

Université de Montréal

**Effets de suppléments sodiques sur la réactivité vasculaire durant la  
gestation : influence des canaux potassiques et calciques.**

par  
Karine Auger

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès science (M. Sc.)  
en Pharmacologie

mars 2002

© Karine AUGER, 2002



W  
4  
158  
2002  
N. 124

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets de suppléments sodiques sur la réactivité vasculaire durant la  
gestation : influence des canaux potassiques et calciques.**

présenté par :

Karine AUGER

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. René CARDINAL président rapporteur  
Dr. Pierre MOREAU membre du jury  
Dr. Jean ST-LOUIS directeur de recherche

Mémoire accepté le :

## Résumé

Durant la grossesse normale, la pression artérielle et la réactivité vasculaire à plusieurs vasoconstricteurs diminuent. Ces changements hémodynamiques sont renversés durant la prééclampsie, soit une complication grave de la grossesse spécifique à l'humain. Des suppléments sodiques, 0.9% et 1.8% NaCl, administrés à des rates gestantes entraînent des symptômes caractéristiques de la prééclampsie.

Ce nouveau modèle fut utilisé pour caractériser les mécanismes de réactivité vasculaire. Nous nous intéressons à l'activité des canaux potassique et calciques ainsi qu'aux récepteurs de l'endothéline. Des courbes concentration-réponse au tétraéthylammonium furent mesurées. Le tétraéthylammonium induit une contraction des anneaux aortiques seulement chez les rates non gestantes. Les suppléments sodiques n'ont pas induit de réponse au tétraéthylammonium sur les tissus de rates gestantes. Les effets de différents modulateurs de canaux potassiques (cromakalime et NS-1619) et calciques (nifédipine) sur les réponses myotropes à la phényléphrine, au chlorure de potassium et à la vasopressine furent mesurés. Les résultats obtenus suggèrent que chez les rates gestantes recevant des suppléments sodiques, l'activité des canaux  $K_{ATP}$  diminue tandis que celles des canaux  $K_{Ca}$  et des canaux calciques dépendants du voltage augmentent. Des courbes concentration-réponse à l'endothéline-1 furent mesurées en absence et en présence de BQ123. La sarafotoxine fut aussi testée. Les résultats obtenus suggèrent que les suppléments sodiques modulent la sensibilité des  $ET_A$  de façon différente chez les rates non gestantes et gestantes et que les  $ET_B$  sont absents des muscles lisses de l'aorte thoracique. Les changements induits par les suppléments sodiques pourraient être caractéristiques de la prééclampsie.



**Mots Clés**

Grossesse, suppléments sodiques, aorte thoraciques, vasoconstriction, endothéline, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, canaux K<sub>ATP</sub>, canaux K<sub>Ca</sub> et canaux calciques dépendants du voltage.

## Abstract

Normal pregnancy is associated with decreases of arterial blood pressure and of vascular reactivity to vasoconstrictors. These hemodynamic changes are reversed during preeclampsia, a disease specific to human pregnancy. Sodium supplements, 0.9% and 1.8% NaCl, given to pregnant rats induced clinical signs of preeclampsia. This new model was used to characterise the mechanisms of vascular reactivity. We focussed on potassium and calcium channels activity and on endothelin receptors. Concentration-responses curves to tetraethylammonium were measured. Tetraethylammonium induced contractions only on aortic rings of non pregnant rats. Sodium supplements did not restore responses to tetraethylammonium in tissues of pregnant rats. We also measured the effects of different modulators of potassium (cromakalim and NS-1619) and calcium (nifedipine) channels on responses to phenylephrine, potassium chloride and vasopressin. The results suggest that when pregnant rats received sodium supplements,  $K_{ATP}$  channels activity decreased whereas  $K_{Ca}$  channels and voltage-operated calcium channels activity increased. Concentration-responses curves to endothelin-1 were measured in the absence and presence of BQ123. Sarafotoxin-6C was also tested. The results suggested that sensitivity to  $ET_A$  is modulated by sodium supplements in a different way in aorta of non pregnant than of pregnant rats and that  $ET_B$  are absent in smooth muscles of thoracic aorta. Those changes induced by sodium supplements could be characteristics of preeclampsia.

**Key words :**

Pregnancy, sodium supplements, thoracic aorta, vasoconstriction, endothelin, ET<sub>A</sub> receptor, ET<sub>B</sub> receptor, K<sub>ATP</sub> channels, K<sub>Ca</sub> channels, voltage-operated calcium channels

## Table des matières

PAGE DE PRÉSENTATION.....	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN FRANÇAIS.....	iii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN ANGLAIS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Mécanismes des changements hémodynamiques lors de la grossesse.....	2
1.1.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone.....	4
1.1.2. La prostacycline et la thromboxane.....	5
1.1.3. Endothélium, TNF- $\alpha$ et oxyde nitrique.....	6
1.2. Modèles animaux présentant des signes cliniques de prééclampsie.....	7
1.2.1. Inhibition de la synthèse de NO.....	7
1.2.2. Modulation du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	8
1.2.3. Atteinte rénale.....	10
1.2.4. Le système nerveux autonome.....	11
1.2.5. Toxémie.....	11
1.2.6. La brebis.....	12
1.2.7. L'ischémie utéroplacentaire.....	12
1.2.8. Notre approche.....	13
1.3. Mécanismes de contraction et de relaxation du muscle lisse vasculaire.....	14

1.3.1. Contraction du muscle lisse vasculaire.....	14
1.3.2. Relaxation du muscle lisse vasculaire.....	18
1.4. Les canaux calciques.....	20
1.4.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.....	20
1.4.1.1. Structure des canaux calciques dépendants du voltage.....	21
1.4.1.2. Conformation des canaux calciques dépendants du voltage....	26
1.4.1.3. Types de canaux calciques dépendants du voltage.....	29
1.4.2. Les canaux calciques opérés par un récepteur.....	31
1.4.3. Agents pharmacologiques modulateurs des canaux calciques de type L.....	32
1.4.3.1. Les antagonistes des canaux calciques de type L.....	32
1.4.3.2. La nifédipine.....	33
1.5. Les canaux potassiques.....	33
1.5.1. Les canaux potassiques à rectification entrante.....	36
1.5.2. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP.....	39
1.5.3. Les canaux potassiques dépendants du voltage.....	40
1.5.4. Les canaux potassiques activés par le calcium.....	41
1.5.4.1. Haute conductance.....	41
1.5.4.2. Basse conductance.....	43
1.6. Mécanismes d'action des modulateurs de canaux potassiques utilisés.....	43
1.6.1. Généralités sur les activateurs de canaux potassiques.....	43
1.6.1.1. La cromakalime.....	44
1.6.1.2. Le NS-1619.....	45
1.6.2. Généralités sur les inhibiteurs de canaux potassiques.....	46
1.6.2.1. Le tétraéthylammonium.....	46

1.7. Les endothélines.....	47
1.7.1. Les récepteurs de l'endothéline.....	48
1.7.1.1. Récepteur de type A.....	48
1.7.1.2. Récepteur de type B.....	49
1.7.1.3. Récepteur de type C.....	50
1.7.2. Les modulateurs des récepteurs de l'endothéline.....	51
1.8.2.2. La sarafotoxine 6c.....	51
1.8.2.3. Le BQ123.....	52
1.8. Réactivité vasculaire durant la gestation et agents utilisés.....	53
1.8.1. Réactivité vasculaire durant la gestation.....	53
1.8.2. Mécanismes d'action des agents pharmacologiques utilisés.....	57
1.8.2.1. La stimulation $\alpha$ -adrénergique.....	57
1.8.2.2. La vasopressine.....	58
1.8.2.3. Le chlorure de potassium.....	59
1.8.2.4. L'endothéline-1.....	59
1.9. But de l'étude.....	60
2. ARTICLE 1.....	62
3. ARTICLE 2.....	104
4. DISCUSSION.....	131
5. CONCLUSION.....	151
6. PERSPECTIVES.....	153
7. BIBLIOGRAPHIE.....	156
8. REMERCIEMENTS.....	xv

