</sub>O parallèlement à celle de K<sup>+</sup> est observée au niveau du tubule proximal qui est plus long chez la rate gestante <sup>28</sup>. Au niveau de l'anse de Henlé, une augmentation de réabsorption de Na<sup>+</sup> survient également lors de la gestation, et un changement de perméabilité permettrait une plus grande entrée de glucose, urée et K<sup>+</sup> à ce niveau. Quant aux tubules distal et collecteur, une augmentation de la réabsorption du NaCl et de l'H<sub>2</sub>O est présente surtout en fin de gestation.



**Figure 5 : Résumé des changements tubulaires dans le néphron durant la gestation.** Cette hausse de filtration glomérulaire, notée durant la gestation, amène une charge importante d'H<sub>2</sub>O, d'ions et de solutés dans le rein entraînant ainsi des modifications au niveaux des tubules rénaux. (Schéma tiré de la référence 28 p. 268).

Il est bien connu que la gestation est associée à une rétention de Na<sup>+</sup> cumulative importante, laquelle survient principalement dans la dernière semaine de gestation<sup>5</sup>. Cette conservation de Na<sup>+</sup> est partagée par la mère et le fœtus pour répondre aux besoins du fœtus grandissant et pour atteindre l'expansion du volume plasmatique dans le compartiment maternel<sup>29</sup>. Plusieurs facteurs contribuent à cette accumulation tissulaire de Na<sup>+</sup>, tels que les œstrogènes, l'aldostérone avec sa propriété antinatriurétique de même que l'activation du système rénine-angiotensine (SRA)<sup>5</sup>. Ces changements dans la balance hydrique et sodique nécessitent une altération au niveau de l'osmorégulation lors de la grossesse. En effet, chez la femme comme chez le rat, l'osmolalité plasmatique est réduite<sup>30</sup> et une diminution parallèle du seuil de la soif ainsi que de la relâche d'AVP est observée<sup>31,32</sup>.

### **1.3 Système rénine-angiotensine**

En plus de sa capacité à contrôler la pression artérielle à travers des changements au niveau du volume extracellulaire, le rein possède un autre puissant mécanisme pour régulariser la pression. Il s'agit du système rénine-angiotensine (SRA). Dans la section suivante, les différentes composantes du SRA de même que leur rôle seront détaillés. Les récepteurs d'angiotensine II seront également décrits au niveau de leur structure et de leur distribution tissulaire. En dernier lieu, nous verrons comment ce système est régulé lors de la grossesse.

#### **1.3.1 Composantes du SRA**

La rénine est une enzyme protéinase qui est principalement synthétisée à l'intérieur des cellules du muscle lisse de l'artériole afférente rénale. Son précurseur, la prépro-rénine, une protéine de 406 acides aminés est transformée en pro-rénine puis en rénine active. La rénine est emmagasinée sous forme de granule à l'intérieur des cellules, et par la suite est relâchée dans la circulation. L'artériole afférente, le glomérule et une portion du tubule distal, en contact étroit avec l'artériole afférente, constitue une structure anatomique nommée appareil juxtaglomérulaire dont les cellules sont chargées de la relâche de la rénine. Ce relâchement de rénine par les cellules de l'artériole afférente est contrôlée par des signaux hémodynamiques, ioniques et neurologiques. Une diminution de la pression



dans l'artère rénale réduit l'étirement des cellules contenant la rénine, provoquant ainsi son relâchement. En effet, ces cellules rénales agissent à titre de barorécepteurs intrarénaux qui peuvent déterminer les variations de pression de la perfusion rénale. Une diminution de la concentration de  $\text{Na}^+$  (contrôle ionique) est également un stimulus entraînant la relâche de rénine. D'autre part, la rénine peut être relâchée suite à une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques rénaux, activité contrôlée par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents dans les cellules sécrétant la rénine. Bref, une baisse de pression sanguine et de volume sanguin sont capable de stimuler le relâchement de rénine, soit directement par le mécanisme des barorécepteurs intrarénaux ou indirectement via l'augmentation de l'activité des nerfs sympathiques<sup>33,34</sup>.

Une fois dans la circulation sanguine, la rénine agit sur une  $\alpha_2$ -macroglycoprotéine, l'angiotensinogène qui est synthétisé et relâché par le foie. La rénine, par une action hydrolytique, clive les 10 premiers acides aminés de l'angiotensinogène pour former l'angiotensine I (AI). Ce décapeptide est rapidement clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), que l'on retrouve surtout dans le lit vasculaire pulmonaire, pour donner l'octapeptide actif angiotensine II (AII). La conversion de l'AI en AII est lente dans du plasma isolé mais rapide *in vivo*, indiquant que la plus grande partie de l'hydrolyse se produit par l'action de l'ECA présente à la surface des cellules endothéliales. Lorsque l'AII est présente, elle inhibe la sécrétion de rénine. Ainsi, un mécanisme de

rétrocontrôle négatif existe pour la formation de l'Angiotensine II (Ang II). Il existe également des angiotensinases qui coupent l'Ang II en angiotensine III (Ang III), puis en peptides dont l'action n'est pas très bien connue. Il est à noter que l'ECA peut également inactiver la bradykinine, un peptide possédant des propriétés de vasodilatation. Donc, via ces deux voies métaboliques, l'activité enzymatique de l'ECA favorise l'élévation de la pression artérielle <sup>33,34</sup> (figure 6).

La découverte de composés du SRA dans plusieurs tissus a conduit à l'hypothèse qu'en plus d'être une hormone plasmatique, l'Ang II pourrait être formée localement, et par conséquent posséder une action autocrine ou paracrine <sup>34</sup>. Toutefois, pour que l'Ang II soit considérée comme un effecteur local dans les tissus (mise à part l'implication des récepteurs), tous les composés du SRA doivent être présents à l'intérieur du tissu. Ainsi, l'Ang I et l'Ang II pourraient être produits. Samani et al <sup>35</sup> ont détecté la présence d'ARNm de rénine dans le foie et le cerveau de rat, de même qu'en plus faible quantité dans la surrénale, l'aorte, le cœur, le poumon et la rate. L'ARNm de l'angiotensinogène fut détecté dans des tissus extra-hépatiques de rat tels rein, surrénale, cœur et cerveau <sup>36</sup>. L'ECA en plus d'être localisée dans les cellules endothéliales, se trouve dans les neurones, les cellules tubulaires rénales et les monocytes <sup>37</sup>. De plus, tous les composés du SRA sont exprimés au niveau du cerveau, ce qui suggère que l'Ang II y soit formée localement <sup>38</sup>. Un SRA local a également été démontré dans l'unité fœto-placentaire qui pourrait moduler la perfusion placentaire <sup>39</sup>.

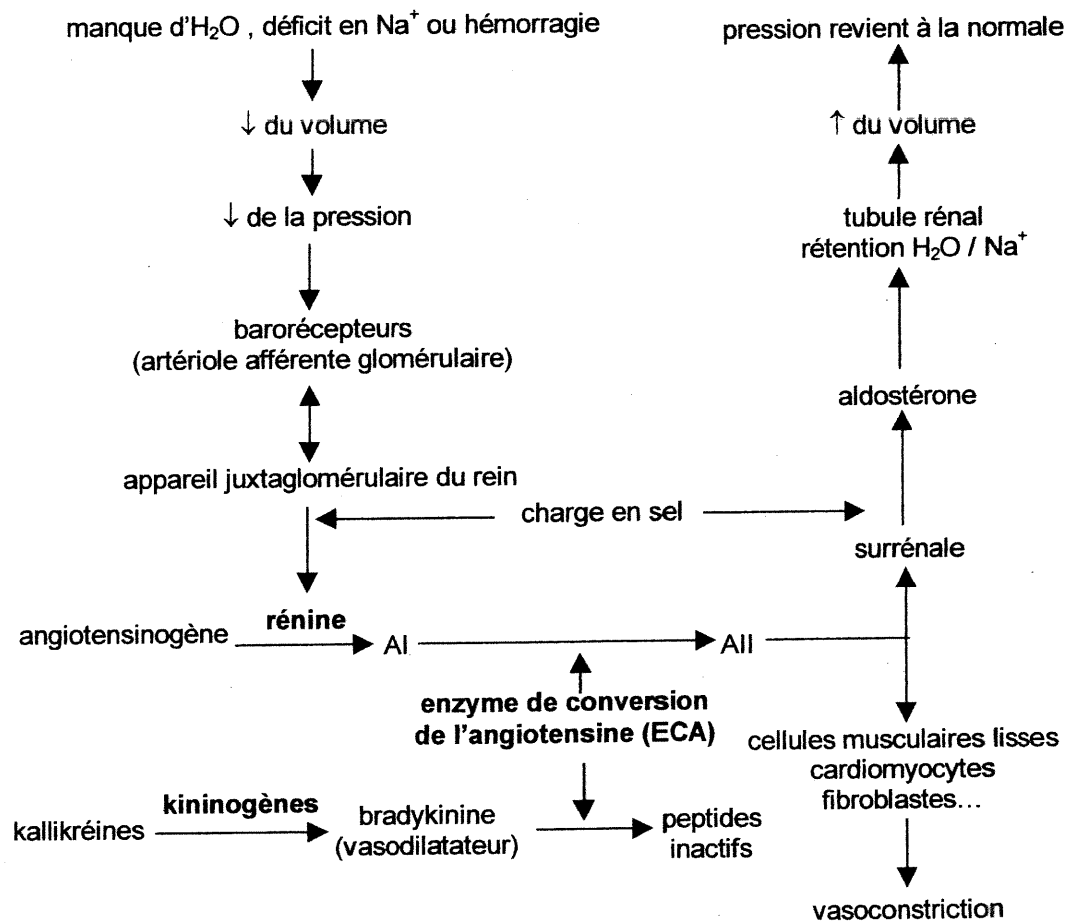


Figure 6 : Composantes du système rénine-angiotensine-aldostérone.

### 1.3.2 Fonctions biologiques de l'AII

L'AII représente le médiateur principal du SRA. Cette hormone peptidique exerce diverses actions biologiques au niveau du système cardiovasculaire, endocrinien, rénal de même que le système nerveux central et périphérique <sup>40</sup>, tel que mentionnées dans le tableau III. L'action primaire du SRA est de modifier la résistance vasculaire et l'excrétion rénale sodique et hydrique en réponse aux altérations de volume des fluides extracellulaires

<sup>34</sup>. L'AII joue un rôle majeur dans la régulation de la pression sanguine en

exerçant une vasoconstriction sur les vaisseaux artériels et périphériques. Elle contribue à la contraction des myocytes cardiaques (MC) de même que les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) <sup>33</sup>. L'Angiotensin II agit aussi comme facteur de croissance sur la corticosurrénale de même que divers types cellulaires, tels fibroblaste, CMLV, et MC <sup>41</sup>. Cette hormone est également impliquée dans l'homéostasie des sels et des liquides. Les effets de l'Angiotensin II sur le rein sont multiples. Elle agit directement sur le glomérule et les cellules du tubule proximal pour promouvoir la réabsorption du  $\text{Na}^+$  <sup>33,34</sup>. Son effet vasoconstricteur sur l'artériole efférente hausse le taux de filtration glomérulaire et ramène la pression artérielle à la normale. L'Angiotensin II est aussi un facteur dominant dans le contrôle de la biosynthèse et la sécrétion d'aldostérone <sup>33,41,42</sup>. Ce stéroïde, produit par la zone glomérulée de la surrénale, est impliqué dans la régulation des électrolytes. Ainsi, les effets de l'Angiotensin II sur la sécrétion d'aldostérone vont permettre la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et d' $\text{H}_2\text{O}$  en échange d'ions  $\text{H}^+$  et  $\text{K}^+$  au niveau des tubules distal et collecteur. L'aldostérone va ainsi participer au maintien de l'osmolalité plasmatique. L'Angiotensin II stimule également la sécrétion de d'autres hormones, telles l'ACTH, la prolactine et l'hormone lactogène placentaire <sup>34</sup> impliquées respectivement dans la stimulation des glucocorticoïdes, la sécrétion du lait par les glandes mammaires et la croissance fœtale.

L'Angiotensin II peut également stimuler la relâche de catécholamines par la médullosurrénale ou des peptides vasoactifs par l'endothélium vasculaire <sup>41</sup>. Au niveau du système nerveux central, une stimulation de la relâche de

noradrénaline est engendrée par le peptide All ce qui initie une hausse de l'activité du système nerveux sympathique. L'All provoque aussi la libération de vasopressine, stimule la soif de même que l'appétit salé et a des effets sur le comportement<sup>40-42</sup>. Tous ces effets physiologiques sont déclenchés par la liaison de l'All à ses récepteurs, couplés à plusieurs voies de signalisation intracellulaires qui, lorsqu'activées, conduisent à la réponse biologique.

**Tableau III : Actions biologiques engendrées par l'angiotensine II.**

(Tableau tiré de la référence 33 p.159)

---

**Actions biologiques engendrées par l'angiotensine II**

---

- Contraction des muscles lisses vasculaires
  - Stimulation de la relâche de diverses hormones, telles que minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes par le cortex surrénalien, les catécholamines par la médullaire surrénalienne, l'AVP et l'ACTH par l'hypophyse
  - Inhibition de la relâche de rénine par les cellules JG du rein
  - Facilitation de la relâche de noradrénaline par les terminaisons nerveuses périphériques
  - Stimulation des cellules endothéliales et autres cellules pour la production de PGs
  - Effet direct sur les cellules tubulaires rénales pour stimuler la réabsorption de Na<sup>+</sup>
  - Stimulation de l'hypertrophie vasculaire et des myocytes cardiaques
  - Stimulation de la soif, contrôlée par le cerveau
  - Effets divers sur les systèmes reproducteurs incluant l'utérus, le placenta (mécanismes plus ou moins définis)
  - Développement foetal
  - Glycogénolyse dans les hépatocytes
- 

**1.3.3 Descriptions des récepteurs d'All**

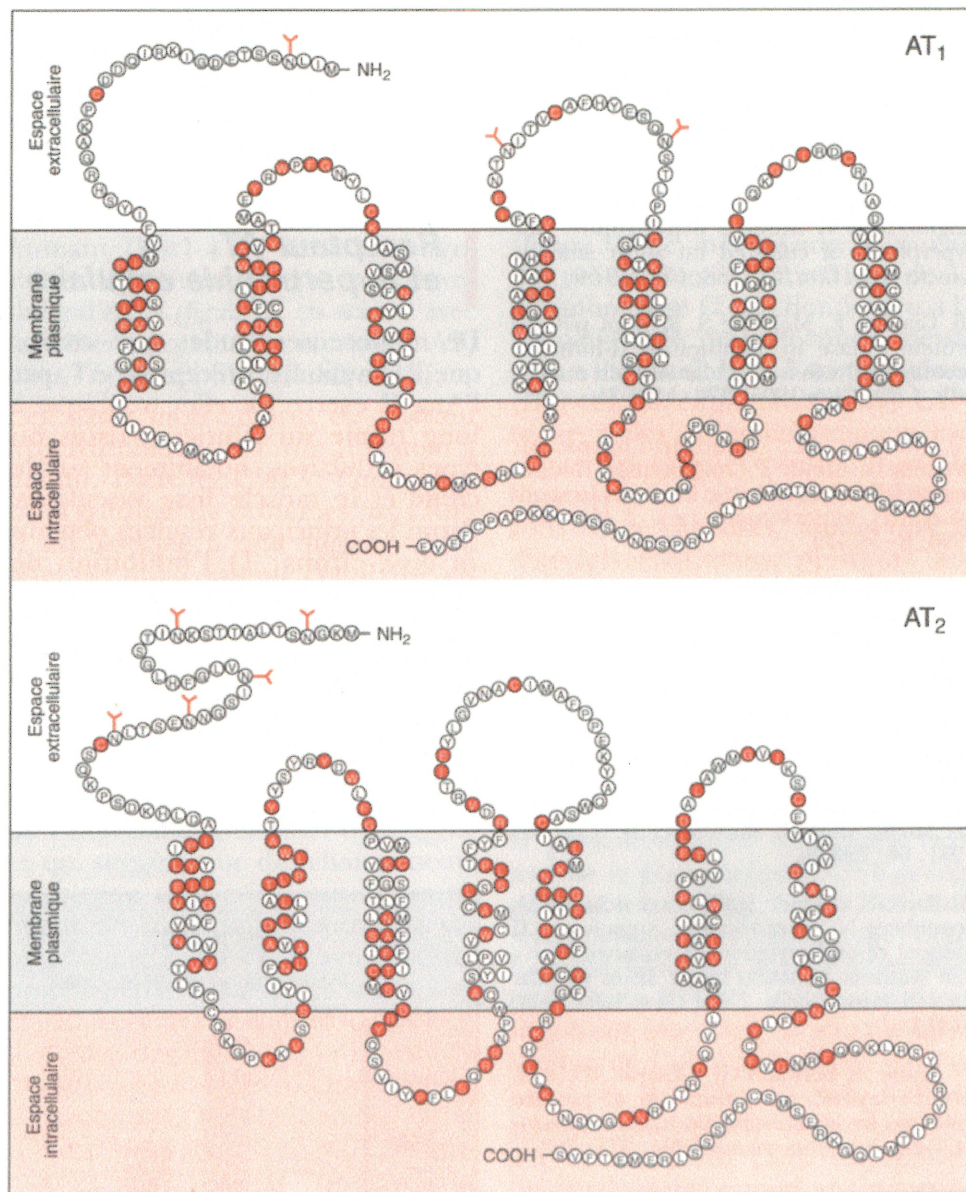
Le développement pharmacologique de ligands peptidiques et non-peptidiques fut à la base de l'identification et de la caractérisation de deux sous-classes distinctes de récepteurs d'All, soit le type I (AT<sub>1</sub>) et le type II (AT<sub>2</sub>)<sup>34,40</sup>. En effet, les caractéristiques de liaison des ligands, la sensibilité à des agents réducteurs et le couplage à divers seconds messagers sont des

critères qui ont permis la classification de ces sous-populations de récepteurs<sup>41</sup>. Ces deux types de récepteurs font partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, et forment chacun un dimère avec 2 sous-unités identiques (figure 7). On retrouve 34% d'homologie entre les séquences d'acides aminés des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub><sup>34,41,43</sup>.

Deux autres types de récepteurs d'angiotensine ont également été observés. Le récepteur AT<sub>3</sub> a été identifié au niveau de culture cellulaire de neuroblastomes<sup>43</sup>. Le récepteur AT<sub>4</sub>, liant l'angiotensine IV (AIV), a été démontré dans le cerveau où il serait impliqué dans la microcirculation cérébrale. Le rôle physiologique de l'AT<sub>4</sub> semble être opposé aux actions vasoconstrictrice, hypertrophique et mitogénique régulées par l'AT<sub>1</sub>. C'est principalement au niveau du cerveau que l'on retrouve l'AT<sub>4</sub>, mais il est aussi présent dans les reins, la vessie et le cœur quoique sa fonction précise n'est pas encore définie<sup>44,45</sup>.

### **1.3.3.1 Récepteurs d'All de type I (AT<sub>1</sub>)**

Le récepteur membranaire AT<sub>1</sub> est une protéine constituée de 359 acides aminés, couplée à une protéine G. Sa masse moléculaire observée est d'environ 65 kDa, contrairement à la masse moléculaire déduite de 41



**Figure 7 : Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II.** Les séquences humaines des sous-types AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> des récepteurs de l'Ang II sont présentées. Les résidus identiques entre les deux protéines sont indiqués par des cercles rouges. Les sites de N-glycosylation sont représentés par le signe Y (en rouge). Les récepteurs AT<sub>3</sub> et AT<sub>4</sub> ne sont pas représentés car leur structure est encore peu définie. (Schéma tiré de la référence 41 p. 1353).

kDa, résultat de la glycosylation de la protéine <sup>41</sup>. Au niveau pharmacologique, le récepteur AT<sub>1</sub> est sélectivement inhibé par plusieurs antagonistes nonpeptidiques de l'All, tel le Losartan (Dup753) <sup>34</sup>. Le gène codant pour l'expression de l'AT<sub>1</sub> chez l'humain est localisé sur le chromosome 3 <sup>47</sup>. Chez le rat, il est toutefois possible de subdiviser la classe AT<sub>1</sub> en 2 sous-types de récepteurs soient AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub>. En effet, l'ADN complémentaire (ADNc) de l'AT<sub>1</sub> a été cloné chez le rat <sup>48</sup> et le bovin <sup>49</sup>, et une similitude de 95% de la séquence protéique a été observée entre les 2 sous-types AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub>. Il fut démontré dans les cellules mésangiales de rat que le récepteur AT<sub>1a</sub>, comptant pour 90% des sites totaux de liaison de l'All, possède une forte affinité pour le losartan, mais est insensible à l'antagoniste pharmacologique du récepteur AT<sub>2</sub> nommé PD123319. Le 10% des sites de liaison restant démontre une plus faible affinité pour le losartan que pour le PD123319, et est ainsi nommé AT<sub>1b</sub> <sup>50</sup>.

Lorsque l'All se lie à son récepteur AT<sub>1</sub>, des voies de signalisation s'activent via le couplage à l'une ou l'autre des 2 protéines G hétéromériques: G<sub>αi</sub> ou G<sub>αq</sub> <sup>51</sup>. Tel que décrit à la figure 8, la liaison de l'All sur les portions extracellulaires et membranaires du récepteur AT<sub>1</sub> relâche la sous-unité α et, par conséquent, active la phospholipase C (PLC) via G<sub>q</sub> ou inhibe l'adénylate cyclase via G<sub>i</sub>. L'activation de la PLC entraîne la production des seconds messagers : inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et 1,2-diacylglycérol (DAG) <sup>34,41</sup>. Chacun de ces métabolites active des voies de signalisation différentes. L'IP<sub>3</sub> induit la libération de calcium (Ca<sup>2+</sup>) via les réserves intracellulaires et



indirectement stimule les canaux calciques voltage dépendant de type-L. Cette hausse de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est provoquée par les réponses associées au récepteur  $\text{AT}_1$  telles que la vasoconstriction, la rétention rénale de sel et d'eau, la relâche d'aldostérone et de vasopressine, l'effet sur le TFG et le flot sanguin rénal de même que la stimulation de la croissance cellulaire <sup>51</sup>.

Pour sa part, le DAG active plusieurs isoformes de protéines kinases C (PKC) et la formation d'acide arachidonique (AA) de façon parallèle. L'activation de la PKC va contribuer à la stimulation de la synthèse des prostaglandines (PGs) et la contraction des cellules musculaires lisses (CML) <sup>34</sup>. Il a été suggéré que la PKC pourrait réguler l'expression des gènes et la prolifération cellulaire <sup>52</sup>. L'All, via l' $\text{AT}_1$ , promeut l'expression de facteurs transcriptionnels (ex : gène c-fos) qui pourraient être impliqués dans la stimulation de la mitogenèse <sup>53</sup>. Les effets trophiques de l'All, observés dans les CMLV en culture, sont dus uniquement aux  $\text{AT}_1$ . Les mécanismes conduisant aux réponses de croissance cellulaire, lorsque les CMLV sont stimulées avec l'All, demeurent encore un peu mal définis. Toutefois, leur description dépasse le cadre de mon travail.

L'All peut également stimuler la phospholipase D (PLD) et la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) entraînant une hausse de la production de PGs. L'All active aussi l'initiation de la mitogenèse et de la synthèse protéique (hypertrophie cellulaire) <sup>33,34,41</sup>. Bref, la majorité des fonctions biologiques déclenchées par l'All, incluant l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire, la

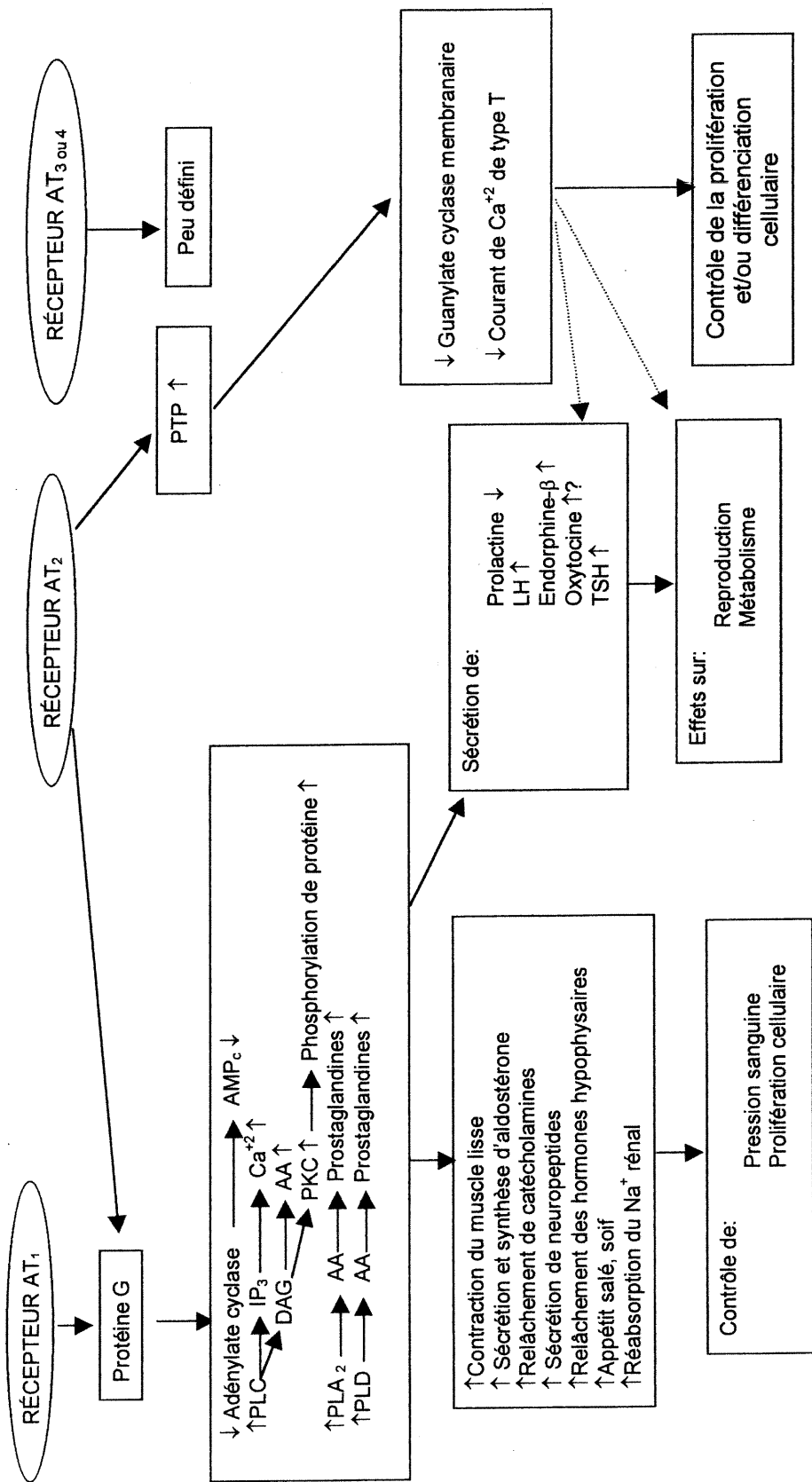
stimulation de synthèse d'hormone ainsi que le transport ionique dans le cœur, les reins et les surrénales, résulte de la liaison de l'Ang II à son récepteur  $AT_1$ <sup>54</sup>. Récemment, l'utilisation de souris déficiente pour le récepteur  $AT_1$  (« knock-out ») a permis de spécifier la fonction de ce récepteur. En effet, il a été démontré que des souris déficientes en  $AT_{1a}$ , comparativement aux souris témoins, ont une pression artérielle plus faible, une augmentation de la production de rénine de même qu'une hypertrophie/hyperplasie des cellules juxtaglomérulaires<sup>55,56</sup>. Toutefois, ces altérations sont beaucoup moins remarquables que le phénotype observé chez les souris déficiente pour l'angiotensinogène. Des souris déficientes en  $AT_{1b}$  existent également, où on ne retrouve pas l'hypertrophie ou la prolifération anticipée dans les reins<sup>57</sup>. Ceci pourrait suggérer que les récepteurs  $AT_{1a}$ , qui sont exprimés de façon prédominante dans les reins de souris, puisse prendre le relais des récepteur  $AT_{1b}$  quand le gène de ce dernier est absent.