## Liste des tableaux

### Article 1

- Tableau I :** Effets des suppléments sodiques sur les courbes concentration-réponse au tétraéthylammonium en l'absence et en présence de KCl.....100
- Tableau II :** Effets des suppléments sodiques sur les courbes concentration-réponse à la phényléphrine en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619.....101
- Tableau III :** Effets des suppléments sodiques sur les courbes concentration-réponse au chlorure de potassium en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619.....102
- Tableau IV :** Effets des suppléments sodiques sur les courbes concentration-réponse à la vasopressine en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619.....103

### Article 2

- Tableau I:** Effets des suppléments sodiques sur les courbes concentration-réponse à l'endothéline-1 en l'absence et en présence de BQ123.....130

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Les principaux systèmes mobilisant le calcium de la cellule musculaire lisse.....	16
<b>Figure 2 :</b>	Structure du canal calcique dépendant du voltage de type L du muscle squelettique.....	22
<b>Figure 3 :</b>	Cartographie fonctionnelle de la sous-unité $\alpha 1$ d'un canal calcique dépendants du voltage de type L.....	24
<b>Figure 4 :</b>	Fonction des canaux calciques dépendants du voltage.....	27
<b>Figure 5 :</b>	Représentation schématique d'une cellule musculaire lisse avec les principaux transporteurs de potassium.....	34
<b>Figure 6 :</b>	Représentation schématique de la structure secondaire des différentes familles de canaux potassiques.....	37

## Article 1

<b>Figure 1 :</b>	Courbes concentration-réponse au tétraéthylammonium, en l'absence et en présence de KCl, sur des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes sous diète normale ou supplémentée de sodium.....	96
-------------------	--	----



- Figure 2 :** Courbes concentration-réponse à la phényléphrine, en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619, sur des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes sous diète normale ou supplémentée de sodium.....97
- Figure 3 :** Courbes concentration-réponse au chlorure de potassium, en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619, sur des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes sous diète normale ou supplémentée de sodium.....98
- Figure 4 :** Courbes concentration-réponse à la vasopressine, en l'absence et en présence de nifédipine, de cromakalime ou de NS-1619, sur des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes sous diète normale ou supplémentée de sodium.....99
- Article 2**
- Figure 1:** Courbes concentration-réponse à l'endothéline-1 en l'absence et en présence de BQ123, sur des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes sous diète normale ou supplémentée de sodium.....129

### Liste des abréviations

$\mu\text{M}$	: Micromolaire
ADP	: Adénosine diphosphate
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	: analyse de variance
ATP	: Adénosine triphosphate
AVP	: arginine-vasopressine
BayK 8644	: 1,4-dihydro-2,6-diméthyl-5-nitro-4-[2-(trifluorométhyl)-phényl]-3-pyridine carboxilic acid methyl ester
$\text{Ca}^{2+}$	: Ion calcium
CCDV	: Canaux calciques dépendants du voltage
CCOR	: Canaux calciques opérés par un récepteur
$\text{Cl}^-$	: Ion chlore
DAG	: diacylglycérol
EDRF	: facteur relaxant de l'endothélium
$E_{\text{max}}$	: réactivité maximale
<i>et al.</i>	: et collaborateurs
Et-1	: endothéline-1
$\text{ET}_A$	: Récepteur de l'endothéline de type A
$\text{ET}_B$	: Récepteur de l'endothéline de type B
g	: gramme
GMP	: guanosine monophosphate
GMPc	: guanosine monophosphate cyclique
GTP	: guanosine triphosphate

InsP3	: inositol-1,4,5-triphosphate
K <sup>+</sup>	: Ion potassium
KCl	: chlorure de potassium
Kd	: constante de dissociation
kDa	: kilodalton
L	: Litre
L-NAME	: N-nitro-L-arginine methyl ester
M ou mol	: Mole
mM	: millimolaire
mmHg	: Millimètre de mercure
mV	: Millivolt
Na <sup>+</sup>	: Ion sodium
NaCl	: chlorure de sodium
nM	: Nanomolaire
NO	: monoxyde d'azote
pD <sub>2</sub>	: sensibilité
PhE	: phényléphrine
PIP2	: L- $\alpha$ -phosphatidil inositol biphosphate
protéine G	: protéine liant le GTP
SHR	: rats spontanément hypertendus

# **1. INTRODUCTION**

## **1.INTRODUCTION**

La grossesse et la prééclampsie sont des conditions physiologiques et physiopathologiques qui font l'objet de peu de travaux scientifiques si on considère leur médicalisation dans la société occidentale. En effet, la gestation et la prééclampsie, autant chez la femme que chez les autres mammifères, sont associées à de nombreux changements physiologiques dont les mécanismes de mise en place sont encore mal connus. Notre travail vise à comprendre les mécanismes des importants changements cardiovasculaires associés à la grossesse normale et à la prééclampsie.

La prééclampsie est une pathologie affectant 3% à 7% de toutes les grossesses dans les pays développés. Ce syndrome, spécifique à l'humain, est une cause importante de morbidité fœtale et maternelle. La prééclampsie se définit comme étant l'occurrence d'hypertension, de protéinurie et d'œdème durant la seconde moitié de la grossesse. Ces symptômes disparaissent peu après l'accouchement. Une croissance fœtale normale ou retardée peut avoir lieu en parallèle avec des problèmes sévères ou minimes chez la mère. De nombreux changements physiologiques et hormonaux, ayant lieu durant la grossesse normale, sont absents ou anormaux durant la prééclampsie.

### **1.1. Mécanismes des changements hémodynamiques lors de la grossesse**

Durant la grossesse normale chez la femme, le rythme cardiaque, le volume d'éjection systolique et la filtration glomérulaire augmentent tandis que la résistance

vasculaire diminue. Ces changements surviennent au début de la grossesse ( 8 premières semaines) et sont maintenus jusqu'à la fin de celle-ci. En général, le rythme cardiaque augmente d'environ 10 à 15 battements par minute durant la grossesse. De plus, la pression artérielle et la résistance vasculaire diminuent tandis que le volume sanguin, le poids maternel et le taux du métabolisme basal augmentent. Le volume d'éjection systolique, au repos, augmente appréciablement tôt dans la grossesse et reste élevé tout au long de celle-ci [105]. Durant la grossesse, on assiste aussi à une importante diminution de réactivité vasculaire à plusieurs agents vasopresseurs.

La prééclampsie est une des graves complications de la grossesse se produisant dans la deuxième moitié de la grossesse. La plupart des changements hémodynamiques ayant lieu durant la grossesse normale sont renversés durant la prééclampsie. Contrairement à la grossesse normale, la prééclampsie est caractérisée par une forte hausse de la pression diastolique pouvant atteindre plus de 110 mmHg. De plus, elle se caractérise par une protéinurie de plus de 300 mg/24h, d'ischémie utéroplacentaire et, quelques fois, par une coagulation intravasculaire accentuée et des problèmes hépatiques. Le débit cardiaque est diminué ainsi que la capacité à excréter le sodium, ce qui peut amener de l'œdème. La vasculature de la femme prééclamptique est très sensible aux vasopresseurs endogènes et aux catécholamines et est aussi grandement sensible à l'angiotensine II, ce qui est tout le contraire des réponses observées lors de la grossesse normale. Lors de prééclampsie, la résistance périphérique ainsi que l'activité du système nerveux sympathique sont augmentées alors que la filtration glomérulaire et le nombre de plaquettes sanguines sont diminuées [106].

### **1.1.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone**

Le système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle important dans la régulation à long terme de la fonction rénale et de la pression artérielle. Durant la grossesse normale, le taux de filtration glomérulaire augmente de 50%. Les résultats nets sont une augmentation de rétention du sodium et des fluides ainsi qu'une expansion volumique. De plus, les concentrations plasmatiques de rénine, d'angiotensine II et d'aldostérone sont augmentées. Paradoxalement, on observe une diminution de la réponse vasculaire à l'angiotensine II ainsi qu'une diminution de la pression artérielle. Cette diminution de pression artérielle est accompagnée par une augmentation du volume plasmatique et du débit cardiaque ainsi que par une diminution de la résistance périphérique [58].

L'importance du système rénine-angiotensine-aldostérone durant la prééclampsie n'est pas claire. Certaines études rapportent que durant l'ischémie utéroplacentaire, caractéristique de la prééclampsie, il y a augmentation de la relâche de rénine utéroplacentaire. Toutefois, la plupart des études effectuées chez l'humain rapportent que l'activité de la rénine et la concentration plasmatique d'angiotensine-II sont normales ou diminuées durant la prééclampsie. Ces dernières observations sont également faites chez certains modèles animaux. Malgré le fait que les niveaux d'angiotensine-II circulant puissent être normaux durant la prééclampsie, il est possible que l'ischémie utéroplacentaire puisse augmenter la sensibilité rénale à l'angiotensine-II par des réductions de synthèse de monoxyde d'azote et de prostacycline ou par des augmentations de formations de

thromboxane. Des études indiquant une augmentation de la réponse vasculaire à l'angiotensine-II chez des vaisseaux de femmes prééclampsiques et d'animaux utilisés comme modèles de prééclampsie sont en accord avec cette suggestion [58].

### **1.1.2. La prostacycline et la thromboxane**

Durant la grossesse, une résistance à l'effet presseur de la perfusion d'angiotensine-II est observée [58]. Cette résistance serait dépendante de la production de prostaglandines. Des prétraitements à l'indométhacine et à de hautes doses d'aspirine augmentent la sensibilité à l'angiotensine-II perfusée [38]. Inversement, des prétraitements à la prostanglandine E<sub>2</sub> et à la prostacycline diminuent les effets presseurs de l'angiotensine-II infusée durant la gestation [38]. La prostacycline est le principal produit du métabolisme de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires. Durant la gestation, les effets de la prostacycline seraient augmentés et pourraient être en partie responsables de la diminution de pression artérielle observée [127]. Le placenta normal semble pouvoir produire de grandes quantités de prostacycline, ce qui contribuerait grandement à l'augmentation des niveaux de prostacycline durant la grossesse [127].

Durant la prééclampsie, la production placentaire de prostacycline est réduite et cette réduction n'est pas due à un manque de disponibilité d'acide arachidonique, mais serait plutôt attribuée à l'hypoxie placentaire subséquente à la diminution du flot sanguin utérin [127]. Une réduction de la production vasculaire de prostacycline causerait une augmentation des effets de la thromboxane A<sub>2</sub>. La thromboxane A<sub>2</sub>, dérivé du métabolisme de l'acide arachidonique, est également produite par le



placenta et est un puissant agent d'agrégation plaquettaire et de vasospasmes. La production placentaire de thromboxane  $A_2$  est augmentée durant la prééclampsie. La prédominance de thromboxane  $A_2$  pourrait être responsable d'ischémie focale et des dépôts plaquettaires encourus durant la prééclampsie [168]. Aussi, la protéinurie progressive, caractéristique de la prééclampsie, pourrait être intensifiée par les excès de thromboxane  $A_2$ . La diminution d'albumine résultant de la protéinurie, en revanche, réduit la demi-vie de la prostacycline systémique, ce qui établit un cycle pathogénique [127].

### **1.1.3 Endothélium, $TNF-\alpha$ et monoxyde d'azote**

Plusieurs études supportent l'hypothèse que, durant la prééclampsie, l'ischémie placentaire pourrait contribuer à l'activation et/ou au dérèglement des cellules endothéliales maternelles. L'ischémie placentaire pourrait contribuer à l'augmentation de la synthèse de cytokines comme le  $TNF-\alpha$  et l'interleukine-1. Ces deux dernières cytokines peuvent induire des dommages structuraux et fonctionnels de l'endothélium. Elles peuvent également induire la formation d'endothéline et inhiber la formation d'oxyde nitrique. Des niveaux modestes de  $TNF-\alpha$  peuvent déstabiliser l'ARNm de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale. Durant la prééclampsie, les niveaux plasmatiques d'endothéline et de  $TNF-\alpha$  sont augmentés de deux à trois fois alors que la production d'oxyde nitrique est diminuée [38].

Durant la grossesse normale, la production d'oxyde nitrique est augmentée, ce qui joue un rôle important dans la vasodilatation rénale. La diminution d'oxyde nitrique durant la prééclampsie pourrait être impliquée dans le processus de la

maladie. L'inhibition chronique de la synthèse d'oxyde nitrique chez des rates gestantes produit une hypertension associée à des vasoconstrictions rénales et périphériques, une protéinurie, une restriction de croissance intrautérine et une augmentation de la morbidité fœtale [58]. Ce tableau clinique ressemble beaucoup aux symptômes retrouvés durant la prééclampsie chez l'humain [58].

La combinaison des facteurs mentionnés avec beaucoup d'autres pourrait contribuer à l'installation de complications de la grossesse. Il reste encore beaucoup à faire afin de cerner et d'élucider les mécanismes amenant les complications de la grossesse telle la prééclampsie. La prééclampsie étant un syndrome spécifique à l'humain ne survenant pas spontanément chez les animaux, des modèles expérimentaux animaux furent élaborés afin de mieux expliquer la problématique relative à la physiopathologie en question.

## **1.2. Modèles animaux présentant des signes cliniques de prééclampsie**

Depuis la fin des années 1960, des efforts en laboratoire visent à reproduire expérimentalement les conditions physiopathologiques de la prééclampsie chez différents animaux tels le rat, la souris, la brebis, le babouin, le singe et le cochon d'Inde.

### ***1.2.1. Inhibition de la synthèse de NO***

Chez la rate, l'infusion sous-cutanée de 50 mg/jour de N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou de N-nitro-L-arginine, soient deux inhibiteurs de la

synthase d'oxyde nitrique, provoque des conditions similaires à la prééclampsie humaine [34,88,113,173,176]. Chez la rate, la gestation dure 22 jours. L'administration de l'inhibiteur de la synthase d'oxyde nitrique débute le 17<sup>e</sup> jour de gestation et se termine à l'accouchement. Les rates gestantes traitées avec le L-NAME souffrent d'hypertension, de protéinurie et sont sujettes à des restrictions de croissance et mortalité fœtales [113]. La mortalité fœtale est dépendante de la quantité de L-NAME administrée. Durant la grossesse normale, la mortalité fœtale est de 2,5% alors qu'elle atteint 8% et 18% lorsque respectivement 25 mg et 50 mg de L-NAME par jour sont administrés [173]. De plus, chez les rates gestantes traitées avec le L-NAME, la résistance périphérique, la résistance vasculaire rénale, les niveaux d'endothéline-1 et d'angiotensine plasmatique ainsi que la réponse vasculaire à l'angiotensine II sont augmentés alors que le rythme cardiaque, le volume intravasculaire ainsi que la perfusion sanguine du cœur, des poumons, du foie, du diaphragme, des muscles squelettiques et du rein sont diminués [34,88,113]. Finalement, l'infusion de L-NAME chez les rates gestantes provoque des lésions rénales et altère le ratio prostacycline/thromboxane A<sub>2</sub>. Ce tableau clinique ressemble beaucoup à celui retrouvé chez les femmes prééclamptiques.