### **1.3.3.2 Récepteur d'Ang II de type II ( $AT_2$ )**

Le récepteur  $AT_2$  situé dans la membrane plasmique, tout comme le récepteur  $AT_1$ , est composé de 363 acides aminés avec une masse moléculaire déduite de 41.3 kDa<sup>41</sup>. La variabilité du poids moléculaire de l' $AT_2$  dépendrait du degré de glycosylation selon les tissus. Au niveau pharmacologique, l' $AT_2$  est bloqué par l'antagoniste nonpeptidique PD123319<sup>34</sup>. L' $AT_2$  fut cloné et séquencé chez le rat à partir d'une librairie d'expression de fœtus<sup>58</sup>. L'expression du gène codant pour l' $AT_2$  chez l'humain est situé sur le chromosome X<sup>59</sup>. Bien que l' $AT_2$  possède une faible analogie avec le

récepteur AT<sub>1</sub>, le mode de transmission du signal du récepteur AT<sub>2</sub> (figure 8) semble atypique contrairement à la majorité des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

En effet, contrairement à l'AT<sub>1</sub>, les sites de liaison de l'AT<sub>2</sub> sont insensible aux nucléotides guanines et ne semble pas être couplé aux protéines G<sup>46</sup>, toutefois le couplage aux protéines G et le mode de signalisation demeure incertain dans la littérature<sup>34</sup>. D'une part, il a été rapporté que l'AT<sub>2</sub>, chez le rat, inhibe une protéine tyrosine phosphatase (PTP) et cet effet est dépendant d'un mécanisme couplé aux protéine G<sup>60</sup>. D'autre part, Mukoyama et al<sup>58</sup> ont rapporté que l'AT<sub>2</sub>, chez le rat, partagerait une topologie à 7 domaines transmembranaires qui semble appartenir à une classe unique de récepteurs à 7 passages transmembranaires pour lesquels le couplage à une protéine G n'a pas été démontré. Dans ces études, la stimulation de l'AT<sub>2</sub> n'augmente pas l'IP<sub>3</sub> ou le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et aucun effet apparent sur l'AMPc ou le GMPc ou sur l'activité de PTP n'ont été observés. Contrairement à ces observations, les études effectuées par Chassagne et al.<sup>41</sup> suggèrent que la liaison de l'AlI à l'AT<sub>2</sub> pourrait stimuler l'activité d'une PTP et entraîner la déphosphorylation et l'inactivation de protéines kinases et/ou d'effecteurs essentiels pour la synthèse d'ADN et de protéines. Ils suggèrent également que l'activation de l'AT<sub>2</sub> provoquerait la libération d'AA dans certains types cellulaires<sup>41</sup>. Plusieurs investigations restent à faire sur la compréhension du mécanisme de signalisation du récepteur AT<sub>2</sub>.



**Figure 8 : Mécanismes de signalisation des sous-types de récepteurs d'angiotensine II.** Les voies de signalisation des récepteurs AT<sub>3</sub> et AT<sub>4</sub>, étant très peu définies, ne sont pas illustrées ici. (Schéma tiré de la référence 34 p. 161).

La phosphorylation d'une PTP suite à la liaison de l'All à l'AT<sub>2</sub>, l'expression du récepteur AT<sub>2</sub> dans les tissus foetaux ainsi que sa disparition rapide après la naissance suggèrent que ce récepteur joue un rôle dans les processus physiologiques impliquant l'adhésion, la différenciation et la croissance cellulaire <sup>51</sup>. L'effet antiprolifératif de l'AT<sub>2</sub> s'exercerait en partie par une induction d'apoptose selon des études réalisées sur les lignées cellulaires R3T3 et PC12W, toutes deux exprimant seulement AT<sub>2</sub> <sup>61</sup>. Ainsi, les effets de l'All sur la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire semblent être contrôlés par l'équilibre entre les 2 sous-types de récepteurs d'All. L'effet anti-prolifératif exercé par AT<sub>2</sub> s'oppose donc à l'action trophique exercée par AT<sub>1</sub> ou à l'effet mitogénique de d'autres facteurs de croissance <sup>41</sup>. Toutefois, en plus de l'All, d'autres mécanismes existent dans le contrôle de l'équilibre de la croissance/différenciation/apoptose. Récemment, Carey et al <sup>62</sup> indiquait que l'AT<sub>2</sub> jouerait un rôle dans la régulation de la pression sanguine et la fonction rénale. L'AT<sub>2</sub> stimulerait la vasodilatation et la natriurèse par une cascade autocrine incluant la bradykinine, le NO et la GMPc <sup>62</sup>. Ceci s'opposerait aux actions vasoconstrictrices et d'antinatriurèse de l'AT<sub>1</sub>. L'AT<sub>2</sub> contrôlerait aussi les PGs vasodilatatrices qui ont un rôle dans la régulation de la pression sanguine <sup>62</sup>. Appuyant ces résultats, des souris transgéniques dont le gène codant pour l'AT<sub>2</sub> a été inactivé montrent un comportement exploratoire réduit et un effet accru de l'All sur la pression artérielle <sup>63,64</sup>. En effet, ces souris « knock-out » pour l'AT<sub>2</sub> sont hypertensive et dépourvues d'anormalité morphologique au niveau rénal.

### **1.3.4 Distribution tissulaire des récepteurs d'All**

Les deux principaux types de récepteurs d'All,  $AT_1$  et  $AT_2$ , ne se trouvent pas distribués également dans tous les tissus somatiques <sup>34</sup>. Les tissus tels le foie, les poumons, les reins, le placenta, la vessie, le tractus gastro-intestinal et les cellules du muscle lisse aortique expriment en majorité le récepteur  $AT_1$ . En opposition, les tissus tels le pancréas et le follicule ovarien atrétique exprime principalement les récepteurs  $AT_2$ . Les deux sous-types sont exprimés dans les surrénales, le cœur, les artères rénales et l'utérus. La proportion des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  change durant le développement et ce, jusqu'à la vie adulte <sup>34</sup>. En effet, l'expression des  $AT_2$  est abondante durant la vie foetale et postnatale comparée à son expression limitée dans quelques organes lors de la vie adulte. La proportion des sous-types de récepteurs d'All varie à travers les tissus d'une même espèce, de même que d'une espèce à l'autre (tableau IV) <sup>65</sup>. Par exemple, le cortex surrénalien de bovin exprime uniquement le sous-type  $AT_1$ , tandis que le cortex surrénalien de rat exprime les deux sous-types <sup>66</sup>.

La zone glomérulée de surrénale de rat démontre une prédominance des récepteurs  $AT_1$  où on retrouve 75-80% des sites de liaison ayant une affinité pour le losartan ( $AT_1$ ), et 20-25% démontrant des caractéristiques pharmacologiques de type  $AT_2$ . Dans les zones internes de la glande surrénale (fasciculée, réticulée et médulla), le patron de distribution est inversé où on observe une majorité d' $AT_2$ , soit 60-70% de liaison avec le PD123319, et une minorité d' $AT_1$  <sup>65-67</sup>.

**Tableau IV : Distribution tissulaire des récepteurs d'Angiotensine, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>.**

(Tableau tiré de la référence 34 p.138)

Organes	espèces animales	AT <sub>1</sub>	AT <sub>2</sub>	
Surrénales	Cortex	rat, lapin, chien, humain	+	+
		bovin	+	-
	Médulla	rat, humain	±	+
		bovin	+	-
Reins	rat, humain	+	?	
	lapin	+	-	
	singe	+	+	
Capsule	lapin	+	+	
Utérus	lapin, rat	+	+	
	singe, humain	-	+	
Placenta	humain	+	-	
Cerveau	rat, lapin, singe	+	+	
	Hypophyse antérieure tumeur murine	+	-	
Cellules R3T3		-	+	
Pheochromocytome PC12W		-	+	

Au niveau rénal, il y a présence de sites de liaison pour l'AT<sub>1</sub> dans les artères préglomérulaires, le glomérule et le tubule contourné proximal<sup>68</sup>. Les AT<sub>2</sub> sont situés dans la capsule rénale et dans la région subcapsulaire. Dans le rein adulte de rat, le récepteur AT<sub>1</sub> est prédominant, et seulement 5-10% d'AT<sub>2</sub> sont présents<sup>69</sup>. La présence d'AT<sub>2</sub> dans le mésenchyme néphrogénique et sa disparition tôt après la naissance, suggère que l'AT<sub>2</sub> joue un rôle majeur dans la formation du néphron<sup>70</sup>. L'AT<sub>1</sub> apparaît plus tard au cours du développement rénal et son expression augmente avec la maturation et le développement de la fonction rénale<sup>71</sup>. Dans les reins de rat nouveau-né, l'ARNm d'AT<sub>1</sub> apparaît dans les vaisseaux glomérulaires et le

cortex néphrogénique, endroits où la différenciation et la prolifération cellulaire surviennent simultanément <sup>51</sup>.

Les deux sous-types de récepteurs d'Angiotensin II sont également présents dans les artères utérines : les AT<sub>1</sub> sont prédominants dans la portion luminale du vaisseau et les AT<sub>2</sub> dans les muscles lisses vasculaires <sup>72</sup>.

La plupart des sites de liaison pour l'Angiotensin II au niveau du cerveau sont principalement de type AT<sub>1</sub>. Les AT<sub>2</sub> sont trouvés surtout dans le locus ceruleus et le cerebellum. Dans les régions associées au réflexe barorécepteur et au contrôle autonome, les récepteurs AT<sub>1</sub> sont prédominants. Ceci est aussi applicable aux régions contrôlant l'homéostasie des liquides et des électrolytes <sup>73</sup>.

### **1.3.5 Altérations du SRA lors de la grossesse**

Chez le rat, il a été démontré que l'activité rénine plasmatique est significativement élevée à tous les âges gestationnels (jour 6,12 et 20) comparativement au stade non gestationnel <sup>18</sup>. Ces résultats supportent une activation du SRA tout au long de la gestation, tout comme lors de la grossesse humaine <sup>14</sup>. Ainsi, cette hausse de rénine plasmatique semble être conséquente de l'augmentation des niveaux d'Angiotensin II plasmatique lors de la gestation, tel que rapporté par Magness et al <sup>74</sup>. Parallèlement, le niveau d'aldostérone chez la rate gestante, à partir de la mi-gestation, est plus élevé que la non-gestante <sup>75,76</sup>.



Durant la grossesse, des augmentations de l'activité du SRA et de la concentration d'aldostérone plasmatique sont observées <sup>77</sup>. Toutefois, il semble exister une dissociation entre la concentration plasmatique de la rénine et celle de l'aldostérone. En effet, lors de la grossesse humaine, l'augmentation de l'activité rénine plasmatique est observée durant le 1<sup>er</sup> trimestre, et atteint son niveau maximal durant le dernier trimestre de grossesse <sup>14</sup>, alors que les niveaux d'aldostérone plasmatique qui sont élevés de 2 à 3 fois tôt durant la grossesse atteignent un plateau en début de 3<sup>e</sup> trimestre <sup>14,78</sup>. Ainsi, la grossesse semble amener une régulation différentielle du SRAA.

La grossesse entraîne aussi une modification de réponse aux agents vasoconstricteurs. En effet, Massicotte et al <sup>19</sup> ont démontré qu'une baisse de sensibilité aux agents vasoconstricteurs durant la gestation chez la rate est présente *in vitro*. Ceci fut observé avec plusieurs agents vasoconstricteurs, incluant l'All, la vasopressine et la norépinéphrine, dans les vaisseaux sanguins portaux et mésentériques. Cette baisse de sensibilité à l'All fut également observée dans la vasculature utéro-placentaire de brebis gestantes <sup>79</sup>. Une autre étude suggère que la diminution de la résistance vasculaire périphérique durant la grossesse résulte d'une atténuation de réponse pressive aux 3 agents ou système presseurs : All, AVP et système nerveux sympathique dû à un effet de la hausse de PGs <sup>80</sup>. Cette baisse de réactivité vasculaire pourrait être responsable de la baisse de pression observée en fin de gestation. Toutefois, d'autres variables tels le changement

volumique et des altérations de la fonction endothéliale peuvent être combinés à l'activation du SRA lors de la grossesse pour participer à la régulation de la pression sanguine <sup>81</sup>.

Plusieurs études ont révélées des changements dans la proportion des récepteurs d'Ang II durant la grossesse. Alors que la gestation n'entraîne pas de changement dans le nombre ou l'affinité des récepteurs d'Ang II présents dans le lit vasculaire mésentérique <sup>82</sup>, les hépatocytes isolés <sup>83</sup>, et le cortex surrénalien de rat <sup>67</sup> et de lapine <sup>84</sup>, des changements dans le nombre, le ratio ( $AT_1/AT_2$ ) et l'affinité de ces récepteurs sont observés dans les reins, le myomètre et les artères utérines <sup>84-86</sup>. En effet, une diminution de leur nombre est observée dans les glomérules rénaux de lapine gestante <sup>84</sup>. Le myomètre, pour sa part, possède essentiellement des  $AT_2$  <sup>85</sup>. Au cours de la gestation, le nombre de récepteurs d'Ang II diminue et le ratio  $AT_1/AT_2$  change entraînant une prépondérance des  $AT_1$  dans le myomètre de brebis <sup>85</sup>. Les 2 types de récepteurs d'Ang II sont présents au niveau des artères utérines. Bird et al <sup>86</sup> observent une augmentation de la densité des  $AT_1$  dans l'endothélium des artères utérines de brebis gestantes, mais pas dans le muscle lisse de ces artères. Dans le placenta humain, des  $AT_1$  ont été caractérisés en fin de gestation <sup>87</sup>. Au niveau du placenta humain, les récepteurs d'Ang II exprimés sont principalement des  $AT_1$  et sont localisés dans les syncytiotrophoblastes, les cytotrophoblastes, l'endothélium fœtal vasculaire et les cellules d'Hofbauer. Ces résultats démontrent que la régulation des récepteurs d'Ang II pendant la grossesse varie de façon tissu spécifique.

## **1.4 Diète faible en sodium**

On sait qu'une quantité minimale de  $\text{Na}^+$  est requise par l'organisme pour maintenir l'homéostasie corporelle. L'administration d'un régime faible en sel est recommandé dans certaines pathologies telle l'hypertension. Dans cette section, nous verrons les altérations qu'engendre une diète faible en  $\text{Na}^+$  sur l'osmorégulation, et le SRA, et pour terminer, son impact lorsque prise durant la grossesse.

### **1.4.1 Altérations de l'osmorégulation**

Le  $\text{Na}^+$  plasmatique représente le principal déterminant de l'osmolalité<sup>22</sup>. Ainsi, l'ingestion d'une diète faible en sodium peut entraîner l'hyponatrémie, correspondant à un taux sanguin de  $\text{Na}^+$  inférieur à la normale. Ceci a donc pour effet de diminuer l'osmolalité plasmatique. La modification du contenu de  $\text{Na}^+$  dans le liquide extracellulaire cause habituellement un changement parallèle dans le volume du liquide extracellulaire. En effet, des rats ayant été soumis à une diète faible en sodium (0.03%) ont vu leur volume plasmatique diminué quoique non significativement différent de ceux recevant la diète normale en  $\text{Na}^+$  selon l'étude réalisée par Roy-Clavel et al<sup>6</sup>. La fonction rénale va également subir des modifications au niveau de son absorption et de son excrétion sodique. Pour maintenir l'équilibre, les tubules rénaux devront augmenter la réabsorption du  $\text{Na}^+$  et minimiser la sortie d'eau et de  $\text{Na}^+$  dans l'urine<sup>34</sup>. L'excrétion potassique est également diminuée avec une diète faible en sodium. Une stimulation de la soif et de la sécrétion d'AVP sont d'autres

phénomènes susceptibles d'être observés lors d'une diète pauvre en sel (figure 9).

#### **1.4.2 Régulation du SRA et des récepteurs de l'All**

Lors d'un changement dans la concentration de  $\text{Na}^+$ , il y a une relation directe entre la rénine, l'All et l'aldostérone. L'activité du SRAA est régulée par le taux de prise de sel, lequel détermine inversement le taux de sécrétion de rénine provenant du rein. La macula densa (cellules du tubule distal en contact avec l'artériole afférente) est capable de contrôler la composition du liquide présent dans le tubule distal. Lorsque la concentration de  $\text{Na}^+$  dans le liquide tubulaire est faible, la rénine est relâchée dans la circulation par l'appareil juxtaglomérulaire<sup>33,34</sup>. Cette enzyme ainsi relâchée va augmenter la formation d'AI et par la suite d'All. Cette augmentation d'All qui survient, lors d'une diète faible en  $\text{Na}^+$ , aide à préserver le TFG et maintenir une excrétion adéquate des déchets métaboliques qui dépendent du TFG pour leur excrétion. En plus, la constriction de l'artériole efférente induite par l'All entraîne une augmentation de la réabsorption d'eau et de  $\text{Na}^+$ , lesquels aident à restaurer le volume sanguin et la pression sanguine. De plus, cette activation du SRA avec la diète pauvre en sel va stimuler la sécrétion d'aldostérone, laquelle contribue à la réduction de l'excrétion urinaire de  $\text{Na}^+$  et par conséquent le maintien de la balance sodique<sup>34</sup>. Il a été démontré qu'une diète faible en sodium, donnée à des rates non-gestantes, entraîne une augmentation de l'aldostérone plasmatique, de l'All circulant, de la rénine ainsi que de l'ARNm du cytochrome P<sub>450</sub> aldostérone synthase, cette dernière étant responsable de la transformation de la corticostérone en aldostérone<sup>88</sup>.

Les niveaux de récepteurs d'All sont modifiés par un changement dans les électrolytes contenus dans une diète, et par des changements aigus dans le niveau d'All circulant. Il a été démontré que la densité des récepteurs d'All (études de liaison) de même que l'ARNm du récepteur AT<sub>1</sub> sont augmentés dans le cortex surrénalien de rat lors d'une restriction en sodium<sup>89</sup>. Lehoux et al<sup>88</sup> ont indiqué, chez le rat, que l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone induite par une diète faible en sodium implique une concomitante augmentation de l'ARNm du récepteur AT<sub>1</sub> et du P450<sub>c18</sub>, lesquels sont effectivement traduits en leur protéine respective. Dans la littérature, l'effet d'une telle diète sur l'expression des sous-types AT<sub>1</sub> au niveau rénal cause une certaine controverse. Jo et al.<sup>90</sup> trouvent qu'une diète faible en sodium entraîne une augmentation de l'expression des AT<sub>1</sub> dans les reins et l'hypothalamus, principalement AT<sub>1a</sub>, alors que d'autres démontrent une diminution de l'ARNm des AT<sub>1a</sub> dans les reins, le foie et les poumons<sup>91</sup>. Mêmes observations pour AT<sub>1b</sub> où, par hybridation *in situ*, une diminution de son expression a été observée dans le cortex et la médullaire rénale<sup>92</sup> alors qu'un autre groupe constate une augmentation des AT<sub>1b</sub> dans la surrénale<sup>91</sup>. Dans l'artère rénale afférente, l'expression de l'AT<sub>1a</sub> et l'AT<sub>1b</sub> serait diminuée de façon parallèle par une diète faible en sodium<sup>68</sup>. Selon le tissu étudié, la modulation des récepteurs d'All varie lorsque soumise à une diète pauvre en sodium. Le type de diète utilisée, la durée de la diète administrée à l'animal, la sensibilité de la technique expérimental de même que la portion du tissu étudié pourraient être des facteurs susceptibles d'influencer les modifications engendrées par la restriction sodique.

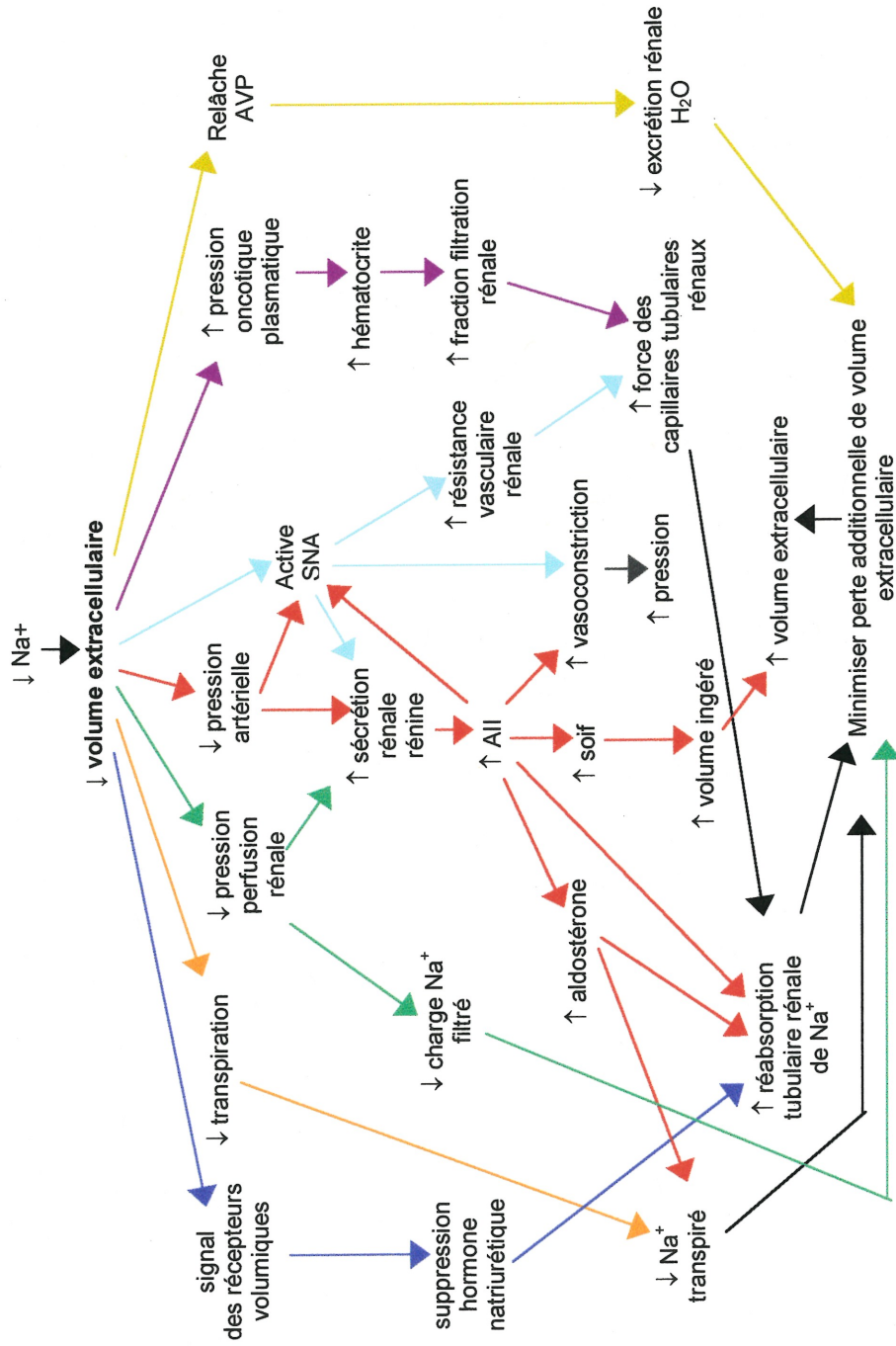
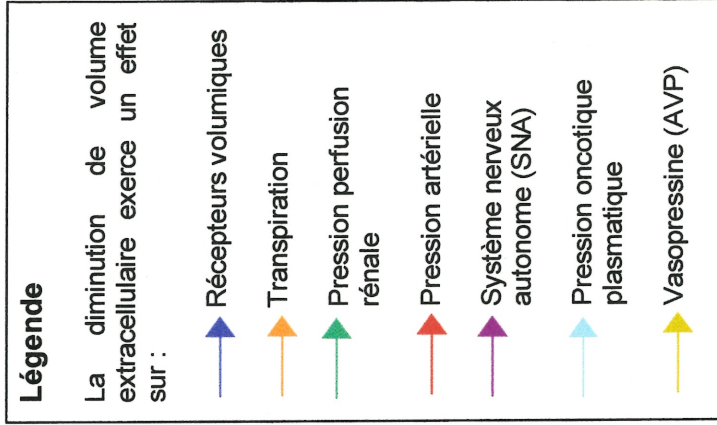


Figure 9 : Impact d'une diète faible en sodium sur l'osmorégulation.