### ***1.2.2 Modulation du système rénine-angiotensine-aldostérone***

En exprimant des gènes d'angiotensinogène humaine et de rénine humaine dans des animaux ne les exprimant pas avant les manipulations géniques, il est possible d'obtenir un modèle de prééclampsie. En effet, lorsque des femelles transgéniques pour l'angiotensinogène humaine sont accouplées avec des mâles transgéniques pour la rénine humaine et que la femelle devient gestante, le placenta

peut alors exprimer, produire et sécréter de la rénine humaine. Chez la rate gestante, on retrouve alors une augmentation de la concentration de rénine plasmatique humaine, une augmentation de la pression artérielle à partir du 12<sup>e</sup> jour de gestation, une protéinurie, une diminution du nombre de fœtus à la naissance, des hypertrophies cardiaques et rénales ainsi que des convulsions. Toutefois, la pression artérielle diminue un peu avant la parturition et non après comme c'est le cas lors de prééclampsie chez l'humain. La raison de cette diminution de pression artérielle prématurée reste à être élucidée. Ce modèle animal où la prééclampsie est génétiquement induite est assez récent et nécessite encore une caractérisation plus approfondie [9]

Le rôle de la synthèse d'oxyde nitrique dans la prééclampsie fut également étudié chez des souris transgéniques. Les souris à l'étude possédaient toutes quatre copies du gène de l'angiotensinogène ( $Agt^{2/2}$ ) et étaient déficientes du gène de la synthèse d'oxyde nitrique de l'endothélium (eNOS) de façon homozygote ( $eNOS^{-/-}$ ) ou hétérozygote ( $eNOS^{+/-}$ ). La pression artérielle augmente partout chez les mutants et les souris transgéniques  $Agt^{2/2} eNOS^{-/-}$  possèdent la pression artérielle la plus élevée. Chez les souris gestantes témoins, la pression artérielle diminue en fin de gestation alors qu'elle demeure constante chez les souris gestantes mutantes. Chez les souris gestantes  $Agt^{2/2} eNOS^{-/-}$ , le rythme cardiaque, la rénine plasmatique et la pression artérielle augmentent, ce qui peut suggérer des symptômes de prééclampsie. Toutefois, la protéinurie est absente chez ce modèle et la pression artérielle demeure élevée même suite à la parturition [68].

### **1.2.3. Atteinte rénale**

Les complications d'hypertension sont courantes durant la grossesse, particulièrement lorsqu'une maladie rénale est pré-existante. Il n'existe pas de petits animaux qui développent spontanément la prééclampsie. Toutefois il est possible d'étudier les changements éventuels induits par la gestation chez des rates souffrant au préalable de néphropathie. Lorsque des rates sont traitées pendant deux semaines avec de l'adriamycine (3.5 mg/jour) administrée par voie intraveineuse via une veine fémorale, elles développent alors une néphropathie. Une fois cette maladie rénale déclarée, elles sont accouplées avec des mâles et les rates gestantes présentent alors des symptômes de prééclampsie. Les rates gestantes ayant souffert avant leur grossesse de néphropathie font de l'hypertension, ne présentent pas de changement de filtration glomérulaire (elle augmente durant la gestation normale), ont de la protéinurie et un niveau de production de tromboxane A<sub>2</sub> augmenté tandis que celui de la prostacycline et de l'oxyde nitrique sont diminués [130]. Dans ce modèle animal, on a montré que les changements dans la production d'oxyde nitrique jouent un rôle important dans le développement de l'hypertension durant la grossesse. La diminution d'oxyde nitrique ne serait pas due à un manque de substrat ni à une altération des voies biochimiques intracellulaires menant à sa production [129]. Toutefois, toujours chez ce modèle animal, le poids et la taille des fœtus sont inchangés, ce qui indique l'absence de restriction de croissance intrautérine. Il ne faut pas oublier aussi que le modèle décrit ici est avant tout un modèle d'étude pour la maladie rénale [128].

#### **1.2.4. Le Système Nerveux Autonome**

Durant la prééclampsie chez l'humain, l'activité du système nerveux sympathique est augmentée. Aussi, chez l'homme, une stimulation locale au froid est suffisante pour augmenter la pression sanguine. Un modèle animal où l'activité du système nerveux sympathique est augmentée chez la rate suite à une stimulation locale au froid durant la gestation fut donc élaboré. Au 5<sup>e</sup> jour de gestation, les rates expérimentales sont localisées dans une pièce où il fait 23°C mais marchent sur un plancher de cage maintenu à 0°C par de la glace. En fin de gestation, les rates expérimentales souffrent d'hypertension et de protéinurie. Toutefois, les rates non gestantes expérimentales souffrent des mêmes symptômes, ce qui indique que l'hypertension et la protéinurie ne sont pas associées à la gestation comme telle. Une augmentation du système nerveux sympathique par une stimulation locale au froid durant la gestation ne conduit donc pas à la prééclampsie [86].

#### **1.2.5. Toxémie**

L'élaboration d'un autre modèle animal de prééclampsie consiste à administrer de très faible dose d'endotoxine à des rates gestantes. Au 14<sup>e</sup> jour de gestation, un groupe de rates reçoit 1 µg/Kg d'endotoxine et un autre 6.5 µg/Kg d'endotoxine, pendant une heure, par infusion via une canule insérée dans la veine jugulaire droite. Chez les rates gestantes recevant 1 µg/Kg d'endotoxine, la pression artérielle est augmentée comparativement aux rates gestantes témoins alors qu'elle diminue chez les rates gestantes recevant 6.5 µg/Kg d'endotoxine. De plus, on retrouve une protéinurie, un nombre de plaquettes sanguines diminué, des dépôts de fibrinogène

sur les glomérules et une diminution de la filtration glomérulaire seulement chez les rates gestantes recevant la plus faible dose d'endotoxine (1 µg/Kg) [40]. Les résultats de cette étude sont cependant controversés. En effet, Yasser Sakawi et al. [147] n'ont pas trouvé de différence entre les valeurs de pression artérielle et ne protéinurie chez les rates gestantes recevant 1 µg/Kg ou 6.5 µg/Kg d'endotoxine et les valeurs retrouvées chez les rates gestantes témoins.

### **1.2.6. La Brebis**

La brebis sert également à l'élaboration d'un modèle de prééclampsie. Chez la brebis, la grossesse à terme prend 146 à 150 jours. Lorsque la nourriture est enlevée au 142<sup>e</sup> jour de gestation et que la brebis jeûne subséquentement pendant 72 heures, elle développe alors des symptômes compatibles avec les paramètres retrouvés durant la prééclampsie. Chez les brebis gestantes à jeun pendant 72 heures en fin de gestation, la pression artérielle moyenne et la résistance périphérique totale augmentent alors que le débit cardiaque, le débit sanguin dans l'artère utérine gauche et la filtration glomérulaire diminuent. De plus, les brebis en question présentent des lésions morphologiques du rein [162].

### **1.2.7. L'ischémie utéroplacentaire**

Une autre approche visant à reproduire les conditions de prééclampsie consiste à prédisposer l'animal à l'ischémie utéroplacentaire. Des pinces métalliques sont tout d'abord placées autour des artères utérines. Ensuite, les vaisseaux sanguins ovariens sont ligaturés bilatéralement de façon à ce que l'apport sanguin

collatéral à l'utérus soit interrompu . Etant donné que les artères ovariennes sont ligaturées, presque tout le sang approvisionnant l'utérus doit passer par les artères utérines clampées et les pinces métalliques empêchent le remodelage de ces dernières. Il en résulte que l'apport en sang, et donc en oxygène, à l'utérus est diminué et par conséquent, on obtient une ischémie utéroplacentaire. Chez l'animal prédisposé à l'ischémie utéroplacentaire, on retrouve une augmentation de la pression artérielle et de la résistance périphérique, une diminution du débit cardiaque et de la filtration glomérulaire, une protéinurie et des dépôts de fibrinogène sur les glomérules. Toutefois, aucune lésion chez le rein n'est retrouvée chez ce modèle. Ces résultats sont reproduits chez le babouin [21], le singe [23] et le cochon d'Inde [55].

#### **1.2.8. Notre Approche**

Il est généralement admis qu'aucun modèle animal de prééclampsie ne reflète parfaitement les conditions retrouvées chez l'humain. Dans nos laboratoires, nous nous intéressons au contrôle de la pression artérielle durant la gestation. Le système rénine-angiotensine-aldostérone étant connu pour jouer un rôle important dans la régulation de la pression artérielle, nous nous sommes donc intéressés à la modulation de son activité durant la gestation. Nous avons démontré qu'une diète faible en sodium, administrée durant les 7 derniers jours de gestation, active le système rénine-angiotensine-aldostérone de façon très importante durant la grossesse chez la rate par comparaison aux rates non-gestantes. Étonnamment, cette augmentation d'activité n'empêche pas la diminution de pression artérielle en fin de gestation chez la rate. [142]. À l'opposé, nous avons découvert que l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone induite par des suppléments sodiques



(0.9% et 1.8% NaCl dans l'eau de breuvage) est alors accompagnée soit par l'absence de diminution de pression (0.9% NaCl), soit par une augmentation de la pression artérielle en fin de gestation (1.8% NaCl) chez la rate. De plus, la prise du supplément sodique 1.8% NaCl s'accompagne de protéinurie. Ces résultats suggèrent donc que les rates gestantes recevant un supplément sodique, surtout 1.8% NaCl, présenteraient des manifestations physiologiques ressemblant à la prééclampsie [4]. Nous avons utilisé ce nouveau modèle animal, dans la présente étude, pour en caractériser les mécanismes de réactivité vasculaire. Avant d'entrer dans le vif du sujet, revoyons d'abord les mécanismes de contractions et de relaxation du muscle lisse vasculaire.

### **1.3. Mécanismes de la contraction et de la relaxation du muscle lisse vasculaire**

#### **1.3. 1. Contraction du muscle lisse vasculaire**

La production d'un tonus par la cellule musculaire lisse est dépendante de l'interaction de deux protéines contractiles majeures, l'actine et la myosine. Il est généralement accepté que le modèle de glissement de filaments, retrouvé dans les muscles striés, soit analogue à celui retrouvé dans les muscles lisses [79]. Dans ce modèle, les têtes de myosine subissent un cycle de haute et de basse affinité de liaison à l'actine. Cette liaison est sous le contrôle de l'hydrolyse de l'ATP.

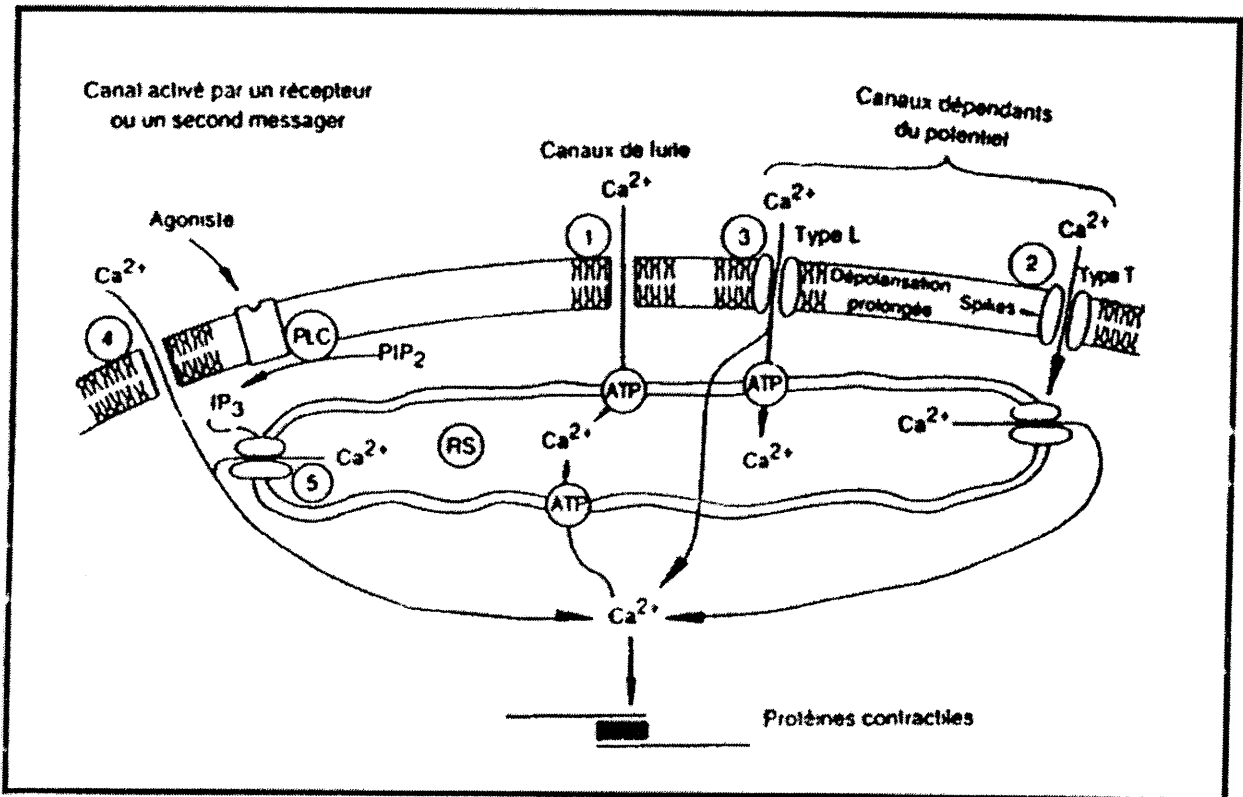
Dans le muscle lisse, les filaments minces incluent l'actine, la tropomyosine ainsi que d'autres protéines. Ces protéines sont attachées à la membrane par des plaques d'ancrage, soient les corps denses [66]. Les corps denses seraient

maintenus en un réseau tridimensionnel conférant la forme en fuseau à la cellule [11].

La caractéristique principale de la contraction musculaire en réponse à un agent pharmacologique ou à une stimulation électrique est une augmentation initiale et rapide de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine de 20 kDa [63]. La tension augmente plus lentement et se maintient même lorsque le niveau de chaîne légère de myosine phosphorylée et que la concentration intracellulaire de calcium libre diminuent. Ce mécanisme est énergétiquement avantageux puisque la tension est maintenue malgré une diminution de consommation d'ATP.