### **1.4.3 Impact sur la grossesse**

Une méthode noninvasive d'influencer le SRAA est de modifier l'apport en sodium <sup>93</sup>. Lorsqu'une diète faible en sodium est administrée lors de la gestation, l'expansion de volume plasmatique de même que l'hémodilution qui accompagnent normalement une grossesse ne peuvent être atteintes. Le volume circulant est diminué <sup>6</sup> et des mécanismes, tel le SRAA, sont activés résultant en une rétention d'eau massive <sup>5</sup>. La contraction volumique est associée à une aggravation marquée de l'hyponatrémie physiologique observée lors de la grossesse, tandis qu'une restriction sodique similaire n'a que très peu d'effet sur le sodium plasmatique de rate non-gestante <sup>5,6</sup>. Cette diminution accrue de sodium affecte l'osmolalité plasmatique qui est également diminuée. Lorsque la diète en sodium est sévèrement restreinte lors de la gestation, les besoins du fœtus sont difficilement atteints, et il semble y avoir une réduction du nombre de fœtus <sup>94</sup> par portée chez la rate de même qu'un poids plus faible à la naissance <sup>6,94</sup>.

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

La restriction de croissance intra-utérine (RCIU) est une pathologie de la grossesse qui est définie par un poids du nouveau-né inférieur à 2,500 g ou lorsque ce dernier se retrouve en dessous du 10<sup>e</sup> percentile pour l'âge gestationnel <sup>95</sup>. Dans la population, l'incidence de la RCIU est d'environ 10% <sup>96</sup>. La RCIU est une pathologie multifactorielle dans laquelle les facteurs

maternels et foeto-placentaires doivent être considérés <sup>97,98</sup>. La malnutrition, les grossesses multiples, la prise d'alcool et/ou de drogues, les infections et malformations congénitales de même que les déficiences placentaires constituent l'étiologie de la RCIU <sup>96,99</sup>. En effet, une insuffisance vasculaire venant d'une placentation anormale, une diminution du flot sanguin ombilical, une hypovascularité, une diminution du développement des villosités placentaires peuvent affecter le fœtus, et ainsi amener une RCIU <sup>97,98</sup>. Il est reconnu que les nouveaux-nés prématurés, ayant souffert de RCIU, sont plus à risque de morbidité et de mortalité périnatale que leurs congénères connaissant une croissance normale <sup>100</sup>. Malgré les nombreuses causes connues, plusieurs cas de RCIU demeurent idiopathiques où une diminution du volume circulant est souvent observée <sup>101,102</sup>.

### **1.5.1 Modèle animal de RCIU**

Dans notre laboratoire, nous avons développé un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine en donnant à des rates gestantes une diète faible en sodium (0.03%). Lorsque cette diète est combinée à la gestation, une activation accrue du SRAA est notée comparativement à l'activation normalement observée lors d'une gestation. Malgré cette activation accrue du SRAA, une diminution du volume circulant est observée chez les rates gestantes recevant la diète faible en sodium. De plus, le poids des fœtus et des placenta est plus petits à la naissance <sup>6</sup>. Ces rates



gestantes avec une diète faible en sodium représente un modèle simple pour étudier la relation entre les composés du SRAA et la croissance fœtale.

Il est important de spécifier que, chez le rat, l'organogenèse se produit au cours des deux premières semaines de gestation, alors que la dernière semaine est une période de croissance fœtale. C'est pour cette raison que les rates gestantes sont soumises à la diète faible en sodium au cours des 7 derniers jours de gestation (sur un total de 23 jours). Il faut également mentionner que ce modèle de RCIU n'entraîne aucune mort ni malformation in utero.

### **1.6 Hypothèses de travail**

Nous avons voulu mieux caractériser notre modèle de RCIU au niveau de la physiologie rénale et de la modulation des récepteurs d'Ang II. Dans la première partie de mon travail, l'hypothèse est que suite à une diète faible en sodium, la rate gestante tente d'atteindre un équilibre hydrique et sodique entraînant une diminution du volume circulant et affectant la croissance fœtale. Ainsi, nous avons étudié les effets de cette diète pauvre en sodium sur l'équilibre hydrique et électrolytique dans l'organisme maternel en utilisant des rates non-gestantes et gestantes recevant ou non une diète faible en sodium.

Dans la seconde partie, l'étude du SRA et des récepteurs d'Angiotensin II (Ang II) s'avérait d'un intérêt majeur dans ce modèle de RCIU. On sait que le SRA est fortement activé dans ce modèle <sup>6</sup>, et que l'origine de la RCIU semble provenir des effets de la diète pauvre en sel sur le volume circulant et sur le débit utéro-placentaire. Cependant, avec l'activation supplémentaire du SRA suite à cette diète, qu'arrive-t-il des effets de l'Ang II sur ses propres récepteurs ? Mon hypothèse est que l'interaction entre la gestation et la diète faible en sodium (toutes deux activant le SRAA) modifie l'efficacité de l'Ang II à produire une réponse biologique. Nous pensons qu'une modulation différente des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> survienne dans des tissus cibles tels la zone glomérulée du cortex surrénalien (sécrétion d'aldostérone), le rein (équilibre hydrique et ionique), le placenta (échange foeto-maternel), les vaisseaux utérins (circulation utéro-placentaire) et l'axe hypothalamo-hypophysaire (centre de la soif / sécrétion d'AVP). Pour tenter de répondre à ces interrogations, nous avons mesuré la quantité et l'expression de ces récepteurs d'Ang II chez 4 groupes de rates, soit non-gestante et gestante recevant une diète normale ou faible en sodium.

**ALTERATION OF MATERNAL BODY FLUID VOLUME AND  
COMPOSITION IN A MODEL OF INTRAUTERINE GROWTH  
RESTRICTION INDUCED BY A LOW-SODIUM DIET.**

**ALTERATION OF MATERNAL BODY FLUIDS VOLUME AND COMPOSITION IN A MODEL OF  
INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION INDUCED BY LOW-SODIUM DIET.**


Lorsqu'une diète faible en sodium est donnée à des rates gestantes durant la dernière semaine de gestation, une restriction de croissance fœtale est induite. Nous avons étudié l'effet de cette diète sur l'homéostasie hydrique et ionique maternelle. Des rates Sprague-Dawley (non-gestante et gestante) ont été assignées au hasard à un groupe contrôle ou à un groupe recevant une diète faible en sodium pour 7 jours, correspondant à la dernière semaine de gestation. Plusieurs paramètres physiologiques, reliés à l'homéostasie volumique, ont été mesurés. Au jour 22, les électrolytes au niveau sanguin et urinaire de même que l'activité hormonale furent mesurés. Chez les rates non-gestantes, la diète faible en sodium active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et l'excrétion urinaire de sodium est diminuée. Ceci permet de limiter les variations de volume, et la concentration de sodium plasmatique est ainsi maintenue. Cependant, chez les rates gestantes, cette diète induit une activation supplémentaire du SRAA. Malgré tout, les niveaux de sodium plasmatique sont diminués par la rétention d'eau et plusieurs signes d'une sévère contraction volumique restent évidents. La clairance rénale de la créatinine et de l'urée sont diminuées par la diète faible en sodium. Nous suggérons que les rates gestantes sont plus sensibles à la restriction de sodium que les rates non-gestantes, et que la réponse physiologique pour compenser la contraction volumique est amplifiée durant la gestation, mais incapable de prévenir la restriction de croissance intra-utérine.

**ALTERATION OF MATERNAL BODY FLUIDS VOLUME AND COMPOSITION IN A MODEL OF  
INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION INDUCED BY A LOW-SODIUM DIET.**

Sophie Bédard, MSc, Jean St-Louis, PhD, and Michèle Brochu, PhD.

Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine,  
Department of Obstetrics-Gynecology and Faculty of medicine,  
Université de Montréal, Québec, Canada.

Address all correspondence and request for reprints to :

Michèle Brochu, PhD  
Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montréal, Québec, Canada  
H3T 1C5  
E-mail address : 

## CONDENSATION

A low-sodium diet given during gestation induced changes in body fluids volume and composition associated with a functional renal insufficiency in maternal organism, a feature more severe than that observed in nonpregnant rats.

**KEY WORDS :** Low-sodium diet; gestation; rat; osmoregulation; renin-angiotensin-aldosterone system; IUGR.

**ABSTRACT**

Low-sodium diet given to pregnant rats during the last week of gestation induced intrauterine growth restriction (IUGR). We studied the effect of this diet on maternal water and ions homeostasis. Female Sprague-Dawley rats (nonpregnant and pregnant) were randomly assigned to a control group or to a group fed low-sodium diet for 7 days, corresponding to the last week of gestation. Several physiological parameters related to volume homeostasis were measured. On day 22, plasma and urine electrolytes as well as hormonal activity were measured. In nonpregnant rats, the low-sodium diet increased renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and decreased urinary sodium excretion. This permits to limit the volume changes and a normal plasma sodium concentration was maintained. In pregnant rats, however, this diet induced a suractivation of RAAS. Nevertheless, the plasma sodium levels were decreased by water retention and several signs of severe extracellular fluid contraction remained evident. The renal clearance of creatinine and urea was diminished by low-sodium diet in pregnant rats. We suggest that pregnant rats are more sensitive to sodium depletion than nonpregnant rats, and that the physiological compensatory response to volume contraction is amplified during pregnancy, but still unable to prevent IUGR.



## INTRODUCTION

Maternal hemodynamic adaptations and marked physiological changes take place throughout pregnancy to ensure the normal evolution of both mother and fetus. Among the cardiovascular alterations, extracellular volume is increased by 50% in near-term gravid rodents <sup>1</sup>. Cardiac output, stroke volume and heart rate are also elevated during gestation <sup>2</sup>. Despite the expansion of plasma volume, the blood pressure slightly decreases <sup>3</sup>. A reduction in peripheral vascular resistance occurs during the final gestational week of the rat <sup>3</sup>. A modest increase in red blood cells volume is also observed in parallel to the increase of maternal weight. The resulting volume expansion, occurring during gestation, leads to a physiological hemodilution characterized by a lower hematocrit <sup>4</sup>.

Alterations in renal function and sodium homeostasis, in part attributable to volume expansion, are other metabolic changes induced by gestation. Amongst the aspects of renal physiology affected in rodent gestation, glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow (RPF) are known to increase compared to nonpregnant level <sup>5</sup>. This leads to an increased filtered load of water, ions and small solutes in the kidney. Thus, the reabsorption occurring in renal tubules must also be increased to maintain the volume expansion observed in the maternal organism <sup>6</sup>. It is well known that gestation is associated with a marked cumulative sodium retention, which occurred principally during the last week of gestation <sup>1</sup>. This salt-conservation is shared

by both dam and fetuses to respond to the need of growing fetuses, and to achieve the expansion of extracellular volume of maternal compartment required for optimal uteroplacental exchanges. Those changes in volume and sodium balance involve a physiological alteration of the osmoregulation in pregnant rats. In fact, the plasma osmolality is reduced and a resetting of the threshold for vasopressin (AVP) secretion is observed <sup>7</sup>.

Several factors contribute to sodium accumulation during gestation, such as pregnancy-related hormones like estrogen, aldosterone with its antinatriuretic property, and the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) <sup>1</sup> and AVP system. In our group, a suractivation of the RAAS was observed by reduction of the sodium intake in pregnant rats. Simultaneously, a low-sodium diet given to pregnant rats in the last week of gestation induced an intrauterine growth restriction (IUGR) <sup>8</sup>. In our model of IUGR, the plasma volume remained decreased despite an increase of the RAAS and presumably AVP system. The aim of the present investigation was to study the overall response of pregnant and nonpregnant rats to a sodium restricted diet. The water and electrolytic balance was followed in both groups. We observed that pregnant rats receiving low-sodium diet are not able to restore normal sodium homeostasis, leading to a reduction of the plasma volume affecting the fetal growth <sup>8</sup>. Thus, both the mother and the fetuses are acutely susceptible to adverse effects of volume contraction.

## MATERIAL AND METHODS

**ANIMALS.** Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada) weighing between 225 and 250 g were mated with male rats of the same age. The morning on which spermatozoa were found in vaginal smears was deemed to be day 1 of gestation. Nonpregnant rats were picked randomly through the estrous cycle and paired to a pregnant rat. All animals were housed under controlled light (6h00-18h00) and temperature ( $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Pregnant and nonpregnant rats were randomly assigned to two groups, one control and one receiving sodium restricted diet from days 15 through 22 (corresponding to the last week of gestation). The normal diet given to control groups contained 0.2% sodium (basal diet 5755; PMI Feed Inc, Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and is combined with tap water as drinking fluid. The experimental groups received a diet containing 0.03% sodium (low sodium diet 5881; PMI Feed) with demineralized water. At the end of the treatment period, on day 22 (day 23 corresponding to term-gestation), the rats of each group were killed by decapitation (9h00-9h30) and blood collected for hormonal and electrolytes analysis. This study received approval from the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

The number of animals varied according to the variable studied because of requirements of the technique used, and the amount of plasma or urine available.

**PHYSIOLOGICAL MEASUREMENTS.** On a period of 24 hours, the water intake and the urine output were measured for the last three days of the dietetic manipulation. For this kind of recording, the animals were housed in metabolic cage. Body weight was recorded on day 22. Weight of fetoplacental unit was also noted after the sacrifice of the animal.

**PLASMA AND URINE ANALYSIS.** To determine hematocrit, a blood sample was centrifuged, and the percentage of erythrocytes in blood volume was noted. At sacrifice, each blood sample was drawn into plain vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes at 4°C. Then, an aliquot of plasma was analysed to determine the concentration of the following substances : sodium and potassium using specific electrodes, urea by electrode of conductivity, creatinine by an enzymatic colorimetric test and osmolality with a vapor osmometer. The potassium measurement was performed on an aliquot of plasma which was centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes at room temperature. This was done to maintain functional the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  pump. Indeed, the activity of this pump, which is present in rat erythrocytes, is decreased at 4°C which leads to an overestimation of the plasma potassium level <sup>9</sup>. Sodium, potassium, urea, creatinine and osmolality were also measured in urine sample collected between day 21-22.

The plasma renin activity (PRA) was determined indirectly as described by Gutkowska and al. <sup>10</sup>. In brief, angiotensin I generated during a period of 2

hours was quantitated by radioimmunoassay. The antibody used was purchased from Peninsula, Inc (Belmont, Calif). The plasma aldosterone was extracted from serum by a solid-phase procedure with C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges (Millipore; Waters, Montréal, Québec, Canada) and then quantitated by radioimmunoassay technique, as described elsewhere <sup>11</sup>. To assess possible stress related to animal manipulation, corticosterone was also measured directly in plasma by a commercial radioimmunoassay kit (Medicorp, Montreal, Quebec, Canada). For the fetal corticosterone measurement, the blood of one litter was pooled.

**STATISTICAL ANALYSIS.** The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. The number in parenthesis corresponding to the number of animal used. Those results were compared by 2-factor analysis of variance. If interaction was present between gestation and diet, the Student *t* test was then performed group by group. Otherwise, a post hoc Newman-Keuls test was used. A probability of at least  $p < 0.05$  was considered to represent a significant difference.

## RESULTS

As shown in figure 1A, a low-sodium diet induced a decrease of body weight in the two groups of rats, nonpregnant and pregnant. As expected, we observed that pregnant rats had a higher body weight than nonpregnant rats. With low-sodium diet, we also noted a decrease in fetoplacental unit weight (figure 1B). Nevertheless, the number of fetuses in each litter of pregnant rats was equal in both groups ( $14.5 \pm 0.6$  pups vs  $15.0 \pm 0.6$  pups, normal vs low-sodium diet).

A particular observation was noted during this study (data not shown). We observed that low-sodium diet combined with gestation induced prematurity delivery compared to normal gestation. Indeed, no pregnant rats on normal diet (n=28) had preterm labor compared to seven low-sodium pregnant rats (n=28) who delivery their pups on the morning of day 22 instead of day 23 (term-gestation).

A low-sodium diet increased PRA in nonpregnant rats (table I), but it was not reaching statistical difference. Plasma aldosterone levels were also increased. Gestation induced an increase in PRA and aldosterone. When the gestation was combined with sodium restricted diet, hormonal activity (PRA and aldosterone) went through a marked increase compared to normal diet. The plasma corticosterone levels were not affected, neither by the diet or the gestation. However, the fetal corticosterone levels were higher in fetuses from

pregnant rats receiving the low-sodium diet compared to normal diet ( $1.07 \pm 0.07$  nmol/mL vs  $0.82 \pm 0.07$  nmol/mL, respectively;  $p < 0.05$ ) (data not shown).

In nonpregnant rats, a low-sodium diet increased the hematocrit while the plasma osmolality and the solutes concentrations were not significantly changed (table II). During normal gestation, a reduction in plasma osmolality, sodium and urea levels, as well as hematocrit were observed compare to nonpregnant. This was accompanied by an increase in creatinine concentration, presumably related to the increment of muscle mass (mother and fetus). In pregnant rats under sodium deprivation diet, the change in plasma sodium was of larger amplitude compare to normal pregnant rats. In addition, urea and creatinine levels as well as hematocrit were increased, indicating that the diet induced more severe contraction of extracellular fluid volume than in nonpregnant rats.

For the last three days of treatment (corresponding to the end of gestation), we measured the water intake and the urine output. Figure 2A illustrates that the water ingested by nonpregnant rats fed with low-sodium diet was significantly lower only on the last day of treatment compared to normal diet. Normal gestation was associated to a higher water intake compared to nonpregnant rats. When low-sodium diet was given to pregnant rats, we observed a decreased water intake on day 21 compared to that of rats left on normal diet. There was no difference in urine volume between the two groups of nonpregnant rats (figure 2B). Pregnant rats had higher urine output than

nonpregnant rats. However, when pregnant rats received a low-sodium diet, their urine output was decreased on day 21 of gestation. As expected, the urine output followed the water intake.

In table III, the impact of diet and gestation on urinary parameters were recorded for the last day of treatment. In the urine of nonpregnant rats, the sodium excretion was drastically reduced by the low-sodium diet. On day 22 of gestation, an increase of urinary volume, decreased urine osmolality and decreased excretion of sodium, potassium and urea were observed. The urinary content of creatinine was not affected by gestation. However, when gestation was combined to low-sodium diet, a decreased urinary volume, an increased urine osmolality and a decreased sodium and creatinine excretion were observed compared to pregnant rats fed a normal diet.

As shown in figure 3A, creatinine clearance was not affected by low-sodium diet in nonpregnant rats. Gestation produced a decreased clearance of creatinine. Low-sodium diet reduced statistically the clearance of creatinine in the pregnant group. The clearance of urea was not affected in the nonpregnant rats by low-sodium diet (figure 3B). Gestation did not affect urea clearance in rats on normal diet. However, a combination of sodium restricted diet and gestation caused a dramatic reduction of the urea clearance. A greater reduction of urea clearance was observed compare to that of creatinine in pregnant rats on low-sodium diet.



## COMMENTS

We have already shown that a low-sodium diet given during the third week of gestation, in rat, induced IUGR<sup>8</sup>. Even if this diet activates the RAAS, plasma volume reduced and remained below that occurring during normal gestation. This affected fetal growth. Pups from pregnant rats fed low-sodium diet had smaller length and weight<sup>8</sup>. Comparable alterations in plasma volume were observed in women with idiopathic IUGR<sup>12,13</sup>. The present study was performed to characterize this model of interest for the study of maternal homeostasis.

It is well known that normal gestation leads to an increase in body weight<sup>3</sup>, as we observed. An increase in food consumption during gestation, in response to the need of mother and fetuses, is probably involved in weight gain<sup>14</sup>. Moreover, the creation of a new compartment, due to the presence of fetuses, leads to an extracellular volume adaptation and several physiological changes. An extracellular fluid volume expansion is simultaneously achieved by sodium and fluid retention in the maternal organism<sup>15</sup>, especially at the third week of gestation<sup>1</sup>. However, a low-sodium diet given to nonpregnant and pregnant rats induced a decreased body weight, as reported by others<sup>14</sup>. This diminution of body weight was related to volume contraction in those rats. In fact, a plasma volume contraction was reported in pregnant rats fed low-sodium diet<sup>8</sup>.

The weight of fetoplacental unit was also reduced in animals on a sodium restricted diet. Indeed, a decrease of fetal dry weight was observed when low-sodium diet was given to pregnant rats<sup>8</sup>. Given that the number of pups per litter was not affected by low-sodium diet, other factors must be involved in this reduction of fetoplacental weight. Preliminary results, in our laboratory, also showed that low-sodium diet given during gestation reduced the diameter of uterine vascular vessels. This probably leads to a reduction in the uteroplacental flow reaching the fetus, and thus resulting in fetal growth.

We also observed that low-sodium diet combined with gestation induced prematurity delivery compared to normal gestation. Instead of delivery on day 23 (term-gestation), 25% of the litters from low-sodium pregnant rats were born on the morning of day 22. This premature labor could be triggered by fetoplacental unit signals to escape from an adverse intrauterine environment. Challis et al.<sup>16</sup> proposed that the timing of parturition is controlled by fetus, probably via the fetal hypothalamo-hypophysal-adrenal axis. It was shown in sheep that fetal cortisol, by its influence on placental steroidogenesis, changes the oestrogen:progesterone ratio and triggers the release of prostaglandins which initiate parturition by changing the pattern of myometrial activity from contractures to contractions<sup>16</sup>. In our model, fetuses with IUGR had higher plasma corticosterone levels compared to those from normal gestation which can lead, as in sheep, to the trigger of preterm labor. Maternal stress, induced by housing system, could also be involved in our observation of prematurity although only 25% of the

gestation lead to preterm labor. Some studies also reported the association between maternal and fetal stress with the preterm delivery<sup>17</sup>. Stress factors for the mother, such as metabolic cage and a low-sodium diet, could lead to an activation of the adrenal cortex. However, corticosterone levels were unchanged in our study. Also, we observed premature labor in pregnant rats placed on low-sodium diet, which were not in metabolic cage. Further investigations are needed to understand the mechanisms of rodent prematurity as well as the endocrine and paracrine factors involved in delivery.

Gestation is accompanied by hemodynamic changes, such as an activation of RAAS. The increase of plasma renin activity and plasma aldosterone, that we observed in pregnant rats, paralleled the results obtained in women pregnancy by Wilson and al.<sup>18</sup>. This elevation of plasma aldosterone seemed to coincide with the onset of maternal water retention which is necessary for the fetuses and the maternal stores<sup>19</sup>. Angiotensin II (All) and aldosterone are associated to salt retention during gestation, which lead to the physiological plasma volume expansion of pregnancy<sup>1</sup>. A low-sodium diet is known to activate the RAAS. In our model of IUGR, the RAAS was suractivated: PRA and secretion of aldosterone was observed as indicated by blood levels of these hormones. We can presume that the plasma All levels were also elevated. However, despite this strong activation of RAAS, plasma volume contraction was maintained in pregnant rats restricted in sodium<sup>8</sup>. Duvekot and al.<sup>13</sup> suggested that maternal

compensation mechanisms were unable to trigger a proper compensatory volume response in the abnormal pregnancies.

Regulation of fluid volumes differs during gestation in rat <sup>1</sup>. In normal pregnant rats, the fluid homeostasis was conserved until the end of gestation. As observed here, Atherton and al. <sup>20</sup> reported that pregnant rats drank more water than nonpregnant by 37% in the last week of gestation, and that their urine output was also increased. In both rats and humans, the osmotic threshold for thirst is lower during pregnancy, stimulating water intake and contributing to the dilution of body fluids <sup>7</sup>. This leads to an extracellular fluid expansion. However, when a low-sodium diet is given to pregnant rats, we observed a severe reduction of water intake and output at the end of gestation. We suggest that the susceptibilities to preterm labor could influence some physiological mechanisms which could decreased the urgency for drinking, or a different balance is present between mechanisms controlling thirst, osmolality, hormones and extracellular fluid volume.

Alteration in osmoregulation is another physiological change induced by gestation. The kidney must achieve this new balance imposed by gestation. It is well known that sodium is the major osmotically active cation in extracellular water. During gestation, this ion is decreased in plasma resulting from an intensive water retention. Indeed, following sodium retention, the maternal extracellular fluid volume normally expanded. An adaptation of sodium handling occurs in renal tubules under the influence of several

hormones, such as  $\text{Ang II}$ , estrogens and mainly aldosterone <sup>1</sup>. This hyponatremia, associated to gestation, lead to a resetting of plasma osmolality ( $P_{\text{osm}}$ ) to a lower level by almost 10 mosmol/kg of water <sup>7</sup>. Simultaneous decrement in thirst threshold and vasopressin increment are noted during gestation. The new steady-state tonicity is maintained within a narrow range during gestation <sup>7</sup>.

The plasma volume expansion, observed during pregnancy, is associated with a rise in glomerular filtration rate <sup>5</sup>. However, term gestation is often related to a decline in GFR reflected by a decrease in creatinine clearance preceding delivery <sup>21</sup>. The elevated GFR leads to an important filtered load in the kidney; filtered and reabsorbed sodium were shown to be higher in pregnant animals <sup>22</sup>. To achieve this large reabsorption of sodium during gestation, an increase of the reabsorption was observed in both proximal tubule and distal nephron segments <sup>6,23</sup>. The hypokaliemia normally observed in pregnant rats (not reaching significance in our study, but already shown by Roy-Clavel et al. <sup>8</sup>) could be explained by an increase of potassium excretion related to increased sodium delivery. This hypokaliemia could also be related to high plasma aldosterone levels which induced reabsorption of sodium, and consequently favor excretion of potassium. The extracellular fluid expansion and the lower  $P_{\text{osm}}$  could explain the modest decrease in circulating urea levels. The lower hematocrit is known to describe the physiological hemodilution arising during gestation <sup>4</sup>. Minimal sodium excretion <sup>20</sup> and dilution of urine, expressed by a lower urine osmolality

( $U_{osm}$ ), occurred in pregnant rats to maintain homeostasis. These renal observations in pregnant rats are compatible with those observed in humans, thus supporting the use of rodent as a model to study homeostasis during pregnancy.