La contraction du muscle lisse vasculaire requiert une augmentation de calcium cytosolique (voir figure 1). Cette mobilisation peut s'effectuer par plusieurs voies. Différentes hormones, agissant via des récepteurs couplés à des protéines G, activent la phospholipase C liée à la membrane. Cette enzyme convertit alors le phosphatidyl inositol biphosphate ( $PIP_2$ ) en inositol-1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) et en diacylglycérol (DAG). L' $IP_3$  stimule la relâche de calcium du réticulum sarcoplasmique via un récepteur à l' $IP_3$ , décrit comme étant un type de canal





calcique. Une fois le calcium relâché dans le cytoplasme, il peut alors activer la calmoduline en s'y liant. La liaison du complexe calcium-calmoduline à la kinase de la chaîne légère de myosine forme un holoenzyme activé. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine est suivie par l'activation de la myosine ATPase par l'actine, le développement de force et le raccourcissement du muscle. L'augmentation du calcium intracellulaire jumelée à la formation de diacylglycérol provoquent un changement de conformation et une translocation de la protéine kinase C vers le sarcolemme. La protéine kinase C phosphoryle plusieurs protéines du sarcolemme. Ceci augmente le temps d'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage de type L. De plus, le diacylglycérol pourrait directement activer les canaux calciques dépendants du voltage. [66]

### **1.3.2. Relaxation du muscle lisse vasculaire**

Plusieurs mécanismes de relaxation du muscle lisse vasculaire ont été proposés. La déphosphorylation de la myosine peut être catalysée par la myosine phosphatase. Des altérations dans la concentration de calcium libre cytosolique, dans la concentration de la calmoduline et dans l'activité de la kinase ou de la phosphatase auraient pour conséquence une modification de la phosphorylation de la chaîne légère. S'il y a diminution de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine, il y a relaxation du muscle lisse vasculaire.

*In vitro*, la chaîne légère de la myosine peut être phosphorylée par plusieurs protéines kinases. Dépendamment du résidu phosphorylé, cette chaîne augmentera ou diminuera son affinité pour la calmoduline. La protéine kinase dépendante de

l'AMPc et la protéine kinase II dépendante de la calmoduline diminuent l'affinité de la kinase de la chaîne légère de la myosine pour la calmoduline. Plusieurs phosphoprotéines phosphatases ont été isolées et pourraient contribuer à la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine.

Plusieurs agonistes stimulent la production de prostacycline dans les cellules endothéliales et musculaires lisses. Les propriétés vasodilatrices de la prostaglandine I<sub>2</sub> semblent être médiées par l'induction de l'activité adénylate cyclase musculaire aboutissant à la génération d'AMPc. L'AMPc stimule les systèmes protéiques intracellulaires de séquestration du calcium dans les compartiments membranaires. La diminution de calcium intracellulaire qui s'en suit ne permet plus les phosphorylations nécessaires à l'interaction actine-myosine, inhibant ainsi la contraction [60].

Le monoxyde d'azote (NO) est produit par l'endothélium et peut empêcher la contraction musculaire lisse. Le NO stimule la guanylate cyclase soluble qui peut alors former le GMPc. Une protéine kinase sensible à la GMPc est alors activée. Elle exerce un effet inhibiteur sur la phospholipase C, active les ATPases calciques du sarcolemme ou du réticulum endoplasmique, inhibant ainsi la sortie de calcium entreposé. L'activation de la protéine kinase GMP-dépendante, via l'activation des phosphatases des chaînes légères de la myosine, mène à la déphosphorylation des chaînes en question.

L'hyperpolarisation de la membrane cellulaire peut également mener à la relaxation du muscle lisse vasculaire. L'hyperpolarisation peut être produite via

l'activation des canaux potassiques. Sur le muscle lisse vasculaire, on retrouve entre autre le canal potassique activé par le calcium, le canal potassique à rectification retardée et le canal potassique sensible à l'ATP [117; 100]. Une augmentation de l'activité de ces canaux conduit à l'hyperpolarisation cellulaire, ce qui inactive les canaux calciques dépendant du voltage et conduit finalement à l'extrusion du calcium via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Dans les deux cas, la réponse physiologique est la relaxation ou une résistance à la contraction [101].

### **1.4. Les canaux calciques**

#### **1.4.1. Les canaux calciques dépendants du voltage (CCDVs)**

De nombreuses fonctions cellulaires sont contrôlées par l'influx de calcium à travers la membrane plasmique. Ces fonctions peuvent être aussi diverses que la relâche de neurotransmetteurs, la sécrétion d'hormones, la migration et la croissance cellulaire ainsi que la contraction des muscles. Le canal calcique dépendant du voltage (CCDV) est la voie d'entrée de calcium la mieux caractérisée, surtout en raison de la disponibilité de plusieurs agents modulateurs spécifiques.

Plusieurs types de CCDV ont été identifiés. On retrouve les canaux calciques de type N, P, T, B, R et L. Certains d'entre eux sont encore mal caractérisés alors que d'autres sont bien connus en raison de nombreuses études électrophysiologiques, biochimiques et moléculaires.

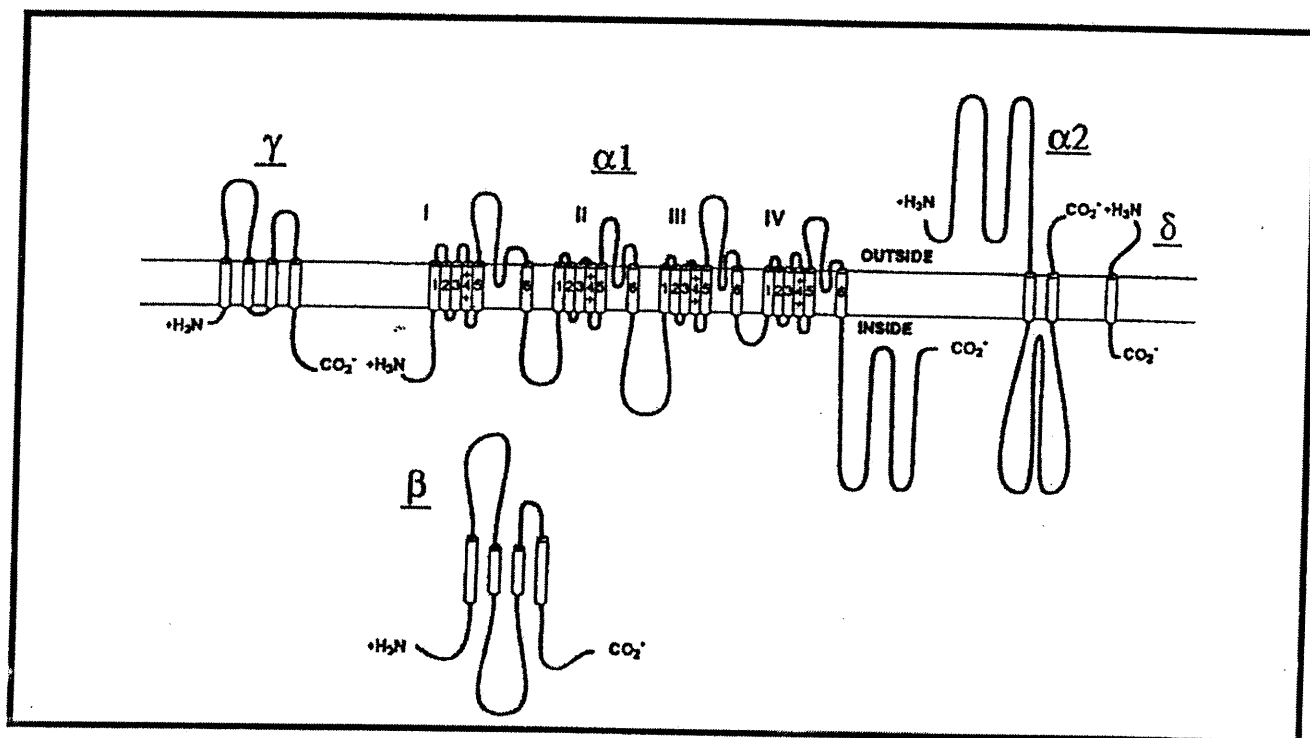
#### 1.4.1.1. Structure des canaux calciques dépendants du voltage

Les CCDVs sont composés de cinq sous-unités :  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  et  $\gamma$  (voir figure 2). On retrouve une seule sous-unité de chaque type dans un canal calcique [54; 152]. La sous-unité fonctionnelle est la sous-unité  $\alpha_1$ . (voir figure 3 ) Cette sous-unité est composée de 4 domaines comprenant chacun cinq hélices  $\alpha$  transmembranaires et un segment amphipatique. Le domaine I détermine le temps d'activation du canal [159]. La boucle cytoplasmique entre les domaines II et III détermine le type de couplage excitation-contraction, soit dépendant ou indépendant de l'influx de calcium dans la cellule. Cette boucle cytoplasmique contient également le site d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  [160]. Le détecteur de voltage, soit la partie responsable de l'activation, se trouve à être le quatrième segment de chaque domaine. La partie du pore du canal est formée par les régions SS1 et SS2 qui prennent également part au contrôle de la sélectivité des ions [62,70].