In our model of IUGR, the osmoregulation was perturbed by the low-sodium diet. The volume expansion observed in normal gestation was not achieved<sup>8</sup>, which failed to reach the hemodilution accompanying normal rodent gestation. The circulating volume is decreased, and compensatory mechanisms like RAAS and AVP system are activated to retain water and sodium. Despite an increase of aldosterone production, a modest hyperkalemia (even if its not significant in our study) is observed in those rats. Our data are a trend to confirm results already obtained by other groups<sup>24,25</sup>. We propose that hyperkalemia results from an acute reduction of distal sodium delivery. In fact, this minimal reabsorption of sodium in distal tubule lead to a reduction in potassium secretion generating an accumulation of potassium in plasma. Schneider and al.<sup>24</sup> suggested that this increase in plasma potassium levels contributes to the stimulation of aldosterone production observed during gestation. In parallel, the volume and sodium excretion were reduced when low-sodium diet is administered to pregnant rats. All together, these mechanisms try to maintain homeostasis. Moreover, the IUGR model should increase their reabsorption of sodium compared to nonpregnant rats with low-sodium diet. Indeed, in addition to maintain homeostasis, those pregnant rats must increase their plasma volume to

ensure a normal fetal growth. However, sodium excretion was not different between nonpregnant and pregnant rats with low-sodium diet. This suggests that plasma contraction, observed in IUGR model, should be secondary to a lack of sodium reabsorption due to the fact that kidney should have reached his maximal capacity of sodium reabsorption.

Uremia was also observed in the IUGR model in parallel with a decreased urea clearance. This accumulation of plasma urea could result from a massive water and urea retention, and a low urinary flow which attempt to counterbalance the plasma volume contraction. In our model of IUGR, we thus suggest that the plasma AVP levels (not measured) must be elevated to retain water, and to maintain the urea inner medullary gradient concentration to allow the water reabsorption. High levels of plasma creatinine and low creatinine clearance were also noticed in pregnant rats fed low-sodium diet. This supports a diminution of the GFR induced by the plasma volume contraction. Taken together, the physiological alterations observed in our model of IUGR support a diagnosis of a pre-renal (or functional) renal insufficiency. Indeed, clinical assessment of functional renal insufficiency in humans is characterized by values of urea/creatinine plasma ratio  $> 100$ ,  $U_{osm} > 500$  mosmol/kg of water and urinary sodium  $< 20$  mmol/L<sup>26</sup>. These urinary and plasma values are observed in our model of IUGR.

In summary, we suggest that pregnant rats are more sensitive than nonpregnant rats to dietary sodium depletion. A readjustment of maternal

renal function should occur to compensate for the decreased dietary sodium intake. However, the physiological compensatory response to volume contraction are still unable to prevent IUGR.



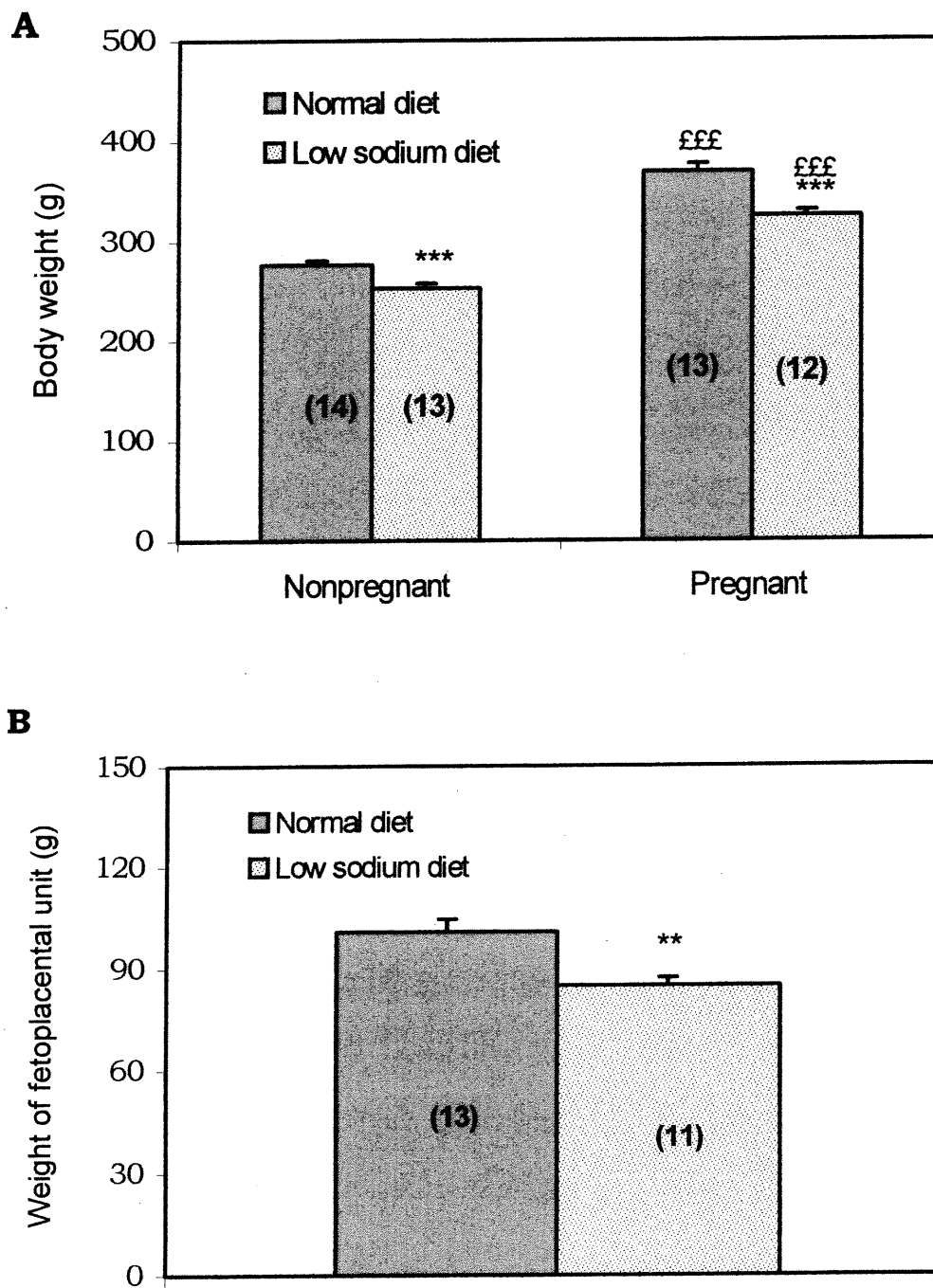
## LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Impact of a low-sodium diet and gestation on the body weight of the rat (panel A) and on the fetoplacental unit (panel B). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus normal diet (same group); £££  $p < 0.001$  versus nonpregnant rats (same diet). Number in parenthesis represents the number of rats.

Figure 2. Impact of a low-sodium diet and gestation on hydrous homeostasis : water intake (panel A) and urine output (panel B). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus normal diet (same group); ££  $p < 0.01$ , £££  $p < 0.001$  versus nonpregnant rats (same diet). Number in parenthesis represents the number of rats.

Figure 3. Impact of a low-sodium diet and gestation on clearance of creatinine (panel A) and urea (panel B). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus normal diet (same group); £  $p < 0.05$ , £££  $p < 0.001$  versus nonpregnant rats (same diet). Number in parenthesis represents the number of rats.

FIGURE 1



**Table I.** Effect of a low-sodium diet and gestation on plasma renin activity, plasma aldosterone and corticosterone levels.

	Nonpregnant rats		Pregnant rats	
	Normal diet	Low-sodium diet	Normal diet	Low-sodium diet
Plasma renin activity (pmol angiotensin I mL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	2.33 ± 0.40 (12)	3.78 ± 1.54 (12)	6.31 ± 1.04 <sup>££</sup> (12)	14.49 ± 4.22 <sup>* £</sup> (8)
Aldosterone (pmol/mL)	2.0 ± 0.2 (13)	4.9 ± 0.7 <sup>***</sup> (12)	6.7 ± 0.9 <sup>£££</sup> (12)	22.6 ± 1.5 <sup>*** £££</sup> (10)
Corticosterone (nmol/mL)	1.2 ± 0.2 (14)	1.3 ± 0.1 (13)	1.1 ± 0.1 (13)	1.1 ± 0.1 (11)

Results are expressed as mean ± SEM. Number in parenthesis represents the number of rats.

\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 versus normal diet (same group).

£ p < 0.05, ££ p < 0.01, £££ p < 0.001 versus nonpregnant rats (same diet).

**Table II.** Impact of a low-sodium diet and gestation on plasma osmolality and solutes concentrations and on hematocrit.

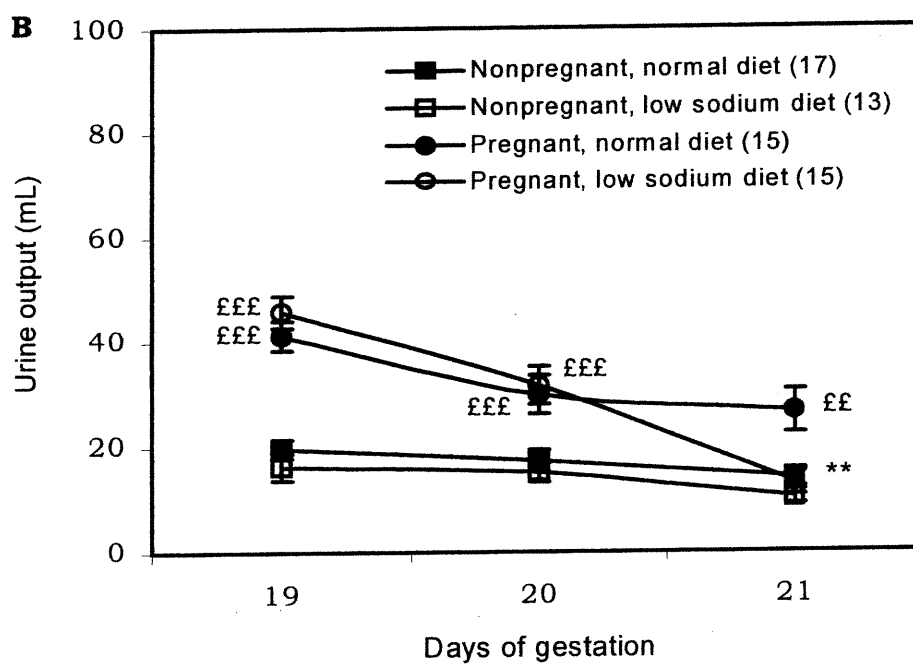
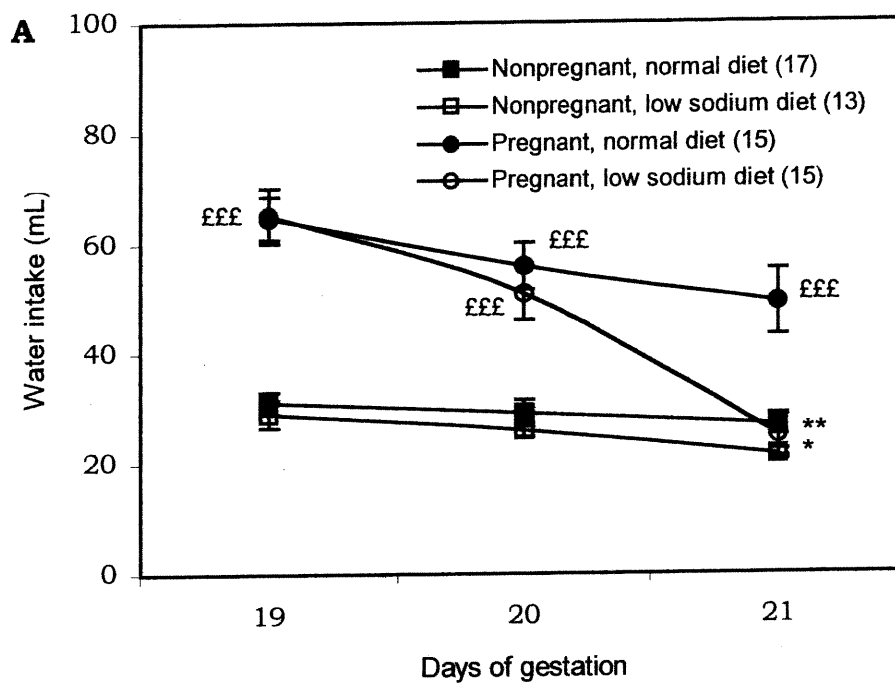
	Nonpregnant rats		Pregnant rats	
	Normal diet	Low-sodium diet	Normal diet	Low-sodium diet
<i>Osmolality</i> (mosmol/kg H <sub>2</sub> O)	295 ± 2 (13)	292 ± 3 (13)	279 ± 3 <sup>£££</sup> (14)	259 ± 5 <sup>***£££</sup> (12)
<i>Sodium</i> (mmol/L)	139 ± 1 (13)	140 ± 1 (12)	132 ± 1 <sup>£££</sup> (11)	118 ± 2 <sup>***£££</sup> (12)
<i>Potassium</i> (mmol/L)	6.4 ± 0.2 (10)	6.2 ± 0.2 (11)	5.7 ± 0.7 (8)	6.6 ± 0.8 (9)
<i>Urea</i> (mmol/L)	5.1 ± 0.2 (13)	4.9 ± 0.2 (12)	4.0 ± 0.5 <sup>£</sup> (14)	9.2 ± 0.6 <sup>***£££</sup> (11)
<i>Creatinine</i> (umol/L)	35 ± 1 (14)	37 ± 2 (12)	46 ± 3 <sup>£</sup> (13)	55 ± 2 <sup>*£</sup> (11)
<i>Hematocrit</i> (%)	42 ± 1 (14)	46 ± 1 <sup>*</sup> (11)	33 ± 1 <sup>£</sup> (13)	39 ± 1 <sup>*£</sup> (12)

Results are expressed as mean ± SEM. Number in parenthesis represents the number of rats.

\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 versus normal diet (same group).

£ p < 0.05, £££ p < 0.001 versus nonpregnant rats (same diet).

FIGURE 2



**Table III.** Impact of a low-sodium diet and gestation on urinary volume, osmolality and solutes on the last day of treatment.

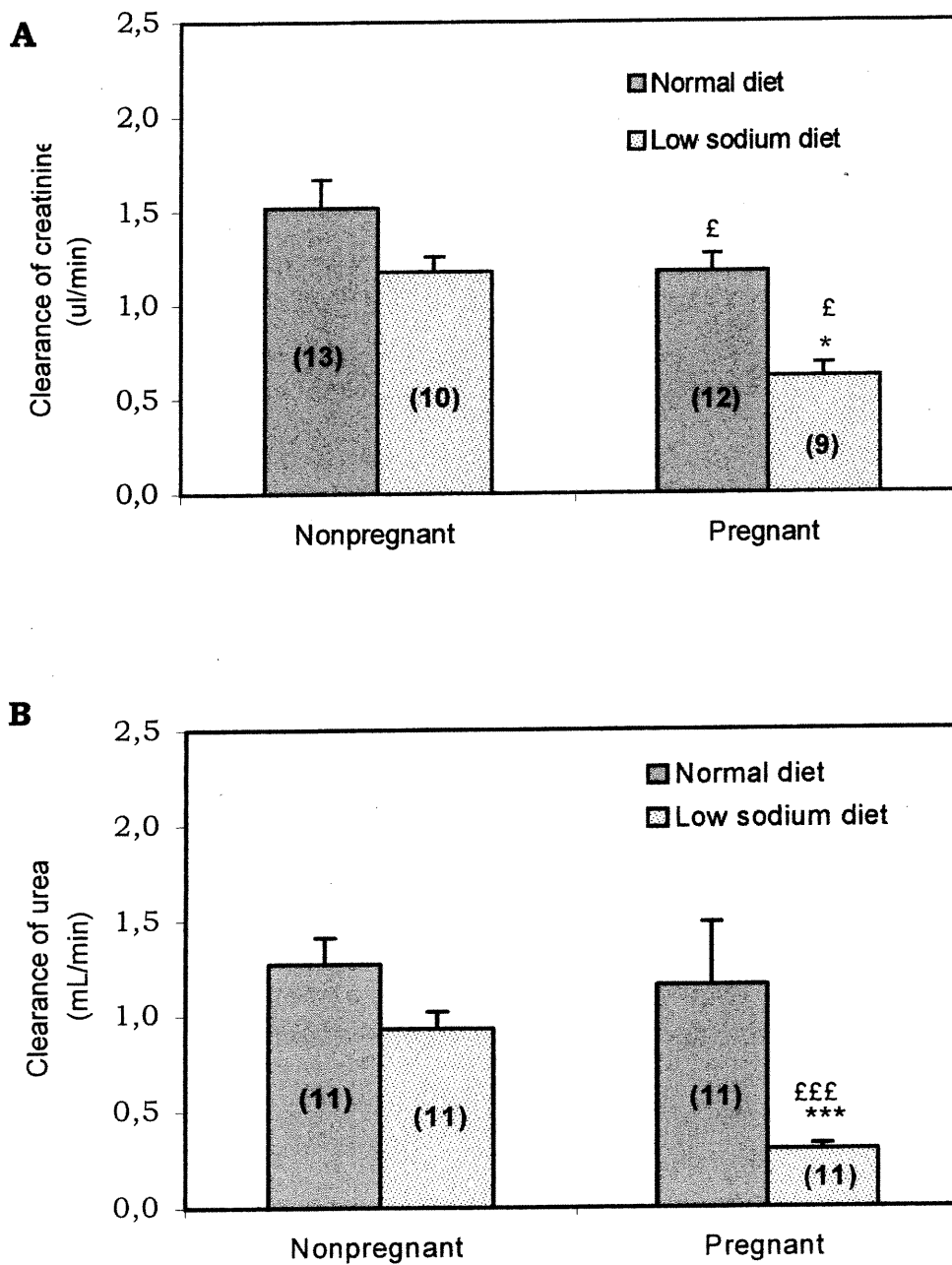
	Nonpregnant rats		Pregnant rats	
	Normal diet	Low-sodium diet	Normal diet	Low-sodium diet
<i>Volume of urine (mL/day)</i>	14.1 ± 1.7 (17)	10.4 ± 1.3 (14)	26.7 ± 4.1 <sup>££</sup> (16)	13.0 ± 2.2 <sup>**</sup> (15)
<i>Osmolality (mosmol/kg H<sub>2</sub>O)</i>	1393 ± 121 (16)	1347 ± 104 (14)	476 ± 60 <sup>£££</sup> (15)	806 ± 121 <sup>*££</sup> (16)
<i>UV<sub>osmol</sub> (μmol/day)</i>	17.3 ± 1.6 (16)	12.5 ± 1.0 <sup>*</sup> (14)	10.0 ± 0.9 <sup>£</sup> (15)	8.1 ± 0.6 <sup>£</sup> (16)
<i>UV<sub>sodium</sub> (μmol/day)</i>	0.89 ± 0.12 (13)	0.09 ± 0.01 <sup>***</sup> (12)	0.29 ± 0.06 <sup>£££</sup> (13)	0.12 ± 0.02 <sup>*</sup> (13)
<i>UV<sub>potassium</sub> (μmol/day)</i>	1.24 ± 0.15 (13)	1.59 ± 0.17 (12)	0.82 ± 0.11 <sup>£££</sup> (14)	0.81 ± 0.07 <sup>£££</sup> (13)
<i>UV<sub>urea</sub> (μmol/day)</i>	8.88 ± 1.32 (12)	6.78 ± 0.61 (12)	5.24 ± 1.18 <sup>££</sup> (14)	3.81 ± 0.29 <sup>££</sup> (13)
<i>UV<sub>creatinine</sub> (ηmol/day)</i>	0.075 ± 0.007 (13)	0.065 ± 0.003 (12)	0.079 ± 0.003 (14)	0.051 ± 0.003 <sup>***££</sup> (13)

Results are expressed as mean ± SEM. Number in parenthesis represents the number of rats. UV mean excretion in urinary volume.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 versus normal diet (same group).

£ p < 0.05, ££ p < 0.01, £££ p < 0.001 versus nonpregnant rats (same diet).

FIGURE 3



## REFERENCES

1. Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Diseases* 1987; 9(4) :296-302.
2. Slangen BFM, Out ICM, Verkeste CM, and Peeters LLH. Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J physiology* 1996; 270 :H1779-1784.
3. Dowell RT, and Kauer CD. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19(9) :613-25.
4. Lund CJ, and JC Donovan. Blood volume during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98 :393-403.
5. Baylis C. The determinants of renal hemodynamics in pregnancy. *Am J Kidney Diseases* 1987; 9(4) :260-264.
6. Green R, and Hatton TM. Renal tubular function in gestation. *Am J Kidney Diseases* 1987; 9(4) :265-269.
7. Lindheimer MD, Barron WM, Durr J, and Davison JM. Water homeostasis and vasopressin release during rodent and human gestation. *Am J Kidney Diseases* 1987; 9(4) :270-275.
8. Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180 :608-13.



9. Medvedeva IA, Maslova MN and Panov AA. The effect of hypothermic stress on Na-K-ATPase activity in rat erythrocytes. *Fiziologicheskii Zhurnal SSSR Imeni I M Sechenova* 1992;78(11):119-24.
10. Gutkowska J, Boucher R, and Genest J. Dosage radioimmunologique de l'activité rénine plasmatique. *Union Med Can* 1977;106:446-50.
11. Brochu M, Féthière J, Roy B, Ong H, and De Léan A. Highly sensitive and rapid radioimmunoassay for aldosterone in plasma and cell culture medium. *Clin Biochem* 1989;22:289-92.
12. Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdès G, and Donosso E. Maternal plasma volume expansion and hormonal change in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1993; 81(6) :1029-33.
13. Duvokot JJ, Cheriex EC, Pieters AA, Menheere PPCA, Schouten HJA, and Peeters LLH. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1995; 85(3) :361-7.
14. Kirksey A, and Pike RL. Some effects of high and low Na<sup>+</sup> intakes during pregnancy in the rat: food consumption, weight gain, reproduction performance, electrolyte balance, plasma total protein and protein fractions in normal pregnancy. *J Nutr* 1962; 77 :33-42.
15. Verkeste CM, Slangen BMF, Dubelaar ML, Van Kreel BK and Peeters LLH. Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rats. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt2) :H1662-66.
16. Challis JRG, and Mitchell BF. Hormonal control of preterm and term parturition. *Seminars in Perinatology* 1981; 5(3) :192-202.

17. Lockwood CJ. Stress-associated preterm delivery: The role of corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(1Pt3):S264-6.
18. Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Van Oeyon P, Papera S, Sealy JE and Lagagh JH. Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Medecine* 1980; 68 :97-104.
19. Smeaton TC, Andersen GJ and Fulton DS. Study of aldosterone levels in plasma during pregnancy. *J Clin Endo Metab* 1977; 44 :1-7.
20. Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MRA, Pidgeon J, and Soni S. Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 1982; 330 :81-93.
21. Davison JM, Dunlop W, and Ezimakhai M. Twenty-four-hour creatinine clearance during the third trimester fo normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87 :106-9.
22. Lindheimer MD, and Katz AI. Kidney function in the pregnant rat. *J Lab Clin Med* 1971; 78 :633-41.
23. Atherton JC, Bielinska A, Davison JM, Haddan I, Kay C, and Samuels R. Sodium and water reabsorption in the proximal and distal nephron in conscious pregnant rats and third trimester woman. *J Physiol* 1988; 396 :457-70.
24. Schneider G, and Mulrow PJ. Regulation of aldosterone production during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1973; 92 :1208-15.

25. Kirksey A, Pike RL, and Callahan JA. Some effects of high and low sodium diet intakes during pregnancy in the rat : electrolyte concentration of maternal plasma, muscle, bone and brain and of placenta, amniotic fluid, fetal plasma and total fetus in normal pregnancy. *J Nutrition* 1963; 77 :43-51.
26. Faber MD, Kupin WL, Gopal KG, and Narins RG. The differential diagnosis of acute renal failure. In : JM Lazarus, Brenner BM. *Acute renal failure*, New York, Churchill Livingstone, 1993. p.133-192.

**ACKNOWLEDGEMENT**

The authors thank Dr Patrick Vinay for its valuable comments and critical review of the manuscript. This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec and Medical Research council of Canada. S.B. received a studentship from Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. M.B. is a scholar from Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**MODULATION OF MATERNAL ANGIOTENSIN II RECEPTOR  
SUBTYPES IN A MODEL OF INTRAUTERINE GROWTH  
RESTRICTION IN RAT.**

**MODULATION OF MATERNAL ANGIOTENSIN II RECEPTOR SUBTYPES IN A MODEL OF  
INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION IN RAT.**


Une diète faible en sodium donnée à des rates gestantes durant la dernière semaine de gestation induit : une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, une réduction de l'expansion du volume plasmatique et conduit à une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). Le but de la présente étude est de caractériser la modulation des sous-types de récepteurs d'angiotensine II (All) dans ce modèle de RCIU comparé aux rates gestantes normales. Au hasard, des rates gestantes ont été assignées à deux groupes, un contrôle et un recevant une diète faible en sodium pour les 7 derniers jours de la gestation (RCIU). Des groupes similaires de rates non-gestantes ont aussi été utilisés. À la fin de la période de la diète, l'expression et la quantité des sous-types de récepteurs d'All ont été analysées par les techniques d'essai de protection à la RNase et de marquage par photoaffinité dans l'hypothalamus, l'hypophyse, le cortex surrénalien, le rein, l'artère utérine et le placenta. Dans l'hypothalamus et l'hypophyse, la gestation induit une augmentation des ARNm de l'AT<sub>1</sub>. Par contre, dans les artères utérines, on observe une diminution. La protéine AT<sub>1</sub> fut aussi diminuée dans les reins. Pour le récepteur AT<sub>2</sub>, une baisse a été notée dans le cortex surrénalien de rates gestantes. Dans le modèle de RCIU, comparativement aux rates gestantes normales, les AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont moins nombreux dans l'hypophyse. On observe une diminution de la protéine AT<sub>1</sub> dans le placenta et du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cortex surrénalien. Ces résultats montrent que la gestation entraîne une modulation des récepteurs d'All spécifique aux tissus et que cette modulation est différente dans le modèle RCIU. Nous suggérons que ces altérations, comparées à une gestation normale, soient probablement impliquées dans les changements physiologiques et morphologiques associés à la RCIU.

**MODULATION OF MATERNAL ANGIOTENSIN II RECEPTOR SUBTYPES IN A MODEL OF  
INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION IN RAT.**

Sophie Bédard, MSc, Serge Picard, BSc, Benoit Sicotte, BSc,  
Patrick Lapointe, MSc, Jean St-Louis, PhD, and Michèle Brochu, PhD.

Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine,  
Department of Obstetrics-Gynecology and Faculty of medicine,  
Université de Montréal, Québec, Canada.

Address all correspondence and request for reprints to :

Michèle Brochu, PhD  
Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montréal, Québec, Canada,  
H3T 1C5  
E-mail address : 

## CONDENSATION

Low-sodium diet given to pregnant rats induced a tissue-specific modulation of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> , which is likely to be involved in physiological changes associated to IUGR.



**Key words :** Angiotensin II receptors ; low-sodium diet ; gestation ; rat ;  
renin-angiotensin-aldosterone system ; IUGR.

**ABSTRACT**

Low-sodium diet given to pregnant rats, in the last week of gestation, is known to induce activation of renin-angiotensin-aldosterone system, to reduce plasma volume expansion and to lead to intrauterine growth restriction (IUGR). The aim of the present study is to characterize the modulation of angiotensin II (All) receptor subtypes in our model of IUGR compared to normal pregnant rats. Pregnant rats were randomly assigned to two groups, one control and one receiving low-sodium diet from gestational days 15 through 22, corresponding to the last week of gestation. Similar groups of nonpregnant rats were also used as controls. At the end of the treatment, RNA and protein levels of All receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) were analysed respectively by RNase protection assay and photoaffinity labeling in various target tissues such as hypothalamus, pituitary, adrenal cortex, kidney, uterine arteries and placenta. In hypothalamus and pituitary, gestation induced an increase of AT<sub>1</sub> mRNA levels. However, in uterine arteries, we observed a decrease. The AT<sub>1</sub> protein levels were also decreased in kidney. Concerning the AT<sub>2</sub> receptor, a decrease was noted in adrenal cortex of pregnant rats. In IUGR model, compare to normal gestation, the AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> are less numerous in pituitary. We also observed a decrease of AT<sub>1</sub> protein levels in placenta, and AT<sub>2</sub> receptor in adrenal cortex. These results have shown that gestation lead to a tissue-specific modulation of All receptors which is different in IUGR model. We suggest that those alterations, compared to normal gestation, are likely to be involved in physiological and morphological changes associated to IUGR.

## INTRODUCTION

Angiotensin II (All) is a key factor in the renin-angiotensin system (RAS) in addition to other biological actions on cardiovascular and nervous (central and peripheral) systems. Indeed, the All is involved in the control of blood pressure, water and electrolytes homeostasis, hormone secretion, cellular growth and neuronal activity <sup>1</sup>. All these physiological effects occur through an interaction of All with its receptors on the cellular membrane of target tissues. Following the binding of the peptide, an intracellular signaling mechanism will lead to the biological response.

All effects on vasoconstriction, renal retention of water and salt, aldosterone and vasopressin secretion, are known to be mediated by the AT<sub>1</sub> receptor <sup>1</sup>. Signaling of AT<sub>1</sub> occurs through G-protein and second messengers IP<sub>3</sub>, diacylglycerol and calcium <sup>1</sup>. Not much is known about the signaling mechanisms and actions of the second All receptor, termed AT<sub>2</sub>. However, the plentiful presence of AT<sub>2</sub> in fetal tissues, and its disappearance in adult age, suggest that this receptor is involved in development by acting on cellular differentiation and proliferation <sup>1</sup>.

During pregnancy, RAS is known to be activated <sup>2</sup>. However, there is a decreased sensitivity to All <sup>3,4</sup> which has also been shown in isolated vessels, such as aorta <sup>5</sup> and mesenteric arteries <sup>6</sup>. It was demonstrated, in mesenteric arteries and renal glomeruli of pregnant rabbit, that the density of All

receptors was decreased <sup>7</sup>. In myometrium of pregnant sheep, a decrease was noted in the number of All receptors, whereas the ratio  $AT_1/AT_2$  was increased <sup>8</sup>. Bird and al. <sup>9</sup> observed an increase of the  $AT_1$  in the uterine artery endothelium of pregnant sheep, but no change in arterial smooth muscle. On the other hand, number or affinity of the All receptors was unchanged during gestation in mesenteric vascular bed <sup>10</sup>, isolated hepatocytes <sup>11</sup> and adrenal cortex of rats <sup>12</sup> and rabbit <sup>7</sup>. All these findings prompt us to study the All receptors during gestation.

Modification in sodium intake is known to influence the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) <sup>13</sup>. Alterations in sodium intake or plasma All levels affect the All receptors. In fact, it was demonstrated that  $AT_1$  receptor levels were increased in rat adrenal cortex when sodium was restricted <sup>14,15</sup>. In the kidney, reports on the effects of low-sodium diet on  $AT_1$  receptor levels were found contradictory, in which either an increase <sup>16</sup> or a decrease <sup>17</sup> of the total expression of  $AT_1$  was described.

We have developed a model of intrauterine growth restriction (IUGR) by giving a low-sodium diet to pregnant rats during last week of gestation <sup>18</sup>. In this model, a suractivation of the RAAS was observed. We were interested to better understand how the All receptor subtypes are modulated in this situation where plasma All levels must be increased. Our hypothesis is that the interaction between gestation and low-sodium diet, two conditions that result in activation of the RAAS, should modify the efficacy of All to induce its

biological response through a differential modulation of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. We suggest that these alterations, compared to normal gestation, are likely to be involved in physiological and morphological changes associated to IUGR.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animal*

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada) weighing between 225 and 250 g were mated with male rats of the same age. The morning on which spermatozoa were found in vaginal smears was deemed to be day 1 of gestation. Nonpregnant rats were picked randomly through the estrous cycle and paired to a pregnant rat. All animals were housed under controlled light (6h00-18h00) and temperature ( $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Pregnant and nonpregnant rats were randomly assigned to two groups, one control and one receiving the restricted sodium diet from days 15 through 22 (corresponding to the last week of gestation). The normal diet given to control groups contained 0.2% sodium (basal diet 5755; PMI Feed Inc, Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and is combined with tap water as drinking fluid. The experimental groups received a diet containing 0.03% sodium (low sodium diet 5881; PMI Feed) with demineralized water. At the end of the treatment period, on day 22 (day 23 corresponding to term-gestation), the rats of each group were killed by decapitation (9h00-9h30), blood collected for hormonal analysis and tissues (hypothalamus, pituitary, adrenal cortex, kidney, uterine arteries and placenta) were removed. This study received approval from the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

### *Hormonal analysis*

Plasma renin activity (PRA) was determined indirectly as described by Gutkowska and al. <sup>19</sup>. In brief, angiotensin I (AI) generated during a period of 2 hours was quantitated by radioimmunoassay. The antibody used was purchased from Peninsula, Inc (Belmont, Ca.). Plasma aldosterone was extracted from serum by a solid-phase procedure with C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges (Millipore; Waters, Montréal, Québec, Canada) and then quantitated by radioimmunoassay technique, as described elsewhere <sup>20</sup>.

### *RNA isolation*

Total cellular RNA from each tissue of term-pregnant and nonpregnant rats was extracted by a modification of the method of Chomczynski and Sacchi <sup>21</sup> using TRIzol Reagent (Gibco/BRL, Ontario, Canada). Final RNA pellets were dissolved in an appropriate volume of 100% deionized formamide, and stored at -20°C. The RNA concentration was determined from absorbance measurement at a wavelength of 260 nm, and quality of samples verified by ethidium bromide fluorescence.

### *RNAse protection assay (RPA)*

PREPARATION OF PROBE. A 182-base Dral fragment excised from pcDNA1 plasmid ( kindly provided by Dr Kathy Griendling, Emory University, Atlanta, Georgia, USA) was used for the preparation of a high activity RNA

antisense probe for the AT<sub>1</sub> receptor. This probe did not discriminate the AT<sub>1a</sub> from the AT<sub>1b</sub>. A 215-base HindIII-XbaI fragment excised from pcDNAI/Amp plasmid (gift from Gaétan Guillemette, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc) was cloned into the multiple cloning sites of the Bluescript vector, linearized with PvuII and used for the preparation of a high activity RNA antisense probe for the AT<sub>2</sub> receptor. A 334-base fragment of  $\beta$ -actin gene (Ambion RNA company, Austin, Texas, USA) was used as an internal control. The antisense probes were prepared by transcription *in vitro* with the Ambion Maxiscript technique (Ambion RNA company, Austin, Texas, USA) in the presence of T7 polymerase for AT<sub>2</sub>, SP6 polymerase for AT<sub>1</sub> as well as  $\beta$ -actin, and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (Mandel, Boston, USA). The radioactive probes were separated from unincorporated [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP by washing with 75% ethanol / 25% sodium acetate.

**RNASE PROTECTION.** For the hybridization step, 25  $\mu$ g of cellular RNAs was combined to the antisense probes (100 000 cpm for AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>, 15 000 cpm for  $\beta$ -actin) in a 5X PIPES buffer (200mM 1,4-piperazine diethanesulphonic acid (PIPES) pH 6.4, 2M sodium chloride (NaCl), 5mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) and 80% of deionized formamide. This mix was incubated at 65°C for 10 min. After denaturation of RNAs at 85°C for 5 min, the hybridization was performed overnight at 47°C. Non-hybridized RNAs were digested by RNase T1 / A (RNase cocktail from Ambion RNA company) in a RNase digestion buffer containing 1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5M



EDTA and 0.3M NaCl for 1 hour at 30°C. Following a treatment with 20% SDS and 10 mg/ml proteinase K for 15 min at 37°C, the RNAs hybridized were purified by phenol/chloroform extraction, precipitated in 100% ethanol and resuspended in 10 µL of electrophoresis buffer. This buffer containing 80% deionized formamide, 1mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylen cyanol and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). RNAs were denatured at 85°C for 5 min, and then separated by electrophoresis in a 5% acrylamide / 7M urea gel at 300 V. After electrophoresis, the gel is fixed for 15 min in 10% methanol / 5% acetic acid and dried for 1 hour. The dried gel was exposed to X-ray film (Kodak X-Omat AR5) with intensifying screens at -80°C for 1-7 days. Picture 1 shows a representative autoradiogram of RPA for adrenal cortex. Relative intensities of AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> and β-actin bands were determined by analysis of the gel with Scion Image computer software (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA). The steady-state mRNA levels of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> were expressed in arbitrary units, and standardized by comparison with hybridization results obtained from the housekeeper gene β-actin.

#### *Preparation of tissue membranes*

Each membrane preparation was performed using the adrenals from four rats, the pituitary from two rats, and 120 mg for the kidney cortex and the placenta from each group. The tissue was cut and homogenized in 0.25M sucrose with a Polytron, 10 sec twice at setting 8 (Brinkman, Rexdale,

Ontario). The homogenate was centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. The supernatant was then centrifuged at 50 000 g for 30 min at 4°C. The resulting particulate fraction was resuspended in binding buffer (25mM Tris-HCl, 120mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.0002% NaN<sub>3</sub>, 5mM EDTA, 1µM leupeptide, 1µM aprotinin, 1µM pepstatine, and 100µM PMSF at pH 7.4). Membrane protein concentration was measured by Bradford colorimetric method <sup>22</sup>. Membranes were diluted at a concentration of 1µg/µL and stored at -80°C.

#### *Photoaffinity labelling procedures*

LABELING OF PROBE. <sup>125</sup>I-All-Bpa (specific activity, 2000 Ci/mmol) was prepared with Iodogen and <sup>1</sup>Sar-<sup>5</sup>Val-<sup>8</sup>Bpa-All (graciously provided by Gaétan Guillemette, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc) as described by Fraker and Speck <sup>23</sup>. The labeled peptide was purified to apparent homogeneity by high performance liquid chromatography (reverse phase C-18), and their specific radioactivity was determined by gamma counter.

PHOTOAFFINITY LABELING. Briefly, tissue membranes (100µg of protein) were incubated with 2µCi (or 5nM) of <sup>125</sup>I-<sup>1</sup>Sar-<sup>5</sup>Val-<sup>8</sup>Bpa-All in 500µL of binding buffer containing 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 2mg/mL bacitracin, and 50ug/mL soybean trypsin inhibitor. 1µM of PD123319 (AT<sub>2</sub> antagonist) or L-158,809 (AT<sub>1</sub> antagonist) was added to selectively label AT<sub>1</sub> or AT<sub>2</sub> receptors, respectively. Nonspecific binding was evaluated in the presence of 10<sup>-5</sup>M All.

After 45 min of incubation in dark at room temperature, the membranes were washed by centrifugation (13 000g, 10 min) with binding buffer (except no BSA). Then, they were irradiated under UV light (365nm) (Long wave B-100SP, UVP inc., Upland, California, USA) for 45 min at 4°C. Noncovalently bound ligand was removed by successive washes with an acidic medium (citrate buffer, pH 5.5 ). The washed pellets were incubated for 60 min at 37°C, in a denaturing buffer containing 60mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.3% bromophenol blue, and 125mM dithiothreitol (DTT). Denatured photolabeled protein complexes (40 $\mu$ L) were subject to electrophoresis on a polyacrylamide gel (9% running and 5% stacking) at 25mA (stacking) and 50mA (running) for approximately 5 hr. Samples of each group were present on the same gel. The gel was dried before autoradiography on Kodak X-Omat AR film. Exposures lasted for 1-3 days at -80°C. Picture 2 shows a representative experiment of photoaffinity labeling. Relative intensities of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> bands were determined by analysis of the gel with Scion Image computer software (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA). Results are expressed in arbitrary units in comparison with nonpregnant rat receiving normal diet.

#### *Mechanical uterine vessels measurement*

After the rats were decapitated, a uterine horn (with attached vasculature) was removed and place in cold, oxygenated Krebs bicarbonate solution (KBS). An arcuate artery, at the midpoint of the uterine arcade, was

cleaned of adhering tissues under a stereomicroscope. A section of ~ 1.5 mm was isolated, and two tungsten wires (20  $\mu\text{m}$  diameter) were inserted into the lumen. The arterial segment was secured by the wires to supports of a myograph system (Living System Instrumentation, Burlington, VT). One support was attached to a strain gauge force transducer (Kulite Semiconductor Products, Ridgefield, NJ), and the other was connected to a micrometric measuring device (Kaman Science, Colorado Springs, CO). Force was recorded on a personal computer through a data-acquisition system using Workbench software (Kent Scientific, Litchfield, CT). The passive length-tension relationship was measured as reported by St-Louis and al.<sup>24</sup> In brief, the arterial segment was stretched in steps of ~ 30  $\mu\text{m}$  in length (internal circumference) until ~ 1.5 mN/mm was reached (1mN=102mg). The arterial segment was held at each length for 2-3 min, and wall tension at peak response to stretch was recorded. The points obtained were fitted to an exponential curve. Vessel dimensions were normalized with this length-tension curve.  $L_{50}$  was defined as the internal circumference corresponding to the point on the exponential curve for which the effective transmural pressure was 50 mmHg, with the use of the Law of Laplace.

## RESULTS

In nonpregnant rats, low-sodium diet has produced a nonsignificant increase in plasma renin activity (PRA) from  $2.33 \pm 0.40$  to  $3.78 \pm 1.54$  pmol AI/ml/hour (normal vs low-sodium diet,  $n=12$  for each group). Gestation has increased PRA from  $2.33 \pm 0.40$  to  $6.31 \pm 1.04$  pmol AI/ml/hour (nonpregnant vs pregnant,  $n=12$  for each group,  $p<0.01$ ). However, when gestation is combined with low-sodium diet (IUGR model), PRA was markedly increased to  $14.49 \pm 4.22$  pmol AI/ml/hour ( $n=8$ ) ( $p<0.05$  compared to pregnant rats on normal diet). Plasma aldosterone was evenly affected by diet and gestation. In fact, in nonpregnant rats, low-sodium diet has induced an increase in plasma aldosterone levels from  $2.0 \pm 0.2$  to  $4.9 \pm 0.7$  pmol/ml (normal,  $n=13$  vs low-sodium diet,  $n=12$ ,  $p<0.001$ ). Gestation has also increased this steroid from  $2.0 \pm 0.2$  to  $6.7 \pm 0.9$  pmol/ml (nonpregnant,  $n=13$  vs pregnant,  $n=12$ ,  $p<0.001$ ). When low-sodium diet was given to pregnant rats, there was a markedly increase to  $22.6 \pm 1.5$  pmol/ml ( $n=10$ ) ( $p<0.001$  compared to normal gestation).

The mRNA and protein levels of  $AT_1$  and  $AT_2$  receptors were measured in several target tissues. The selection of those tissues was done to compare molecular aspect with several biological responses of AI already observed in our laboratory. Indeed, the hypothalamo-hypophysal axis is associated to thirst center and AVP secretion, the adrenal cortex to aldosterone secretion, the kidney to water and electrolyte homeostasis, the

uterine arteries to uteroplacental blood flow and, finally, the placenta is related to feto-maternal exchanges.

The hypothalamus, which contains the thirst center, is involved in water intake and responds to  $\text{Ang II}$ . Sensitivity of the methods used did not permit to detect  $\text{AT}_2$  receptor. As shown in figure 1, in hypothalamus of nonpregnant rats, low-sodium diet has seemed to increase the  $\text{AT}_1$  receptor steady state mRNA levels, but the difference did not reach significance. In pregnant rats, a significant increment of  $\text{AT}_1$  mRNA levels were observed compared to nonpregnant rats receiving normal diet. However, in the model of IUGR, no effect was observed in the  $\text{AT}_1$  steady state mRNA levels compared to pregnant rats on normal diet. Quantity of  $\text{AT}_1$  protein was not measured by photoaffinity labeling because of the limited availability of hypothalamus tissue.

The presence of the two receptors subtypes was noted in pituitary which secretes vasopressin (AVP), in part stimulated by  $\text{Ang II}$ . In nonpregnant rats, low-sodium diet did not affect the  $\text{AT}_1$  mRNA levels (fig. 2A). An increase of the  $\text{AT}_1$  receptor steady state mRNA levels was observed in pregnant rats compared to nonpregnant rats. Nevertheless, no significant difference was observed between the two groups of pregnant rats. In parallel,  $\text{AT}_1$  protein amounts were not affected by the diet in nonpregnant groups (fig. 2B). During gestation with normal diet, no modification was noted. When low-sodium diet was given to pregnant rats, the quantity of  $\text{AT}_1$  receptor was decreased

compared to normal gestation. The expression of mRNA  $AT_2$  levels were undetected with 25 $\mu$ g of pituitary membrane preparation. The sodium restricted diet, in nonpregnant rats, has decreased the  $AT_2$  protein amounts (fig. 2C). Gestation did not affect the quantity of this receptor. However,  $AT_2$  protein levels were decreased in the IUGR model, compared to pregnant rats receiving the normal diet.

All, via  $AT_1$  receptor, stimulates the aldosterone secretion by the adrenal cortex. In this tissue,  $AT_1$  receptor steady state mRNA and protein levels were not modified significantly with low-sodium diet, gestation or a combination of both (fig. 3 A and B). Similar observations were made on  $AT_2$  mRNA (fig. 3C) and protein (fig. 3D) levels in nonpregnant rats fed a low-sodium diet. However, the  $AT_2$  steady state mRNA and protein levels were greatly lower in pregnant rats compared to nonpregnant rats fed the normal diet. In the IUGR model, a decrease of  $AT_2$  mRNA levels was also noted compared to normal gestation.

Salt and fluid homeostasis are regulated by the kidneys which respond to All. Amongst the aspects of renal physiology affected during gestation, glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow are known to increase. The kidney expression of  $AT_1$  was not significantly affected by low-sodium diet or gestation (fig. 4A). No significant difference was observed between the two pregnant groups. The  $AT_1$  protein profile showed no effect of the diet in nonpregnant and pregnant rats (fig. 4B). In rats fed on either diet, gestation

has induced a decrease of AT<sub>1</sub> protein levels. The AT<sub>2</sub> mRNA levels were not detected in the kidney by the RNase protection technique. By photoaffinity labeling, no change was observed in the quantity of AT<sub>2</sub> receptor with gestation and low-sodium diet (fig. 4C).

Uterine arteries are involved in uteroplacental blood flow. We have observed that gestation induced a significant decrement of AT<sub>1</sub> mRNA levels (fig. 5). There is no difference between the normal and the IUGR pregnant groups. The AT<sub>2</sub> mRNA levels were barely detectable in uterine arteries using RNase protection technique, and therefore signal quantification could hardly be achieved. Similarly, limited availability of uterine artery tissues needed for photoaffinity labeling experiments, we could not performed AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein measurements. Moreover, physical measurements of those vessels were done (data not shown). In nonpregnant rats, low-sodium diet has induced a small increase in the diameter of uterine artery from  $121 \pm 7 \mu\text{m}$  to  $140 \pm 10 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$  vs normal diet,  $n=11$  for each group). Pregnancy has increased this diameter from  $121 \pm 7 \mu\text{m}$  to  $269 \pm 11$  ( nonpregnant,  $n=11$  vs pregnant,  $n=10$ ,  $p < 0.001$ ). However, in the IUGR model, a decrease to  $198 \pm 15 \mu\text{m}$  ( $n=10$ ) was observed compared to pregnant rat on normal diet ( $p < 0.01$ ).

Placenta plays a role in exchange between mother and fetus, and presence of AT receptors had been noted<sup>25</sup>. As shown in figure 6A, AT<sub>1</sub> mRNA levels in placenta were not different between the normal and IUGR



rats. However, quantity of AT<sub>1</sub> protein was greatly diminished in pregnant rats fed a low-sodium diet (fig. 6B). No detection of AT<sub>2</sub> mRNA was noted in rat placenta. The AT<sub>2</sub> protein levels were not affected in IUGR model (fig. 6C).

### COMMENT

In our model of IUGR, pregnant rats receiving low-sodium diet during the last week of gestation, a greater activation of the RAAS was observed compared to normal gestation. We have shown that low-sodium diet in pregnant rats lead to a tissue-specific modulation of All receptors which could be involved in the intrauterine growth restriction observed.

Through the AT<sub>1</sub> receptor, in specific areas (thirst center) of the hypothalamus, All stimulates water intake<sup>26-28</sup>. However, evidence suggests that AT<sub>2</sub> receptor could also be involved in thirst-stimulated All<sup>29</sup>. To maintain body fluid homeostasis in response to sodium intake depletion, plasma All is increased. Moreover, an increase of AT<sub>1a</sub> and AT<sub>1b</sub> mRNA levels was demonstrated in rat hypothalamus<sup>16</sup>. However, our findings increase of AT<sub>1</sub> mRNA levels in nonpregnant rats fed a low-sodium diet did not reach significance. This discrepancy can be explained by the duration of the dietary manipulation: we gave the low-sodium diet for 7 days compared to 20 days by Jo et al.<sup>16</sup>. During gestation, we have observed that the expression of AT<sub>1</sub> receptor in hypothalamus is elevated. This could explain the reported increase of water intake in pregnant rats<sup>18</sup> in which stimulation of the thirst center, stimulated by the activation of RAAS, is likely to occur during gestation. In addition to RAAS, hypovolemia is also considered as a stimulus for thirst<sup>26</sup>. It is known that the decrease of blood volume and blood pressure triggered the release of brain All<sup>30</sup>. In our model of IUGR, plasma volume

contraction was observed <sup>18</sup>. We expected a stimulation of the thirst center in our IUGR model to increase their water intake. However, pregnant rats with low-sodium diet drank less than normal pregnant rats. Thus, no modification of AT<sub>1</sub> receptors was attended in the hypothalamus of the IUGR model. As expected, there is no difference in the AT<sub>1</sub> mRNA levels between normal pregnant rats and those who gave IUGR babies. On other side, knock-out mice for the AT<sub>2</sub> receptor gene showed a decreased water intake <sup>31</sup>, suggesting that, in addition to AT<sub>1</sub>, central AT<sub>2</sub> receptor could be involved in thirst induced by dehydration. Accordingly, in our model of IUGR, there could exist a different modulation of the AT<sub>2</sub> receptor. Unfortunately, the AT<sub>2</sub> mRNA levels were too low to be detected by RNase protection. Therefore, the regulation of All receptors in the hypothalamus of rat remains to be investigated in the IUGR model.

Vasopressin is released from the posterior pituitary to stimulate water and salt reabsorption in renal tubules <sup>32</sup>. Binding studies showed that pituitary contains mainly AT<sub>1</sub> receptor, and only 10-15% of AT<sub>2</sub> <sup>33</sup>. The role of each All receptor subtypes in the control of AVP release, is controversial. Quadri et al. <sup>34</sup> have demonstrated that central administration of Losartan (AT<sub>1</sub> antagonist) attenuated, but not completely, the All-induced AVP release, whereas an AT<sub>2</sub> antagonist PD123177 was ineffective to block this AVP release. However, another study found that an increase in plasma AVP is decreased by blockade of either AT<sub>1</sub> or AT<sub>2</sub> receptors, suggesting the involvement of both receptors <sup>29</sup>. Recent study also showed that AVP release is under inhibitory

control by periventricular AT<sub>2</sub> receptor<sup>35</sup>. During normal gestation, the maternal extracellular fluid volume expands, and AVP is present at a level sufficient to allow water retention<sup>36</sup>. We have demonstrated that gestation upregulates the AT<sub>1</sub> mRNA levels in pituitary, but not the AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein levels. During gestation, mechanisms leading to proteins translation are probably regulated differently in pituitary, resulting in a number of AT<sub>1</sub> receptors unaffected. This increase of AT<sub>1</sub> mRNA levels could be due to estrogens which can modulate the expression of All receptors in anterior pituitary of female rat<sup>37</sup>. In our IUGR model, plasma volume contraction is observed<sup>18</sup> suggesting that plasma level of AVP must be elevated. However, their AT<sub>1</sub> mRNA levels were not affected, and AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein amounts were reduced compared to normal gestation. Therefore, this reduction of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein levels suggests that the increase of AVP, likely in our model of IUGR, must be stimulated by the volume-sensing AVP secretory mechanisms. In fact, Phillips et al.<sup>30</sup> have suggested that the pathway for AVP release, following hypovolemia, was related to a baroreflex system independent of All and its receptors.