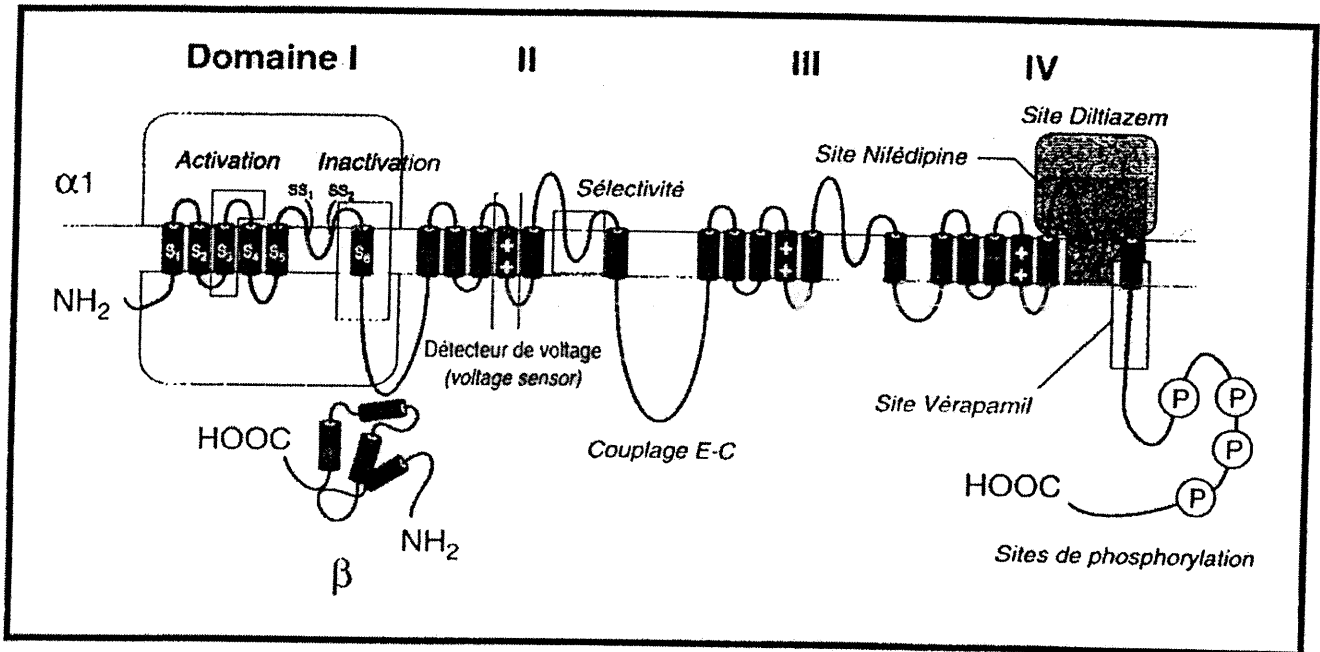
La sous-unité  $\beta$  est une protéine membranaire de 524 acides aminés localisée à l'intérieur de la cellule. Cette sous-unité augmente l'activité de la sous-unité  $\alpha_1$ [145]. La sous-unité  $\alpha_2/\delta$  est une protéine membranaire glycosylée de 125 kDa. La sous-unité transmembranaire  $\delta$  encadre la protéine  $\alpha_2$  extracellulaire à la membrane par des ponts disulfures [85]. Aucune autre fonction n'est connue pour cette sous-unité. La sous-unité  $\gamma$  est une protéine de 222 acides aminés ancrée à la membrane et on ne lui connaît pas encore de fonction spécifique [12].











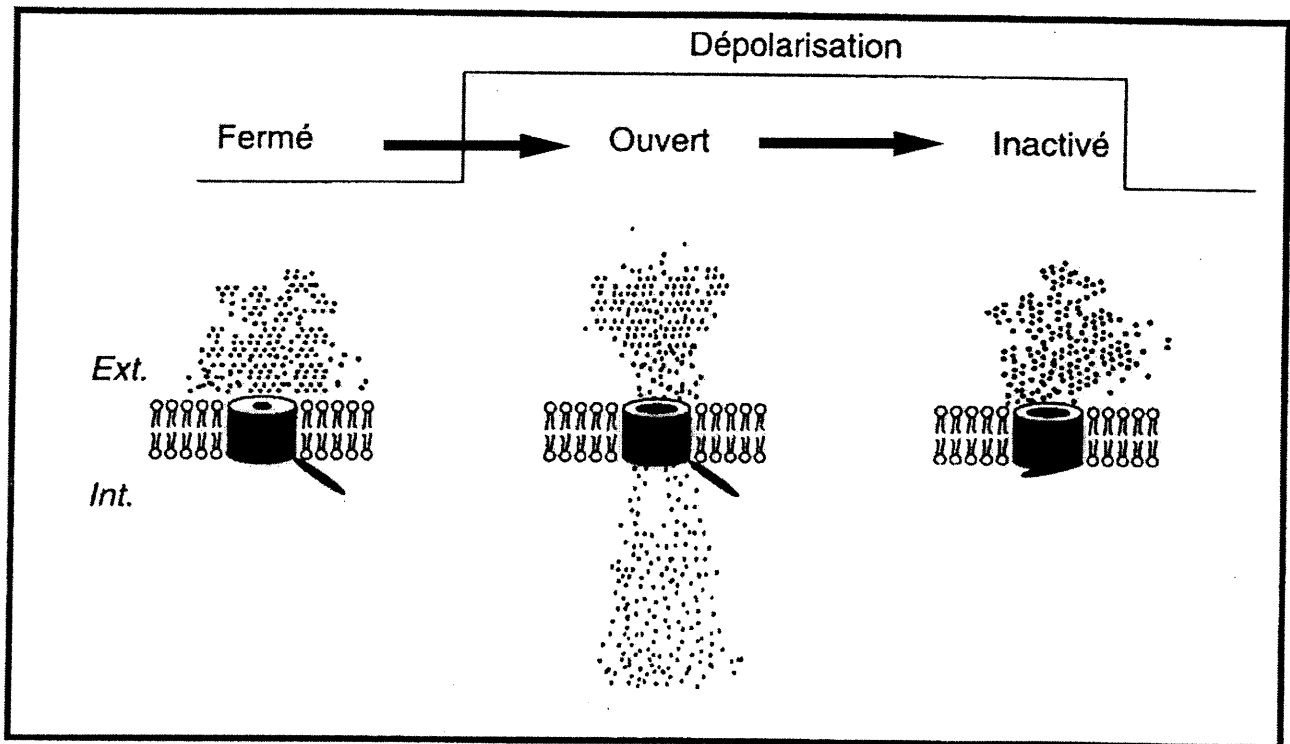
#### 1.4.1.2. Conformation des canaux calciques dépendant du voltage.