All, via the AT<sub>1</sub> receptor in adrenal cortex, stimulates aldosterone secretion which is involved in sodium retention leading to water retention<sup>1</sup>. AT<sub>2</sub> receptors are present in lesser quantity than AT<sub>1</sub>, but are not involved in this steroid secretion<sup>14</sup>. In nonpregnant rats, we have observed that transcription and translation of both All receptor subtypes were not affected by low-sodium diet. This is different from the increase of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> mRNA

levels observed by Lehoux et al.<sup>15</sup>. Maybe this discrepancy could be explained by the use of a different strains of rats. Interestingly, in our laboratory, measurement of aldosterone plasma levels (data not shown) showed that the Sprague-Dawley female rats (Charles River) are less sensitive to low-sodium diet than the Long Evans strain male used by Lehoux et al.<sup>15</sup>. Our results support that normal gestation did not lead to modification in expression or quantity of AT<sub>1</sub> receptor in adrenal cortex, as already observed<sup>12</sup>. Moreover, we have demonstrated a decrease of AT<sub>2</sub> mRNA and protein levels during gestation. This decrease of AT<sub>2</sub> could be due to high plasma All levels. In fact, Ouali et al.<sup>38</sup> have showed that All, exclusively through AT<sub>1</sub>, caused a decrease in AT<sub>2</sub> receptor mainly by decreasing AT<sub>2</sub> mRNA stability. Hyperaldosteronemia, observed in pregnant rats, could not be explained by an increase of AT<sub>1</sub> in zona glomerulosa but rather be explained by a diminution of AT<sub>2</sub>. Accordingly, this decrease of AT<sub>2</sub> receptor could privileged the availability of All to bind the AT<sub>1</sub>, and trigger the aldosterone secretion observed during gestation. In our IUGR model, AT<sub>1</sub> receptor was not affected compared to normal gestation, but the AT<sub>2</sub> expression was diminished. The same mechanisms (action of AT<sub>1</sub> on AT<sub>2</sub> mRNA stability and availability of All to bind AT<sub>1</sub>) that were observed in normal pregnant rats should occur with higher amplitude in pregnant rats with low-sodium diet. The increase of plasma aldosterone levels, in our model of IUGR, is likely to be regulated by the binding of All to AT<sub>1</sub>.

Water and salt reabsorption occurred in the kidney under, in part, Angiotensin II stimulation and mainly through AT<sub>1</sub> receptor<sup>1</sup>. In the adult kidney, the AT<sub>1</sub> is predominant with only 5-10% of AT<sub>2</sub><sup>39</sup>. A controversy exists about the effect of low-sodium diet on renal Angiotensin II receptors depending on the portion of kidney studied. Indeed, according to the renal portion observed, the proportion of Angiotensin II receptors is different. In the renal afferent artery, a decrease of AT<sub>1a</sub> and AT<sub>1b</sub> mRNA was shown with low-sodium intake<sup>40</sup>. Others found an increase of the total expression of AT<sub>1</sub> receptor<sup>16</sup>. Our results of AT<sub>1</sub> mRNA levels or AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein amounts were not affected by low-sodium diet in nonpregnant rats. To our surprise, AT<sub>1</sub> protein but not mRNA levels were decreased in pregnant rats which is opposed to the increase of AT<sub>1</sub> protein expected to explain the elevation of plasma volume during a normal gestation. This suggests that other physiological mechanisms, such as AVP and aldosterone, should be involved in this water retention. RNA and protein levels of the two subtypes of Angiotensin II receptors were not different in the IUGR model compared to normal gestation. However, the trend of AT<sub>1</sub> receptor decrease, observed in IUGR, could explain partially a decreased glomerular filtration and an alteration in sodium reabsorption.

Uterine vasculature was studied because of the importance of vessels in uteroplacental blood flow. Studies done on Angiotensin II receptors in uterine artery of pregnant sheep are controversial. Binding studies have observed no modulation of AT<sub>1</sub> protein during ovine pregnancy<sup>41</sup>. Others found an increased AT<sub>1</sub> mRNA and protein levels in the uterine artery endothelium, but

no change in arterial smooth muscle were found<sup>9</sup>. Binding studies done on AT<sub>2</sub> receptor revealed either an increase<sup>42</sup> or no modulation<sup>8,41</sup> of the AT<sub>2</sub> protein levels during pregnancy. To our knowledge, no studies were done on rats, probably due to the low amount of tissue. Our results showed a decrease of AT<sub>1</sub> mRNA levels during gestation as the AT<sub>1</sub> protein amounts were not detected by photoaffinity technique. Moreover, an increase of uterine artery diameter occurred in pregnant rats on normal diet which allow a higher uteroplacental blood flow necessary for fetal growth. Probably, the increase of uteroplacental blood flow will exert a pressure on vessel wall leading to the release of nitric oxide (NO), which act as a vasodilator. Thus, this release of NO lead to the expansion of the uterine artery. However, we strongly believe that growth factors are mainly involved in the hyperplasy/hypertrophy observed in the wall of uterine artery from pregnant rats. Those growth factors, probably emanating from ovary, uterus, placenta or fetus, should have an action specific on uterine artery seeing that only those vessel are modified during gestation.

Opposite to normal gestation, no alteration of AT<sub>1</sub> mRNA levels were noted in our model of IUGR. However, a decrease of uterine artery diameter was observed with low-sodium diet compared to normal diet in pregnant rats. A deficiency of growth factors should probably be involved in this diminution of diameter in uterine artery of IUGR model. Unfortunately, the AT<sub>2</sub> receptor was not detected by our techniques, but it could be involved in proliferation. At the present moment, we can not link the AT<sub>1</sub> receptor with the modification

of uterine artery diameter. Certainly, we can suggest that this decrease in uterine artery diameter is involved in a likely decreased uteroplacental blood flow, associated to fetal growth restriction.

During gestation, the plasma All levels are increased. This peptide is a potent vasoconstrictor and a growth promoter. Placenta contains All receptors which are mainly AT<sub>1</sub><sup>43</sup>. It was demonstrated that All, via AT<sub>1</sub>, stimulates the human placental lactogen (hPL)<sup>44</sup> which act directly on growth, or stimulate the IGF-1 secretion involved in fetal growth. In our model of IUGR, we observed a decrease of AT<sub>1</sub> protein levels which could lead to a decrease in placental growth hormone. Recently, Li and al.<sup>43</sup> noted a decrease of AT<sub>1</sub> mRNA and protein levels located in syncytiotrophoblast and cytotrophoblast of placenta obtained from human IUGR. He suggests the existence of a cross-talk between AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> in trophoblast, and this reduction in placental AT<sub>1</sub> in IUGR may, in part, account for the poor placental function associated to this disorder<sup>43</sup>. Further investigations on growth factors (hPL and IGF-I) should be envisaged in our model of fetal growth restriction to know if a modulation of those factors could be involved in IUGR.

In summary, we have shown that gestation combined with low-sodium diet lead to a tissue-specific modulation of All receptors. We suggest that these alterations, compared to normal gestation, correlated with physiological and morphological changes associated to IUGR. Modification of those receptors in pituitary and adrenal cortex should mostly affect maternal plasma



volume. Placental All receptors diminution could be involved in IUGR by altering functions, such as reduction of uteroplacental blood flow or fetal growth factors. Certainly, in addition to All receptors, other factors and mechanisms are involved in IUGR, but the suractivation of the SRAA should not be omit.

**LEGENDS TO PICTURES**

Picture 1. Detection of All receptors mRNA in the rat by RNase protection assay. Bands at 334 and 250 bases correspond to the full length undigested probe and the protected fragment of  $\beta$ -actin, respectively. Bands at 215 and 180 bases correspond to the full length undigested probe and the protected fragment of AT<sub>2</sub>, respectively. Bands at 182 and 154 bases correspond to the full length undigested probe and the protected fragment of AT<sub>1</sub>, respectively. P, mix of the three undigested probes ; lanes 1-3, undigested probes (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>,  $\beta$ -actin respectively) ; lanes 4-6, digested probes (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>,  $\beta$ -actin respectively) ; lane 7, control Yeast tRNA (25 $\mu$ g) ; lanes 8-11, protected RNA fragment from adrenal cortex (25 $\mu$ g per sample) of Sprague-Dawley rat.

Picture 2. Detection of All receptors protein (60kDa) in the rat by photoaffinity labeling. Membranes of adrenal cortex (100  $\mu$ g) were incubated with <sup>125</sup>I-All-Bpa (2 $\mu$ Ci) alone to show the total binding (lane 1), or in the presence of the AT<sub>1</sub> antagonist L-158,809 (1 $\mu$ M) to reveal the presence of AT<sub>2</sub> (lane 2), or the AT<sub>2</sub> antagonist PD123319 (1 $\mu$ M) to show the presence of AT<sub>1</sub> (lane 3), or the All (10<sup>-5</sup>M) for nonspecific binding (lane 4). Protein standard of the indicated molecular weight was run in parallel.

**LEGENDS TO FIGURES**

Figure 1. Effect of low-sodium diet on AT<sub>1</sub> receptor steady state mRNA levels in the hypothalamus of nonpregnant and pregnant rats. Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. AT<sub>2</sub> receptor mRNA levels were undetected by this technique. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. ££ p<0.01 vs nonpregnant rat (same diet).

Figure 2. Effect of low-sodium diet on mRNA and protein levels of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor in the pituitary gland of nonpregnant and pregnant rats. **A)** Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. AT<sub>2</sub> receptor mRNA levels were undetected by this technique. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. **B)** and **C)** Protein membranes were prepared and photoaffinity labeling was performed. Data are expressed compared to normal nonpregnant. Results shown are the mean ± SEM of three separate experiments. \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs normal diet (same group) ; £ p<0.05 vs nonpregnant rat (same diet).

Figure 3. Effect of low-sodium diet and gestation on mRNA and protein levels of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the adrenal cortex of nonpregnant and

pregnant rats. **A and C)** Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin (**A**) or AT<sub>2</sub>/β-actin (**C**) ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. **B and D)** Protein membranes were prepared and photoaffinity labeling was performed. Data are expressed compared to normal nonpregnant. Results shown are the mean ± SEM of three separate experiments. \* p<0.05 vs normal diet (same group) ; £ p<0.05 vs nonpregnant rat (same diet).

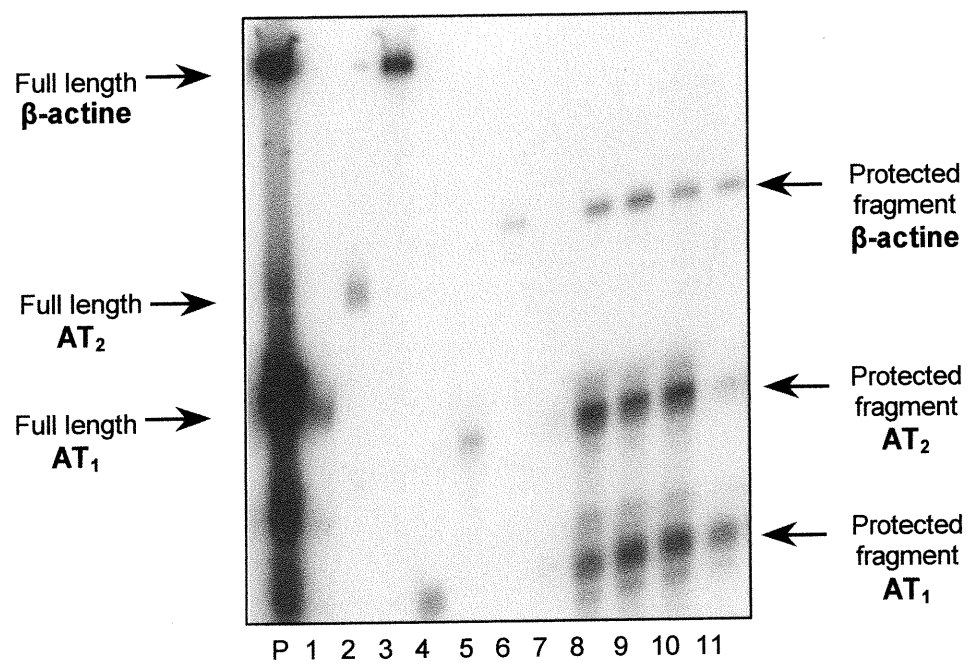
**Figure 4.** Effect of low-sodium diet on mRNA and protein of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor in the kidney of nonpregnant and pregnant rats. **A)** Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. AT<sub>2</sub> receptor mRNA levels were undetected by this technique. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. **B and C)** Protein membranes were prepared and photoaffinity labeling was performed. Data are expressed compared to normal nonpregnant. Results shown are the mean ± SEM of three separate experiments. £ p<0.05 vs nonpregnant rat (same diet).

**Figure 5.** Effect of low-sodium diet on AT<sub>1</sub> receptor steady state mRNA levels in the uterine artery of nonpregnant and pregnant rats. Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. AT<sub>2</sub>

receptor mRNA levels were undetected by this technique. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. \* p<0.05 vs nonpregnant rat (same diet).

**Figure 6.** Effect of low-sodium diet on mRNA and protein of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor in the placenta of rats. **A)** Total RNA was extracted and RNase protection assay was performed. AT<sub>2</sub> receptor mRNA levels were undetected by this technique. Data are expressed as AT<sub>1</sub>/β-actin ratio (arbitrary units). Results shown are the mean ± SEM of five separate experiments. **B and C)** Protein membranes were prepared and photoaffinity labeling was performed. Data are expressed compared to normal pregnant rats. Results shown are the mean ± SEM of three separate experiments. \* p<0.05 vs normal diet (same group).

PICTURE 1 (RNASE PROTECTION ASSAY)



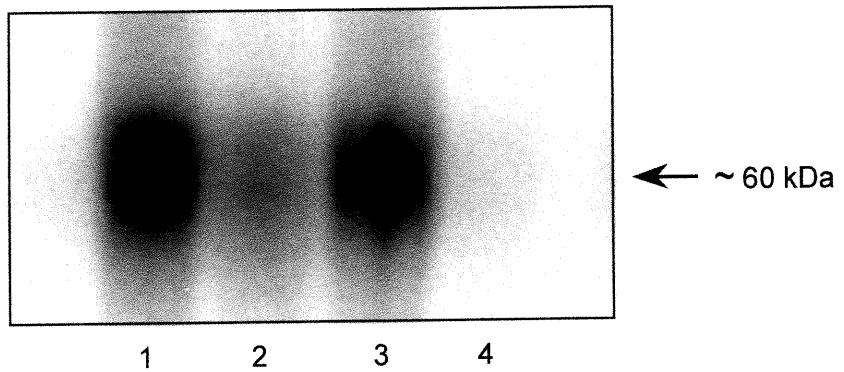
**PICTURE 2 (PHOTOAFFINITY LABELING)**

FIGURE 1 (HYPOTHALAMUS)

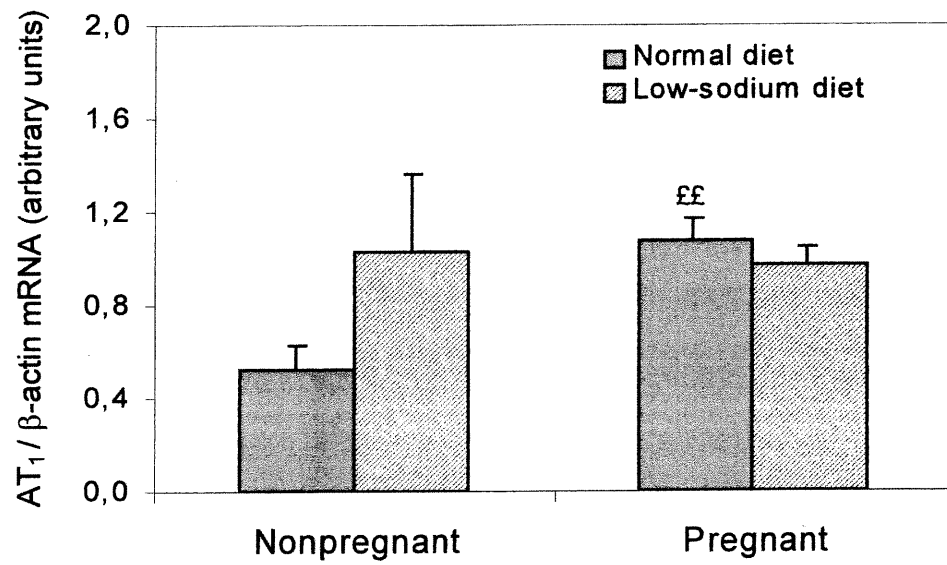




FIGURE 2 (PITUITARY)

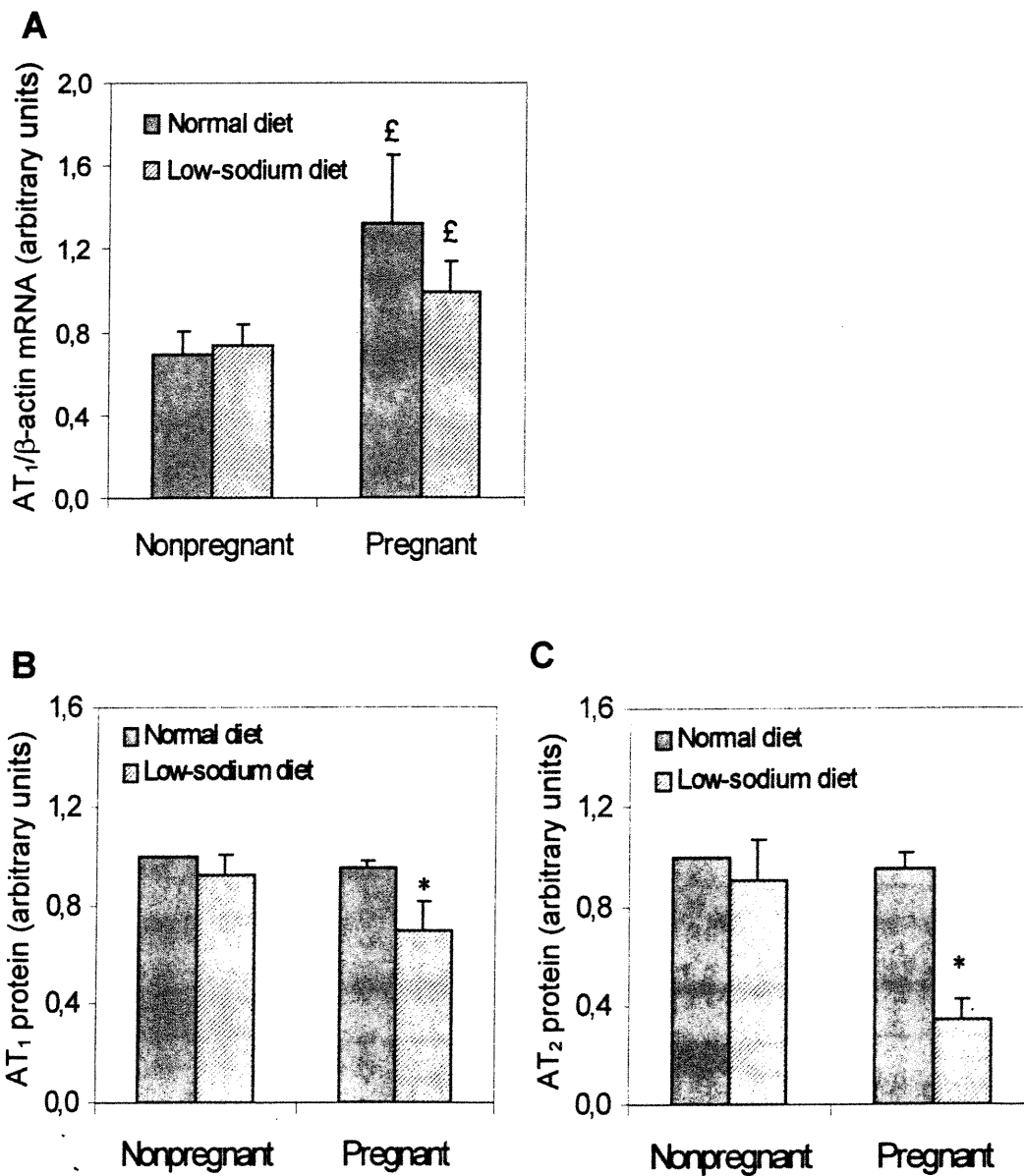


FIGURE 3 (ADRENAL CORTEX)

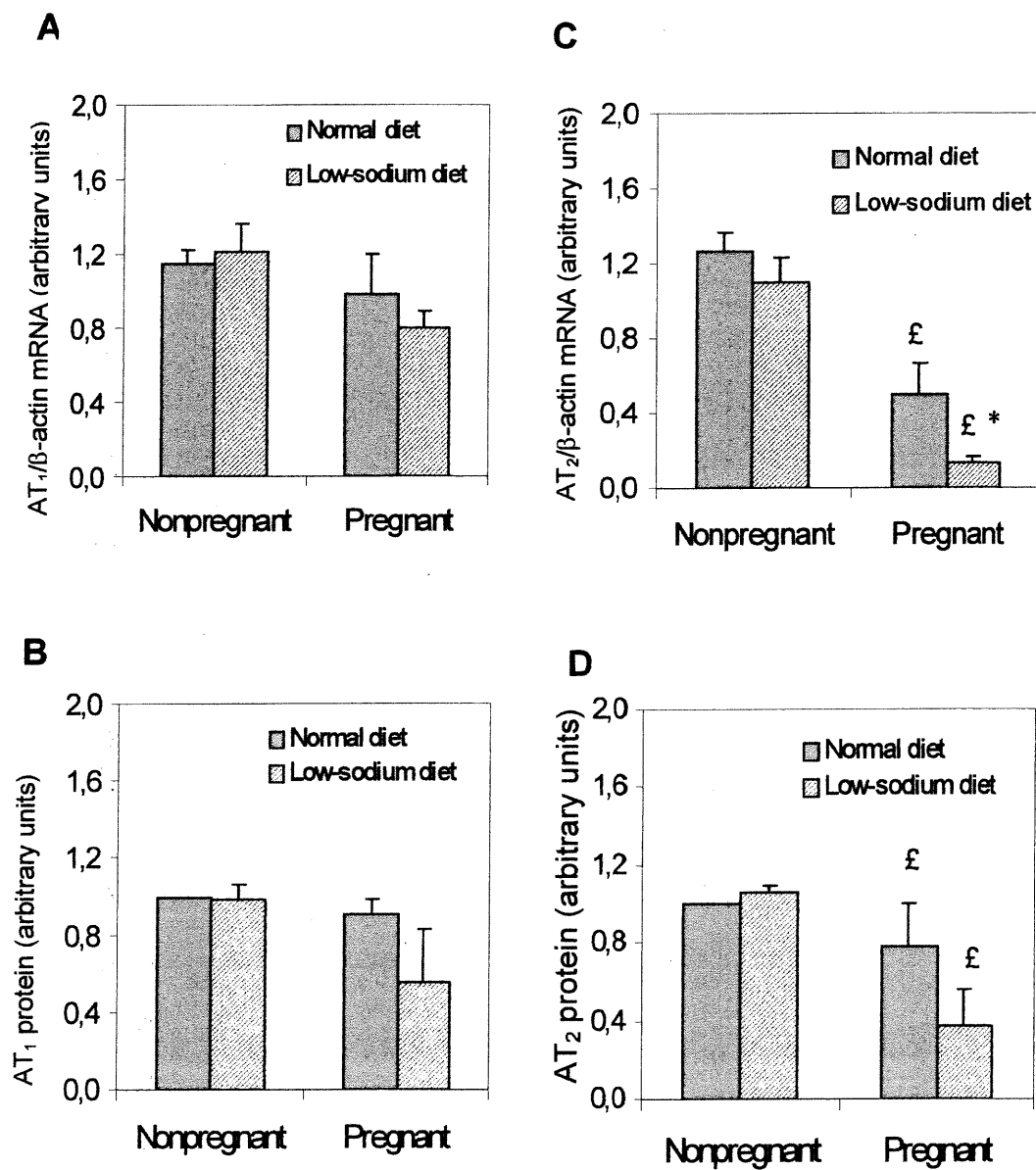


FIGURE 4 (KIDNEY)

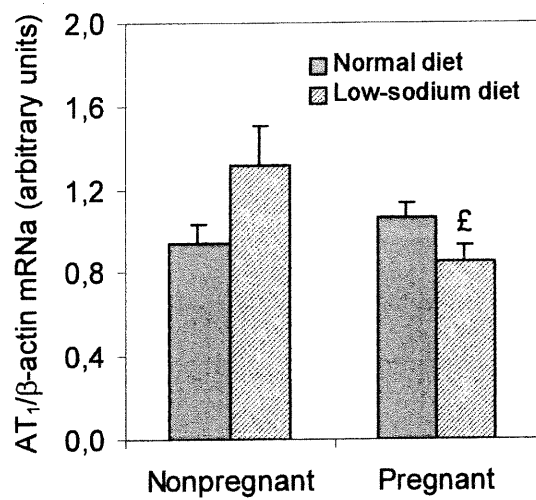
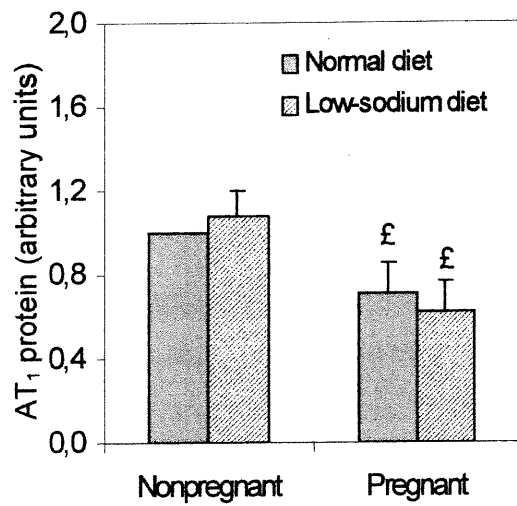
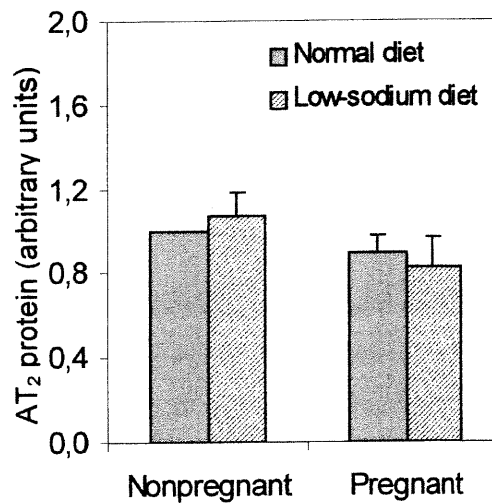
**A****B****C**

FIGURE 5 (UTERINE ARTERY)

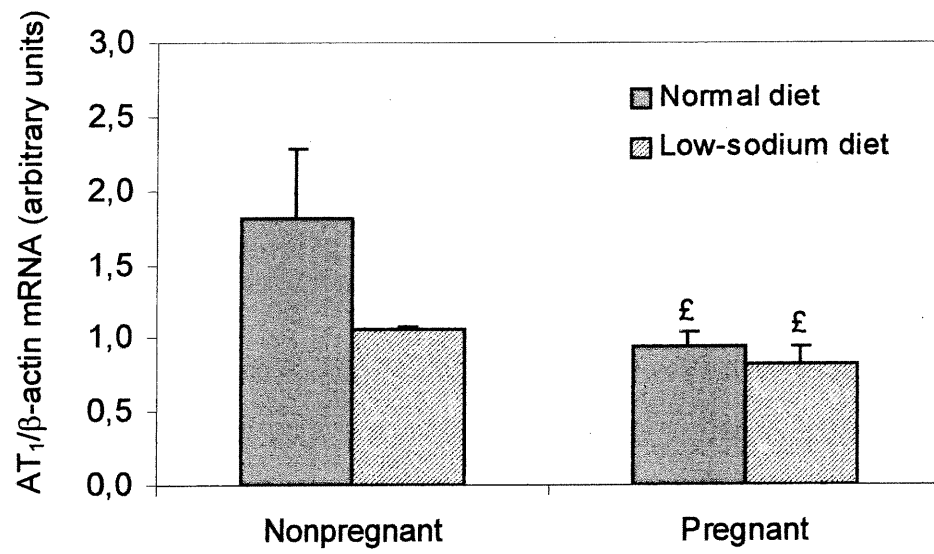
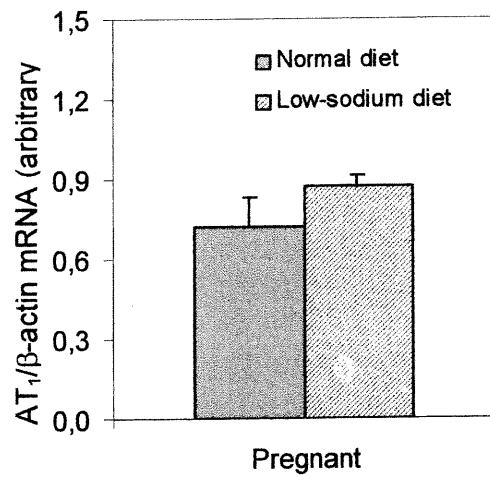
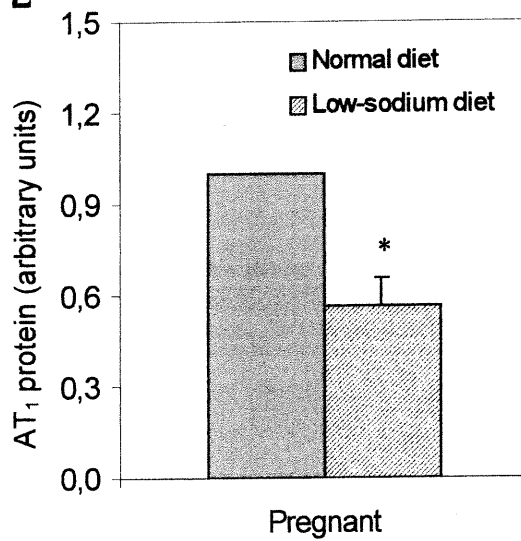


FIGURE 6 (PLACENTA)

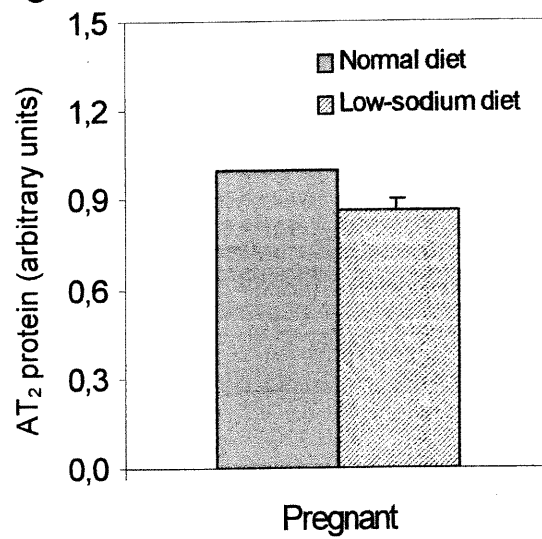
A



B



C



## REFERENCES

1. Chung O, Csikos T, and Unger T. Angiotensin II receptor pharmacology and AT1-receptor blockers. *J Hum Hypertens* 1999 ; 13(suppl I) :S11-20.
2. Alhenc-Gelas F, Tache A, Saint-Andre JP, Milliez J, Sureau C, Corvol P, and Menard J. The renin-angiotensin system in pregnancy and parturition. *Adv Nephro* 1986 ; 15 :25-33.
3. Gant NF, Whalley PJ, Everett RB, Worley R, and MacDonald PC. Control of vascular reactivity in pregnancy. *Am J Kidney Dis* 1994 ; 9 :303-7.
4. Nakamura T, Matsui K, Masaharu I, Yoshimura T, Kawasaki N, Fujisaki, S and Okamura H. Effects of pregnancy and hormone treatments on pressor response to angiotensin II in conscious rats. *Am J Obstet Gynecol* 1988 ; 159 :989-95.
5. Hart, JL. Barium responsiveness of the rat aorta and femoral artery during pregnancy. *Life Sciences* 1982 ; 30 :163-9.
6. Massicotte G, St-Louis J, Parent A, and Schiffrin EL. Decreased in vitro response to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65 :2466-71.
7. Brown GP, and Venuto RC. Angiotensin II receptor alterations during pregnancy in rabbits. *Am J Physiol* 1986 ; 251(1) :E58-64.
8. Cox BE, Word RA, and Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endo Metab* 1996 ; 81(1) :49-58.

9. Bird IM, Zheng J, Cale JE, and Magness RR. Pregnancy induces an increase in angiotensin II type-1 receptor expression in uterine but not systemic artery endothelium. *Endocrinol* 1997 ; 138(1) :490-8.
10. Parent A, Schiffrin EL, and St-Louis J. Receptors for Arg8-vasopressin, angiotensin II, and atrial natriuretic peptide in the mesenteric vasculature of pregnant rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1991 ; 69 :137-44.
11. Massicotte G, Coderr L, Chiasson JL, Thibault G, Schiffrin EL, and St-Louis J. Regulation of ANGII and AVP receptors in isolated hepatocytes of pregnant rats. *Am J Physiol* 1990 ; 258 :E597-605.
12. Forcier I, St-Louis J, and Brochu M. Angiotensin II receptor subtypes in the adrenals of pregnant rats. *Mol Cell Endocrinol* 1995 ; 114 :177-86.
13. Hall JE. The renin-angiotensin system : renal actions and blood pressure regulation. *Compr Ther* 1991 ; 17 :8-17.
14. Douglas J, and Catt KJ. Regulation of angiotensin II receptors in the rat adrenal cortex by dietary electrolytes. *J Clin Invest* 1976 ; 58 :834-43.
15. Lehoux JG, Bird IM, Briere N, Martel D, and Ducharme L. Influence of dietary sodium restriction on angiotensin II receptors in rat adrenals. *Endocrinol* 1997 ; 138 :5238-47.
16. Jo H, Yang EK, Lee WJ, Park KY, Kim HJ, and Park JS. Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. *Regulatory Peptides* 1996 ; 67 :115-21.
17. Schmid C, Castrop H, Reitbauer J, Bruna RD, and Kurtz A. Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. *Hypertens* 1997 ; 29 :923-9.

18. Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999 ; 180 :608-13.
19. Gutkowska J, Boucher R, and Genest J. Dosage radioimmunologique de l'activité rénine plasmatique. *Union Med Can* 1977;106:446-50.
20. Brochu M, Féthière J, Roy B, Ong H, and De Léan A. Highly sensitive and rapid radioimmunoassay for aldosterone in plasma and cell culture medium. *Clin Biochem* 1989;22:289-92.
21. Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thicyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 ; 162 :156-9.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 ; 72 :248-54.
23. Fraker PJ, and Speck JC. Protein and cell iodinations with a sparingly soluble chloroamine, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycolil. *Biochem Biophys Res Commun* 1978 ; 80 :849-57.
24. St-Louis J, Paré H, Sicotte B, and Brochu M. Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am J Physiol* 1997 ; 273 :H1148-53.
25. Tencé M, and Petit A. Characterization of angiotensin II binding sites in the human term placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1989 ; 63 :111-9.
26. Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol Rev.* 1972 ; 52 :468-561.



27. Song K, Allen AM, Paxinos G, and Mendelsohn FAO. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* 1992 ; 316 :467-84.
28. Beresford MJ, and Fitzsimons JT. Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT<sub>1</sub> receptor antagonist, losartan (Dup 753), but not by the AT<sub>2</sub> antagonist, CGP 42112B. *Exp Physiol* 1992 ; 77 :761-4.
29. Hogarty DC, Speakman EA, Puig V, and Phillips MI. The role of angiotensin, AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. *Brain Res* 1992 ; 586 :289-94.
30. Phillips MI, Heininger F, and Toffolo S. The role of brain angiotensin in thirst and AVP release by hemorrhage. *Regulatory Peptides* 1996 ; 66 :3-11.
31. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, and Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type 2 receptor gene in mice. *Nature* 1995 ; 377 :744-7.
32. Bonjour JP, and Malvin RL. Stimulation of ADH by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1970 ; 218 :1555-9.
33. Shelat SG, Reagan LP, King JL, Fluharty SJ, and Flanagan-Cato LM. Analysis of angiotensin type 2 receptors in vasopressinergic neurons and pituitary in the rat. *Regulatory Peptides* 1998 ; 73 :103-12.
34. Quadri F, Culman J, Veltmar A, Maas K, Rascher W, and Unger T. Angiotensin II-induced vasopressin release is mediated through alpha-1

- adrenoreceptor and angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors in the supraoptic nucleus. *J Pharmacol Exp Ther* 1993 ; 267 :567-74.
35. Höhle S, Culman J, Boser M, Quadri F, and Unger T. Effect of angiotensin AT<sub>2</sub> and muscarinic receptor blockade on osmotically induced vasopressin release. *Eur J Pharmacol* 1996 ; 300 :119-23.
36. Durr JA, Stamoutsos B, and Lindheimer MD. Osmoregulation during pregnancy in the rat: Evidence for resetting of the threshold for vasopressin secretion during gestation. *J Clin Invest* 1981 ; 68 :337-46.
37. Seltzer A, Pinto JEB, Viglione PN, Correa FMA, Libertum C, Tsutsumi K, Steele MK, and Saavedra JM. Estrogens regulate angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in female rat anterior pituitary. *Neuroendocrinol* 1992 ; 55 :460-7.
38. Ouali R, Berthelon M-C, Bégeot M, and Saez JM. Angiotensin II receptor subtypes AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> are down-regulated by angiotensin II through AT<sub>1</sub> receptor by different mechanisms. *Endocrinol* 1997 ; 138 :725-33.
39. Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P, and Gasc J-M. Expression of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 1995 ; 268 :F922-30.
40. Ruan X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A, and Arendshorst WJ. Regulation of angiotensin II receptor AT<sub>1</sub> subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 1997 ; 99 :1072-81.

41. Cox BE, Rosenfeld CR, Kalinyak JE, Magness RR, and Shaul PW. Tissue specific expression of vascular smooth muscle angiotensin II receptor subtypes during ovine pregnancy. *Am J Physiol* 1996 ; 271 :H212-21.
42. Burrell JH, and Lumbers ER. Angiotensin receptor subtypes in the uterine artery during ovine pregnancy. *Eur J Pharmacol* 1997 ; 330 :257-67.
43. Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, and Ahmed A. Cellular localization of AT (1) receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 1998 ; 101 :442-54.
44. Kalenga MK, de Gasparo M, Thomas K, and Hertogh R. Angiotensin II induces human placental lactogen and pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein secretion via an angiotensin AT<sub>1</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 268 :231-6.

### ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec and Medical Research Council of Canada. S.B. received a studentship from FCAR-FRSQ. M.B. is a scholar from Fonds de la Recherche en santé du Québec. The authors thank respectively Dr Kathy Griendling and Dr Gaétan Guillemin for the plasmid containing AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> using in molecular experiments.

## **4. DISCUSSION**

Dans notre laboratoire, en voulant étudier le rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) au cours de la gestation, un modèle de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) chez le rat a été découvert de manière fortuite. Sachant que le SRAA est stimulé au cours de la gestation normale, les collègues qui m'ont précédée ont voulu déterminer l'effet d'une stimulation supplémentaire du SRAA. Pour ce faire, une diète faible en sodium a été donnée à des rates pour la dernière semaine de gestation. Ils ont observé que, malgré une stimulation très accrue du SRAA, la baisse de pression artérielle, caractéristique de la gestation normale, est toujours présente. Cependant, l'expansion volumique normalement observée au cours de la gestation ne survient pas, et ces rates ont donné naissance à des ratons de petits poids. Le modèle de RCIU était ainsi établi. Le but de mon travail était donc de mieux caractériser ce modèle. Étant donné qu'une diminution du volume plasmatique était présente, un regard particulier devait être accordé à la physiologie rénale. De plus, considérant la grande stimulation du SRAA, l'étude des récepteurs de l'angiotensine II ( $AT_1$  et  $AT_2$ ) s'avéraient d'un intérêt majeur. Nous voulions savoir de quelle façon ces récepteurs étaient modulés pour tenter de répondre à la concentration plasmatique élevée d'angiotensine II (All)?

L'All et l'aldostérone, stimulées lors de la gestation, sont associées à la rétention de sodium observée durant la grossesse<sup>77</sup>. Parallèlement à cette rétention sodique, une expansion du volume plasmatique survient dans l'organisme maternel<sup>103</sup>. Ainsi, nous avons étudié les récepteurs d'All dans

l'hypothalamus, l'hypophyse, le rein et le cortex surrénalien qui, par le biais de l'Angiotensin II (Ang II), sont des tissus cibles impliqués dans le contrôle du volume.

Une régulation différente du volume survient durant la gestation chez le rat<sup>5</sup>. La rate gestante normale boit davantage d'eau puisque son seuil de la soif est diminué, ce qui stimule l'ingestion d'eau et contribue, en partie, à l'augmentation du volume plasmatique<sup>31,32</sup>. Par le fait même, l'hypothalamus est impliqué dans la stimulation de la soif, principalement via l'action de l'Ang II avec le récepteur AT<sub>1</sub><sup>104</sup>. Nous avons ainsi démontré, dans ce tissu, que la gestation augmente l'expression du récepteur AT<sub>1</sub>. Ceci pourrait expliquer l'augmentation d'eau ingérée chez la rate gestante, suggérant une stimulation du centre de la soif par l'activation du SRAA. Toutefois, l'étude de la protéine AT<sub>1</sub> dans l'hypothalamus serait plus significative pour apporter des conclusions, car la protéine est étroitement liée à l'action biologique de l'Ang II. À l'opposé, dans notre modèle de RCIU, une contraction volumique est observée malgré l'activation accrue du SRAA<sup>6</sup>. Donc, nous anticipons une stimulation du centre de la soif dans notre modèle de RCIU puisque ces rates doivent retenir l'eau pour tenter de contrebalancer la contraction volumique. Cependant, les rates gestantes recevant la diète faible en sodium boivent moins que les rates gestantes recevant la diète normale. Ainsi, aucune modification des récepteurs AT<sub>1</sub> était attendue dans l'hypothalamus du modèle RCIU. Tel que prévu, il n'y a aucune différence dans les niveaux d'ARNm de l'AT<sub>1</sub> entre les deux groupes de rates gestantes. Cette absence de contrôle des récepteurs d'Ang II pourrait expliquer, en partie, le fait que le

modèle RCIU ne boive pas plus que leur témoin. En plus de l'All, l'hypovolémie représente un stimulus pour la soif<sup>104</sup>. Toutefois, nous avons noté une diminution de la soif au cours des derniers jours de la gestation chez ces rates comparées aux gestantes normales. Par conséquent, d'autres mécanismes contrôlant la soif, le niveau des électrolytes et des hormones, de même que le volume pourraient jouer un rôle dans cette diminution d'eau ingérée. De plus, la susceptibilité d'accouchement prématuré, observée dans notre modèle de RCIU, pourrait activer des mécanismes qui diminueraient l'urgence de boire chez ces rates.

L'altération de l'osmorégulation est un autre changement physiologique induit par la gestation. En effet, l'hyponatrémie associée à la gestation résulte en une rétention massive de l'eau. Parallèlement, l'osmolalité plasmatique est réduite, et conjointement avec l'expansion volumique, ces modifications physiologiques expliquent la diminution d'urée plasmatique durant la gestation<sup>30</sup>. De plus, un niveau de vasopressine (AVP) suffisant doit être présent pour permettre la rétention d'eau contribuant à l'expansion volumique.

La présence de récepteurs d'All est observée dans l'hypophyse, cette glande sécrétrice de l'AVP qui est en partie stimulée par l'All<sup>105</sup>. Une augmentation des niveaux d'ARNm de l'AT<sub>1</sub> fut donc observée dans l'hypophyse de rates gestantes, toutefois les niveaux de protéines AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ne furent pas modifiés. On sait que les niveaux plasmatiques d'oestrogènes



sont élevés durant la grossesse, et justement il a été démontré que les œstrogènes peuvent moduler l'expression des récepteurs d'Ang II dans l'hypophyse antérieure de rat <sup>106</sup>. Ainsi, les œstrogènes pourraient être l'un des facteurs participant à cette hausse de l'ARNm de l'AT<sub>1</sub> lors d'une gestation normale. De plus, l'augmentation d'AVP lors de la gestation impliquerait possiblement d'autres mécanismes qui travailleraient conjointement avec le récepteur AT<sub>1</sub>, étant donné que les niveaux de protéines sont inchangés. Nous croyons que l'étude de l'ARNm est davantage indicateur comparativement à l'étude de la protéine qui semble plus révélateur, puisque cette dernière est associée à l'action physiologique produite par l'hormone.

Dans notre modèle de RCIU, l'osmorégulation est perturbée par la diète faible en sodium. Ces rates gestantes n'arrivent pas à réaliser l'expansion volumique normalement observée lors de la gestation <sup>6</sup>. Donc, nous suggérons que les niveaux plasmatiques d'AVP doivent être élevés pour retenir l'eau, et maintenir un gradient de concentration d'urée à l'intérieur de la médullaire interne rénale qui permet une réabsorption d'eau. En effet, chez les rates gestantes avec une diète restreinte en sodium, on observe une accumulation d'urée plasmatique qui reflète une rétention d'eau et d'urée tous deux tentant de contrebalancer la contraction volumique. De plus, cette urémie est secondaire à l'insuffisance rénale fonctionnelle. Nous avons également observé, dans notre modèle de RCIU, que l'expression de l'AT<sub>1</sub> n'était pas affectée dans l'hypophyse, contrairement à une réduction des

niveaux de protéines AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Cette diminution des niveaux de protéines AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> suggère que l'augmentation d'AVP plasmatique, dans notre modèle, serait stimulée par des mécanismes de sécrétion d'AVP sensible au volume, mais indépendants des effets de l'All sur l'hypophyse. En effet, Philips et al.<sup>107</sup> suggère que la voie de la relâche de l'AVP, suite à une hypovolémie, soit reliée à un système de baroréflexe indépendant de l'All et ses récepteurs.

Un autre facteur impliqué dans la rétention d'eau est l'aldostérone. En effet, l'élévation de l'aldostérone durant la grossesse semble coïncider avec le début de la rétention d'eau maternelle<sup>78</sup>. Ce haut taux d'aldostérone maternel pourrait expliquer l'hypokaliémie normalement observée chez la rate gestante. En effet, l'aldostérone entraîne la réabsorption du sodium, et conséquemment favorise l'excrétion du potassium. Il est connu que l'aldostérone est sécrétée par la zone glomérulée du cortex surrénalien suite à la liaison de l'All au récepteur AT<sub>1</sub><sup>88</sup>. Déjà démontré par notre groupe auparavant<sup>67</sup>, nous avons confirmé que la gestation n'affectait pas les niveaux d'ARNm et de protéine du récepteur AT<sub>1</sub> dans le cortex surrénalien. Toutefois, une diminution du récepteur AT<sub>2</sub> fut observée chez les rates gestantes. Ceci suggère que l'hyperaldostéronémie, observée chez les rates gestantes, ne pourrait être expliquée par une augmentation des AT<sub>1</sub> dans la zone glomérulée, mais plutôt expliquée par une diminution des AT<sub>2</sub>. En effet, cette diminution des récepteurs AT<sub>2</sub> pourrait privilégier la disponibilité de l'All

pour sa liaison au récepteur  $AT_1$ , et stimuler la sécrétion d'aldostérone observée durant la gestation.

Dans notre modèle de RCIU, une forte augmentation de la sécrétion d'aldostérone est observée, toutefois une hyperkaliémie est observée. Nous proposons que cette hyperkaliémie résulte d'une réduction aiguë du sodium livré au tubule rénal distal pour la réabsorption, réduisant ainsi l'excrétion potassique. Nous avons démontré que le récepteur  $AT_1$  n'est pas affecté dans le cortex surrénalien du modèle RCIU comparé à une gestation normale, cependant les niveaux d'ARNm de l' $AT_2$  sont diminués. Tout comme pour la gestation normale, l'augmentation de sécrétion d'aldostérone plasmatique serait régulée par la liaison de l'Ang II à l' $AT_1$ , conséquemment à une diminution des  $AT_2$ . De plus, un haut niveau de potassium plasmatique pourrait participer à cette hausse accrue de sécrétion d'aldostérone dans notre modèle de RCIU. En effet, Schneider et al.<sup>108</sup> suggère que cette augmentation de potassium plasmatique contribuerait à la stimulation de la production d'aldostérone observé durant la gestation.

De concert avec l'aldostérone, l'Ang II se lie aux récepteurs d'Ang II (surtout  $AT_1$ ) rénaux pour promouvoir la réabsorption d'eau et de sodium<sup>51</sup>. Durant la gestation, l'expansion volumique amène une augmentation du volume plasmatique rénale, laquelle est associée à une hausse gestationnelle du taux de filtration glomérulaire<sup>24</sup>. Ainsi, des changements de réabsorption rénale sont observés pour réaliser cette réabsorption intense de sodium durant la

gestation<sup>28,109</sup>. Nous anticipions donc, une hausse des récepteurs AT<sub>1</sub> rénaux pour expliquer l'expansion du volume plasmatique de même que la réabsorption accrue de sodium. Toutefois, on a noté une diminution significative des niveaux de protéine AT<sub>1</sub>, ce qui opposé à l'augmentation des récepteurs AT<sub>1</sub> anticipée pour expliquer l'élévation du volume plasmatique durant la gestation. Ceci suggère que d'autres facteurs ou mécanismes physiologiques, tels que l'AVP et l'aldostérone, seraient impliqués dans la rétention d'eau.

Dans le modèle de RCIU, un haut niveau plasmatique de créatinine est présent, ce qui reflète une diminution du taux de filtration glomérulaire engendrée par la contraction du volume plasmatique. Les niveaux d'ARNm et de protéine des deux sous-types de récepteur d'Ang II n'étaient pas différents dans notre modèle de RCIU comparé à une gestation normale. Cependant, la sous-régulation des AT<sub>1</sub> dans le modèle RCIU, comparativement aux rates non-gestantes recevant la diète faible en sodium, pourrait expliquer partiellement une filtration glomérulaire diminuée et une altération dans la réabsorption du sodium observées chez les rates gestantes avec une restriction sodique. De plus, le modèle RCIU devrait réabsorber une plus grande quantité de sodium comparé aux rates non-gestantes avec la diète pauvre en sel. En effet, en plus du maintien de l'homéostasie, les rates gestantes doivent augmenter leur volume circulant pour assurer une bonne croissance fœtale. Toutefois, l'excrétion sodique des rates gestantes ne diffère pas de celle des rates non-gestantes. Ceci suggère donc que la

contraction volémique relative chez les gestantes serait secondaire à un manque de réabsorption de sodium dû au fait que le rein aurait atteint sa capacité maximale de réabsorption du sodium.

Ces altérations rénales suggèrent un réajustement des fonctions rénales maternelles dans le modèle RCIU, et nous conduisent au diagnostic d'une insuffisance rénale pré-rénale (ou dite fonctionnelle). Il est à noter que l'absence d'expansion volumique observée dans notre modèle de RCIU correspond à ce qui a été démontré chez l'humain par l'équipe de Duvekot <sup>102</sup>. En effet, ces auteurs suggèrent que les mécanismes compensatoires maternels sont incapables de déclencher une réponse volumique compensatrice convenable lors de grossesse anormale, tel que dans les cas de RCIU.

Notre étude sur l'administration d'une diète faible en sodium chez des rates gestantes est en accord avec l'abandon de cette pratique obstétricale chez l'humain. En effet, dans l'hypertension de grossesse chez la femme, où une diminution du volume circulant est observée <sup>110</sup>, une diète faible en sodium était donné comme traitement <sup>111</sup>. Cependant, plusieurs études ont montré qu'une restriction sodique alimentaire ne réduisait pas l'hypertension gestationnelle <sup>112</sup>. Nous sommes en accord avec cette affirmation. De plus, notre diète faible en sodium a entraîné la naissance de bébé de petit poids chez nos rates gestantes. Ainsi, par l'étude de notre modèle de RCIU, nous

allons fournir des renseignements supplémentaires sur les effets nuisibles de ce type de diète sur le devenir du fœtus.

En second lieu, l'observation de rats de petit poids, suite à une diète faible en sodium chez les rates gestantes, a suscité notre curiosité. En effet, le poids de l'unité fœto-placentaire, dans le modèle RCIU, est réduit comparativement à une gestation normale. Une réduction du poids fœtal et placentaire <sup>6</sup>, de même qu'un rétrécissement du diamètre des artères utérines, peuvent expliquer cette diminution de l'unité fœto-placentaire. Nous avons également observé qu'une diète faible en sodium, donnée à une rate gestante, entraîne une susceptibilité d'accouchement prématuré. Challis et al.<sup>113</sup> suggèrent que la prématurité pourrait être déclenchée par des signaux de détresse fœto-placentaire, tel une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien fœtal. En effet, nos fœtus avec RCIU ont un taux de corticostérone élevé comparé à ceux issus d'une gestation normale. Ceci pourrait déclencher l'accouchement comme déjà démontré chez la brebis <sup>113</sup>.

Il est bien connu que la vasculature utérine est d'une grande importance pour le flot sanguin utéro-placentaire. Nous avons démontré une baisse de l'expression de l'AT<sub>1</sub> chez la rate gestante normale. Toutefois, le diamètre des artères utérines est augmenté lors de la gestation afin de permettre un flot utéro-placentaire abondant pour une bonne croissance fœtale. Probablement que l'augmentation du flot utéro-placentaire va exercer une pression sur la paroi vasculaire entraînant une relâche d'oxide nitrique,

ce dernier agissant comme vasodilatateur. Ainsi, cette relâche d'oxide nitrique conduirait à l'expansion des artères utérines. Cependant, nous croyons fortement que des facteurs de croissance seraient principalement impliqués dans l'hyperplasie/hypertrophie observée dans la paroi d'artère utérine de rates gestantes. Ces facteurs de croissance, probablement originant de l'ovaire, de l'utérus, du placenta ou du fœtus, aurait une action spécifique sur les artères utérines étant donné qu'uniquement ces vaisseaux sont modifiés pendant la gestation. Contrairement à la gestation normale, aucune altération des niveaux d'ARNm de l'AT<sub>1</sub> fut notée dans le modèle de RCIU. Cependant, une diminution du diamètre des artères utérines est observée comparée aux rates gestantes recevant la diète normale. Présentement, nous ne pouvons relier le récepteur AT<sub>1</sub> à la modification du diamètre de l'artère utérine. Nous pouvons toutefois suggérer qu'une modification de la vasculature utérine pourrait avoir un impact sur le flot sanguin parvenant au fœtus, et affecter la croissance fœtale.

Au niveau de la croissance fœtale, le placenta est essentiel pour les échanges entre la mère et le fœtus, et la présence de récepteurs d'All y a été notés <sup>114</sup>. En effet, il fut démontré que l'All, via AT<sub>1</sub>, stimule la production du lactogène placentaire humain (hPL) <sup>115</sup> lequel agit directement sur la croissance du fœtus, ou en stimulant le facteur de croissance IGF-1 qui est impliqué dans la croissance fœtale. Dans notre modèle de RCIU, nous avons démontré une diminution de la quantité de protéine AT<sub>1</sub> ce qui pourrait conduire à une baisse d'hormone de croissance placentaire, et affecter la croissance fœtale. Li et al <sup>116</sup> ont suggéré l'existence d'une interaction entre

les récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  dans les trophoblastes, et une diminution des  $AT_1$  dans le placenta de RCIU pourrait, en partie, rendre compte d'une fonction placentaire faible.



## **5. CONCLUSION**

Des adaptations hémodynamiques maternelles et de profonds changements physiologiques prennent place au cours de la grossesse pour assurer l'évolution normale de la mère et du fœtus. En effet, durant la grossesse, on retrouve une activation du SRA de même que des taux élevés d'aldostérone plasmatique qui contribuent à l'accumulation sodique gestationnelle. Notre groupe a observé une activation supplémentaire du SRAA en donnant une diète restreinte en sodium à des rates durant la dernière semaine de gestation. De plus, cette diète induit une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). Un modèle animal de RCIU était ainsi développé où une contraction volumique est observée malgré l'augmentation du SRAA. Afin de mieux caractériser notre modèle de RCIU, nous avons étudié l'homéostasie maternelle de même que le SRA et les récepteurs d'All. Ainsi, nous avons voulu faire un parallèle entre les fonctions biologiques de l'All et la modulation des récepteurs d'All dans certains tissus cibles.

Nous avons comparé les effets d'une diète faible en sodium sur l'équilibre hydrique et électrolytique dans l'organisme maternel. L'observation d'altérations physiologiques dans notre modèle de RCIU supporte le diagnostic d'une insuffisance rénale pré-rénale (ou dite fonctionnelle). Nous suggérons donc, que les rates gestantes sont plus sensibles que les rates non-gestantes à la restriction sodique, et que la réponse physiologique pour compenser la contraction volumique est amplifiée durant la gestation, toutefois elle est incapable de prévenir la RCIU.

L'activation supplémentaire du SRAA dans notre modèle de RCIU, nous a également dirigé vers l'étude des récepteurs d'Angiotensin II (Ang II). Nos résultats ont démontré que la gestation entraîne une modulation, spécifique au tissu, des récepteurs d'Ang II, laquelle est différente dans le modèle de RCIU. Nous suggérons que ces altérations, comparées à une gestation normale, puissent être corrélées aux changements physiologiques et morphologiques associés à la RCIU. Toutefois, cette étude descriptive des récepteurs d'Ang II ne nous permet pas de nous avancer quant à leur implication spécifique dans la RCIU.

Nous concluons donc que des changements dans la modulation des récepteurs d'Ang II, de concert avec des réponses physiologiques modifiées, puissent être associés à une RCIU, et que ce modèle nous permettra de mieux comprendre l'impact du volume plasmatique, du SRA et du débit utéroplacentaire sur le fœtus souffrant de RCIU.

## 6. Bibliographie

1. Dowell RT, and Kauer CD. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1997 ; 19(9):613-25.
2. St-Louis J, Paré H, and Brochu M. Increased reactivity of uterine artery of the rat throughout gestation and post-partum. *Am J Physiol* 1997 ; 273 :H1148-53.
3. Cipolla M, and Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* 1994 ; 171:805-11.
4. Whittaker PG, and Lind T. The intravascular mass of albumin during human pregnancy : A serial study in normal and diabetic women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993 ; 100 :587-92.
5. Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Diseases* 1987 ; 9(4):296-302.
6. Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999 ; 180 :608-13.
7. Barron WM, Stamoutsos BA, and Lindheimer MD. Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. *J Clin Invest* 1984 ; 73:923-32.
8. Chesley LC. Plasma and red cell volumes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1972 ; 112:440-50.
9. Lund CJ, and Donovan JC. Blood volume during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1967 ; 98:393-403.

10. Slangen BFM, Out ICM, Verkeste CM, and Peeters LLH. Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol* 1996 ; 270:H1779-84.
11. Duvekot JJ. Early pregnancy changes in hemodynamics and volume homeostasis are consecutive adjustments triggered by a primary fall in systemic vascular tone. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 169(6):1382-92.
12. Hannedouche T. Nephrohus Online, [En ligne] [http://www.nephrohus.org/3\\_cycle\\_folder/hta\\_physio\\_grossesse.html](http://www.nephrohus.org/3_cycle_folder/hta_physio_grossesse.html) (consulté le 10 juillet 2000).
13. St-Louis J, and Massicotte G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 1985 ; 37:1351-7.
14. Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Oeyon PV, Papera S, Sealey JE, and Lagagh JH. Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Medecine* 1980 ; 68 :97-104.
15. Blizard DA, and Folk TG. Resource sharing in rat gestation : role of maternal cardiovascular hemodynamics. *Am J Physiol* 1990 ; 258(6 Pt 2):R1299-307.
16. Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy : A hypothesis of endocrinological control. *Am J Physiol* 1983 ; 245:R720-9.
17. Schrier RW, and Briner VA. Peripheral arterial vasodilatation hypothesis of sodium and water retention in pregnancy : Implications for pathogenesis of preeclampsia-eclampsia. *Obstet Gynecol* 1991 ; 77:632-9.

18. Conrad KP, Morganelli PM, Brinck-Johnsen T, and Colpoys MC. The renin-angiotensin system during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Obstet Gynecol* 1989 ; 161:1065-72.
19. Massicotte G, St-Louis J, Parent A, and Schiffrin EL. Decreased in vitro response to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987 ; 65:2466-71.
20. Tortora GJ, and Grabowski SR. Le système urinaire. In : *Principes d'anatomie et de physiologie*. CEC editor, 1994. p. 920-63.
21. Guyton AC, and Hall JE. Urine formation by the kidney. In : *Textbook of medical physiology*. 9 ed, Saunders editor, 1996. p. 315-48.
22. Guyton AC, and Hall JE. Regulation of extracellular fluid osmolarity and sodium concentration. In : *Textbook of medical physiology*. 9 ed, Saunders editor, 1996. p. 349-65.
23. Davison JM. Overview : Kidney function in pregnant women. *Am J Kidney Diseases* 1987 ; 9(4):248-52.
24. Baylis C. The determinants of renal hemodynamics in pregnancy. *Am J Kidney Diseases* 1987 ; 9(4):260-4.
25. Alexander EA, Churchill S, and Bengel HH. Renal hemodynamics and volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Kidney Int* 1980 ; 18:173-8.
26. Atherthon JC, and Pirie SC. The effect of pregnancy on glomerular filtration rate and salt and water reabsorption in the rat. *J Physiol* 1981 ; 319:153-64.

27. Baylis C. The mechanism of the increase in glomerular filtration rate in the twelve-day pregnant rat. *J Physiol* 1980 ; 305:405-14.
28. Green R, and Hatton TM. Renal tubular function in gestation. *Am J Kidney Diseases* 1987 ; 9(4):265-9.
29. Churchill SE, Bengel HH, and Alexander EA. Sodium balance during pregnancy in the rat. *Am J Physiol* 1980 ; 239:R143-8.
30. Lindheimer MD, Barron WM, Durr J, and Davison JM. Water homeostasis and vasopressin release during rodent and human gestation. *Am J Kidney Diseases* 1987 ; 9(4):270-5.
31. Durr JA, Stamoutsos B, and Lindheimer MD. Osmoregulation during pregnancy in the rat: Evidence for resetting of the threshold for vasopressin secretion during gestation. *J Clin Invest* 1981 ; 68:337-46.
32. Davison JM, Gilmore EA, Durr J, Robertson GL, and Lindheimer MD. Altered osmotic thresholds for vasopressin secretion and thirst in human pregnancy. *Am J Physiol* 1984 ; 246:F105-9.
33. Inagami T. The renin-angiotensin system. *Essays in biochemistry* 1994 ; 28 :147-64.
34. Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, and Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes : Characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front in Neuroendocrinology* 1993 ; 14(2) :123-71.
35. Samani NJ, Swales JD, and Brammar WJ. Expression of the renin gene in extra-renal tissues of the rat. *J Biochem* 1988 ; 253 :907-10.

36. Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, and Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 1987 ; 120 :2334-8.
37. Dzau VJ. Mechanism of action of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure. *Drugs* 1990 ; 39(suppl 2) :11-6.
38. Phillips MI, Weyhenmeyer J, Felix D, Ganten D, and Hoffman WE. Evidence for an endogenous brain renin-angiotensin system. *Federation Proc* 1979 ; 38 :2260-6.
39. Wilkes BM, Krim E, and Mento PF. Evidence for a functional renin-angiotensin system in full-term fetoplacental unit. *Am J Physiol* 1985 ; 249 :E366-73.
40. Peach MJ, and Dostal DE. The angiotensin II receptor and the action of the angiotensin II. *J Cardiovascular Pharmacol* 1990 ; 16(suppl 4) :S25-30.
41. Chassagne C, Servant MJ, and Meloche S. Récepteurs de l'angiotensine II : rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal. *Medecine/Sciences* 1996 ; 12 :1351-60.
42. Peach MJ. Molecular actions of angiotensin. *Biochemical Pharmacology* 1981 ; 30(20) :2745-51.
43. Chiu AT, Leung KH, Smith RD, Timmermans PB. Defining angiotensin receptor subtypes. In Raizada MK, Phillips MI, Sumners C, Eds. *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Boca Raton, FL :CRC Press 1993 ; 245-71.



44. Chaki S, Inagami T. Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 182 :388-94.
45. Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth, and Krebs LT. AT4 receptors : specificity and distribution. *Kidney Int* 1994 ; 46 :1510-2.
46. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, and Harding JW. The angiotensin IV system : functional implications. [Review 169 ref] *Front in Neuroendocrinology* 1995 ; 16 :23-52.
47. Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992 ; 6 :1113-8.
48. Murphy TJ, Alexander WR, Griending KK, Runge MS, and Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-I angiotensin II receptor. *Nature* 1991 ; 351 :253-6.
49. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda T, and Inagami Y. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991 ; 351 :230-3.
50. Zhou J, Ernsberger P, Douglas JG. Angiotensin II receptor subtypes in rat renal mesangial cells [abstract]. *J FASEB* 1991 ; 5 :A870.
51. Chung Oliver, Kühl H, Stoll M, and Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int* 1998 ; 54(suppl 67) :S95-99.
52. James RI, Menaya J, Hudson K, Devalia V, Ryves J, Evans FJ, Thomas S, Clemens MJ. Role of protein kinase C in induction of gene expression

- and inhibition of cell proliferation by interferon alpha. *Eur J Biochem* 1992 ; 209: 813-22.
53. Kawahara Y, Sunako M, Tsuda T, Fukuzaki H, Fukumoto Y, and Takai Y. Angiotensin II-induced expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 150 :52-9.
54. Matsusaka T, and Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol* 1997 ; 59 :395-412.
55. Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman, and TM. Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol* 1998 ; 274 :F43-50.
56. Matsusaka T, Nishimura H, Utsunomiya H, Kakuchi J, Niimura F, Inagami T, Fogo A, and Ichikawa I. Chimeric mice carrying 'regional ' targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene : Evidence against the role for local angiotensin in the in vivo feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 1996 ; 98 :1867-77.
57. Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, and Ichikawa I. Targeting deletion of angiotensin type 1b receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 1997 ; 272 :F299-304.
58. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Susamura H, Pratt RE, and Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993 ; 268 :24539-42.

59. Chassagne C, Beatty BG, and Meloche S. Assignment of the human angiotensin-II type 2 receptor gene (AGTR2) to chromosome Xq22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1995 ; 25 :601-3.
60. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, and Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993 ; 268 :24543-6.
61. Yamada T, Horiuchi M, and Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 :156-60.
62. Carey RM, Wang Z-Q, and Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000 ; 35(part2) :155-63.
63. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, and Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 1995 ; 377 :744-7.
64. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, and Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995 ; 377 :748-50.
65. Chang RSL, and Lotti VJ. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues : relative distribution and species dependency. *Life Sciences* 1991 ; 49 :1485-90.

66. Balla T, Baukal AJ, Eng S, and Catt KJ. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol Pharmacol* 1991 ; 40 :401-6.
67. Forcier I, St-Louis J, and Brochu M. Angiotensin II receptor subtypes in the adrenals of pregnant rats. *Mol Cell Endocrinol* 1995 ; 114 :177-86.
68. Ruan X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A, and Arendshorst WJ. Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 1997 ; 99 :1072-81.
69. Zhuo J, Alcorn D, Harris PJ, and Mendelsohn FAO. Localization and properties of angiotensin II receptors in rat kidney. *Kidney int* 1993 ; 44(suppl 42) :S40-6.
70. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, and Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 1991; 88 :921-33.
71. Aguilera G, Kapur S, Feuillan PP, Sunar-Akbasak B, and Bathia AJ. Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int* 1994 ; 46 :973-9.
72. Cox BE, Rosenfeld CR, Kalinyak JE, Magness RR, and Shaul PW. Tissue specific expression of vascular smooth muscle angiotensin II receptor subtypes during ovine pregnancy. *Am J Physiol* 1996 ; 271 :H212-21.
73. McKinley MJ, McAllen RM, Pennington GL, Smardencas A, Weisinger RS, and Oldfield BJ. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1

- and AT<sub>2</sub> receptors in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996 ; Suppl 3 :S99-104.
74. Magness RR, Cox K, Rosenfeld CR, and Gant NF. Angiotensin II metabolic clearance rate and pressor responses in nonpregnant and pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1994 ; 171 :668-79.
75. Whipp GT, Coghlan JP, Shulkes AA, Skinner SL, and Wintour EM. Regulation of aldosterone in the rat : effect of oestrous cycle, pregnancy and sodium status. *Aust J Exp Biol* 1978 ; 56 :545-51.
76. Brochu M, Gauvin J-P, and St-Louis J. Increase of aldosterone secretion in adrenal cortex suspension derived from pregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996 ; 212 :148-53.
77. Alhenc-Gelas F, Tache A, Saint-Andre JP, Milliez J, Sureau C, Corvol P, and Menard J. The renin-angiotensin system in pregnancy and parturition. *Adv Nephro* 1986 ; 15 :25-33.
78. Smeaton TC, Anderson GJ, and Fulton IS. Study of aldosterone level in plasma during pregnancy. *J Clin Endo Metab* 1977 ; 44 :1-7.
79. Naden RP, and Rosenfeld CR. Effect of angiotensin II on uterine and systemic vasculature in pregnant sheep. *J Clin Invest* 1981 ; 68 :468-74.
80. Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANGII, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 1984 ; 247 :H100-8.
81. August P, Mueller FB, Sealey JE, and Edersheim TG. Role of renin-angiotensin system in blood pressure regulation in pregnancy. *Lancet* 1995 ; 345 :896-7.

82. Parent A, Schiffrin EL, and St-Louis J. Receptors for Arg8-vasopressin, angiotensin II, and atrial natriuretic peptide in the mesenteric vasculature of pregnant rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1991 ; 69 :137-44.
83. Massicotte G, Coderr L, Chiasson JL, Thibault G, Schiffrin EL, and St-Louis J. Regulation of ANGII and AVP receptors in isolated hepatocytes of pregnant rats. *Am J Physiol* 1990 ; 258 :E597-605.
84. Brown GP, and Venuto RC. Angiotensin II receptor alterations during pregnancy in rabbits. *Am J Physiol* 1986 ; 251(1) :E58-64.
85. Cox BE, Word RA, and Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endo Metab* 1996 ; 81(1) :49-58.
86. Bird IM, Zheng J, Cale JE, and Magness RR. Pregnancy induces an increase in angiotensin II type-1 receptor expression in uterine but not systemic artery endothelium. *Endocrinol* 1997 ; 138(1) :490-8.
87. Kalenga M-K, de Gasparo M, De Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, and Thomas K. Human placenta contains only angiotensin II receptor subtype AT1. *Reprod Nutr Dev* 1991 ; 31 :257-67.
88. Lehoux JG, Bird IM, Rainey WE, Tremblay A, and Ducharme L. Both low sodium and high potassium intake increase the level of adrenal angiotensin-II receptor type 1, but not that of adrenocorticotropin receptor. *Endocrinol* 1994 ; 134(2) :776-82.
89. Douglas J, and Catt KJ. Regulation of angiotensin II receptors in the rat adrenal cortex by dietary electrolytes. *J Clin Invest* 1976 ; 58 :834-43.

90. Jo H, Yang EK, Lee WJ, Park KY, Kim HJ, And Park JS. Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. *Regulatory Peptides* 1996 ; 67 :115-21.
91. Schimd C, Castrop H, Reitbauer J, Bruna RD, and Kurtz A. Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. *Hypert* 1997 ; 29 :923-9.
92. Du Y, Yao D, Guo D, Inagami T, and Wang DH. Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat kidney by low dietary sodium. *Hypertension* 1995 ; 25 :872-7.
93. Hall Je. The renin-angiotensin system : renal actions and blood pressure regulation. *Compr Ther* 1991 ; 17 :8-17.
94. Kirksey A, and Pike RL. Some effects of high and low sodium intakes during pregnancy in the rat. *J Nutr* 1962 ; 77 :33-42.
95. Cunningham FG, Macdonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, and Clark SL. Fetal growth restriction. In : Williams, ed. *Obstetrics*. Standford : Appleton et Lange. 1997 ; p. 839-57.
96. Vetenbosche RC, and Kirchner JT. Intrauterine growth retardation. *American Family Physician* 1998 ; 58(6) :1384-90.
97. De Zegher F. Facteurs de la croissance foetale. *Arch Pediatr* 1996 ; 3 (suppl I) :182S-183S.
98. Boulot P, and Giacalone P-L. Retards de croissance intra-utérins. *La revue du praticien* 1995 ; 45 :1751-7.

99. Gabbe SG. Intrauterine growth retardation. In : Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, editors. *Obstetrics : normal et problem pregnancies*. New York : Churchill Livingstone, 1995 ; p. 923-44.
100. Piper JM, Xenakis EMJ, Mc Farlet M, Elliot BD, Berkus M, and Langer D. Do growth-retarded premature infants have different rates of perinatal morbidity et mortality than appropriately grown premature infants. *Obstet Gynecol*. 1996 ; 87 :169-74.
101. Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdès G, and Donoso E. Maternal plasma volume expansion and hormonal change in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1993 ; 81(6) :1029-33.
102. Duvkot JJ, Cheriex EC, Pieters FAA, Menheere PPCA, Schouten HJA, Peeters LLH. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1995 ; 85(3) :361-7.
103. Verkeste CM, Slangen BMF, Dubelaar ML, Van Kreel BK and Peeters LLH. Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rats. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt2) :H1662-66.
104. Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol Rev*. 1972 ; 52 :468-561.
105. Bonjour JP, and Malvin RL. Stimulation of ADH by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1970 ; 218 :1555-9.
106. Seltzer A, Pinto JEB, Viglione PN, Correa FMA, Libertum C, Tsutsumi K, Steele MK, and Saavedra JM. Estrogens regulate angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in female rat anterior pituitary. *Neuroendocrinol* 1992 ; 55 :460-7.



107. Phillips MI, Heining F, and Toffolo S. The role of brain angiotensin in thirst and AVP release by hemorrhage. *Regulatory Peptides* 1996 ; 66 :3-11.
108. Schneider G, and Mulrow PJ. Regulation of aldosterone production during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1973; 92 :1208-15.
109. Atherton JC, Bielinska A, Davison JM, Haddan I, Kay C, and Samuels R. Sodium and water reabsorption in the proximal and distal nephron in conscious pregnant rats and third trimester woman. *J Physiol* 1988; 396 :457-70.
110. Gallery EDM, Hunyor SN, and Gyory AZ. Plasma volume contraction : a significant factor in both pregnancy-associated hypertension (pre-eclampsia) and chronic hypertension in pregnancy. *Q J Med New series* 1979 ; XLVIII :593-602.
111. Mathewson M. Women diagnosed with pregnancy-induced hypertension (pre-eclampsia) should be placed on a sodium restricted diets. *Critical Care Nurse* 1983 ; 3 :114.
112. van Buul BJA, Steegers EAP, van der Maten GD, Delemarre FMC, Jongsma HW, Oosterbaan HP, and de Jong PA. Dietary sodium restriction does not prevent gestational hypertension : a dutch two-center randomized trial. *Hypertens Pregn* 1997 ; 16 :335-46.
113. Challis JRG, and Mitchell BF. Hormonal control of preterm and term parturition. *Seminars in Perinatology* 1981; 5(3) :192-202.
114. Tencé M, and Petit A. Characterization of angiotensin II binding sites in the human term placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1989 ; 63 :111-9.

115. Kalenga MK, de Gasparo M, Thomas K, and Hertogh R. Angiotensin II induces human placental lactogen and pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein secretion via an angiotensin AT<sub>1</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 268 :231-6.
116. Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, and Ahmed A. Cellular localization of AT (1) receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxant. *J Clin Invest* 1998 ; 101 :442-54.

## 7. REMERCIEMENT

Tout d'abord, je tiens à remercier ma famille pour leurs nombreux encouragements. Un merci bien particulier à mon copain Alexandre, qui tout au long de ma maîtrise, m'a supporté en m'écoutant parler de mon projet même s'il ne comprenait pas toujours tout de ces conversations. Ta patience, et tes conseils ont été grandement appréciés.

Un merci très spéciale à la directrice de mes travaux, Dr Michèle Brochu, qui m'a fait partager son amour pour la recherche. Ta détermination et ton dynamisme m'ont démontré que tout est possible lorsque l'on y croit. Tu as été une personne formidable, toujours disponible lorsque j'en avais besoin, bref je pouvais toujours compter sur ta précieuse aide. Je n'oublierai jamais tes bulles roses comme porte bonheur.

Merci à Serge pour son aide technique et Dr Jean St-Louis pour son aide dans mes travaux. Marie-Claude, May, Patrick, Mathieu, Benoit et Annie, je tiens à vous remercier pour votre support, vos conseils, votre amitié et votre joie de vivre qui ont permis d'égayer mes deux années de maîtrise partagées avec vous dans le laboratoire.

Finalement merci à la fondation Ste-Justine de même qu'au FRSQ-FCAR pour les bourses qu'ils m'ont accordées pour la réalisation de mes travaux de maîtrise.

## 8. ÉTAT DE PUBLICATION DES MANUSCRITS

Le 1<sup>er</sup> manuscrit intitulé « **Alteration of maternal body fluids volume and composition in a model of intrauterine growth restriction induced by a low-sodium diet.** » est présentement en préparation et sera soumis d'ici janvier 2001.

Le 2<sup>e</sup> manuscrit intitulé « **Modulation of maternal angiotensin II receptor subtypes in a model of intrauterine growth restriction in rat.** » est présentement en préparation et sera soumis d'ici janvier 2001.