Les canaux calciques possèdent trois conformations : fermés, ouverts ou activés et inactivés. À l'état fermé, le canal calcique est disponible à l'ouverture. L'état fermé est la forme prédominante dans les cellules polarisées. Le canal calcique passe à l'état ouvert ou activé lorsque la cellule est dépolarisée au-delà d'un potentiel seuil et laisse alors passer le calcium. Finalement, lorsque la cellule est dépolarisée de façon prolongée, le canal calcique se ferme, passe à l'état inactif, n'est plus disponible à l'ouverture et ne laisse plus passer de calcium [164]. (voir figure 4 )

La dépolarisation de la cellule augmente la conductance des CCDVs. À un potentiel donné, tous les canaux calciques membranaires oscillent entre l'état activé et l'état inactivé. La fraction des canaux calciques à l'état activé dépend de la probabilité qu'a le canal de se trouver dans cet état. Le temps que passe un canal calcique dans l'une ou l'autre des trois conformations est contrôlé par le potentiel membranaire. La fraction de temps qu'un canal calcique est ouvert, soit sa probabilité d'ouverture, augmente exponentiellement avec la dépolarisation de la membrane et ce, à partir de potentiels hyperpolarisés de  $-70\text{mV}$  [73]. Une hyperpolarisation de  $2\text{mV}$  pourrait diminuer la probabilité d'ouverture du canal de 30 % [117]. Un agent augmentant l'inactivation du canal ferait en sorte que la probabilité d'ouverture du canal soit moins sensible à un changement de potentiel membranaire.

L'hypothèse que les CCDVs soient impliqués dans le maintien du tonus vasculaire des artères de résistance est soutenu par plusieurs observations. Par





exemple, les bloqueurs des CCDVs diminuent la pression artérielle in vivo en causant une vasodilatation chez les sujets normotendus et hypertendus. Le tonus des artères de résistance cérébrales et systémique, in vitro, est dépendant du calcium et peut être aboli par les bloqueurs de canaux calciques [84].

#### *1.5.1.3. Types de canaux calciques dépendants du voltage*

Les canaux calciques de type B sont connus sous le nom de "brain type", sont activés à de hauts potentiels membranaires, soit autour de -30 mV et s'inactivent lentement. On les retrouve dans les cellules neuronales et non-neuronales [7;164]. Ils seraient responsables d'un courant calcique non bloqué par une combinaison de bloqueurs pour les canaux de type L,N et P [11].

Les canaux calciques de type N, comme les précédents, sont activés à de hauts potentiels membranaires, soit autour de -30 mV, s'inactivent lentement et sont retrouvés dans les cellules neuronales ainsi que non neuronales [7;164]. Ces canaux sont bloqués spécifiquement par la toxine  $\omega$ -conotoxine GVIA [75; 110]. La sécrétion de neurotransmetteurs est liée à ce type de canal. Quelques canaux de type N, bien qu'activés par le voltage et contribuant à la relâche de neurotransmetteurs, pourraient être modulés par des systèmes de seconds messagers comme les protéines G. La modulation pourrait être accompli par un rétrocontrôle de l'agent relâché sur les neurones [97].

Les canaux calciques de type T sont connus sous le nom de "tiny" ou de "transcient". Ils sont activés et inactivés à de bas potentiels membranaires, soit autour



de -70mV, et sont présents dans une grande variété de cellules excitables et non excitables. Les canaux calciques de type T peuvent être activés par de petites dépolarisations, subissent une inactivation rapide dépendante du voltage, sont insensibles aux dihydropyridine ainsi qu'aux autres antagonistes organiques du calcium. Ils possèdent des propriétés électrophysiologiques très différentes de celles des canaux calciques de type L. Ils pourraient être importants pour l'activité "pace-maker" de plusieurs tissus. Le manque de sonde spécifique aux canaux calciques de type T empêche leur détermination structurelle. On leur connaît très peu d'antagonistes spécifiques. [43;44].

Les canaux calciques de type P portent cette étiquette du fait qu'ils ont été découverts dans des cellules de Purkinje. Ils sont activés à de hauts potentiels membranaires (autour de -30mV), s'inactivent lentement et sont exprimés dans des cellules neuronales ainsi que non neuronales [7]. Ils sont résistants aux dihydropyridine ainsi qu'à la  $\omega$ -conotoxine. Ils pourraient être responsables de la relâche de neurotransmetteurs dans plusieurs régions du cerveau. Ces canaux montrent peu d'inactivation [74].

Les canaux calciques de type L sont appelés ainsi pour "long-lasting" . Ils sont activés à de hauts potentiels membranaires (autour de -30mV), s'inactivent lentement et sont exprimés dans des cellules neuronales, glandulaires ainsi que musculaires [7]. Ils sont facilement bloqués par les dihydropyridines, les phénylalkylamines et par les benzothiazépines [20;52;76].

L'ouverture des canaux calciques est une étape cruciale du couplage excitation-contraction dans les muscle lisse vasculaire ainsi que pour les muscles cardiaques et squelettiques. Les canaux CCDVs de type L représentent la voie majeure d'entrée de calcium par dépolarisation dans le muscle lisse vasculaire [108].

#### **1.4.2. Les canaux calciques opérés par un récepteur (CCOR)**

Les canaux calciques dits opérés par les récepteurs (CCOR) sont décrits comme étant liés de près à des récepteurs membranaires et activés par l'interactions récepteur-agoniste. Bien qu'ils semblent jouer un rôle important dans la réponse contractile du muscle lisse, les CCOR ont beaucoup moins attiré l'attention que les autres canaux calciques, en particulier ceux dépendant du voltage. Leur propriétés électrophysiologiques et moléculaires demeurent pour ainsi dire inconnues. En effet, ils n'ont pas encore été formellement identifiés par des techniques de clonage ou de patch clamp, mais leur existence a été suggérée par de nombreuses études fonctionnelles [54;78].

La noradrénaline induit une réponse contractile dans les ramifications de l'artère mésentérique de rat. Cette contraction est associée à une dépolarisation de la cellule musculaire lisse vasculaire dont le potentiel membranaire passe alors de -59mV à -34mV. Lorsque les vaisseaux sont complètement dépolarisés au potassium (125mM KCl substitué au NaCl dans la solution physiologique), la noradrénaline stimule l'entrée de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  au même niveau que lorsque les tissus sont dans un milieu physiologique normale (20mM de potassium). Ceci signifie que la mobilisation du calcium extracellulaire par la noradrénaline est médiée via des canaux autres que les

canaux calciques de type L, puisque ceux-ci sont dans un état inactivé suite au changement de potentiel induit par le KCl [115].

### **1.4.3 Agents pharmacologiques modulateurs des canaux calciques de type L**

Suite aux travaux de Somlyo et al. à la fin des années 1960 [155], de nombreux agents ont été développés pour réduire la mobilisation du calcium extracellulaire. Les agents pharmacologiques modulant les canaux calciques de type L n'agissent pas physiquement sur les canaux, mais plutôt en influençant leur probabilité d'ouverture. Les activateurs de ces canaux, telle la dihydropyridine Bay K 8644, augmentent la probabilité d'ouverture alors que les antagonistes la diminuent. Il est rapporté que les antagonistes inhibent, dans le muscle lisse vasculaire, la contraction dépendante du calcium stimulée par dépolarisation [108].

#### **1.4.3.1 Les antagonistes des canaux calciques de type L**

Parmi les nombreuses molécules qui ont été développées au cours des années, plusieurs classes d'antagonistes ont reçu une attention particulière, comme les dihydropyridines, les benzothiazépines et les phénylalkylamine. Chaque classe possède un site de liaison distinct sur la sous-unité  $\alpha_1$  du canal. Bien que distincts, ces sites de liaison sont toutefois liés de façon allostérique et leur liaison est stéréospécifique et réversible. Cette liaison est sensible à la température et aux ions divalents [47;50;51]. Durant les travaux que nous décrivons dans le présent document, le prototype de la classe des dihydropyridines fut utilisé, soit la nifédipine.

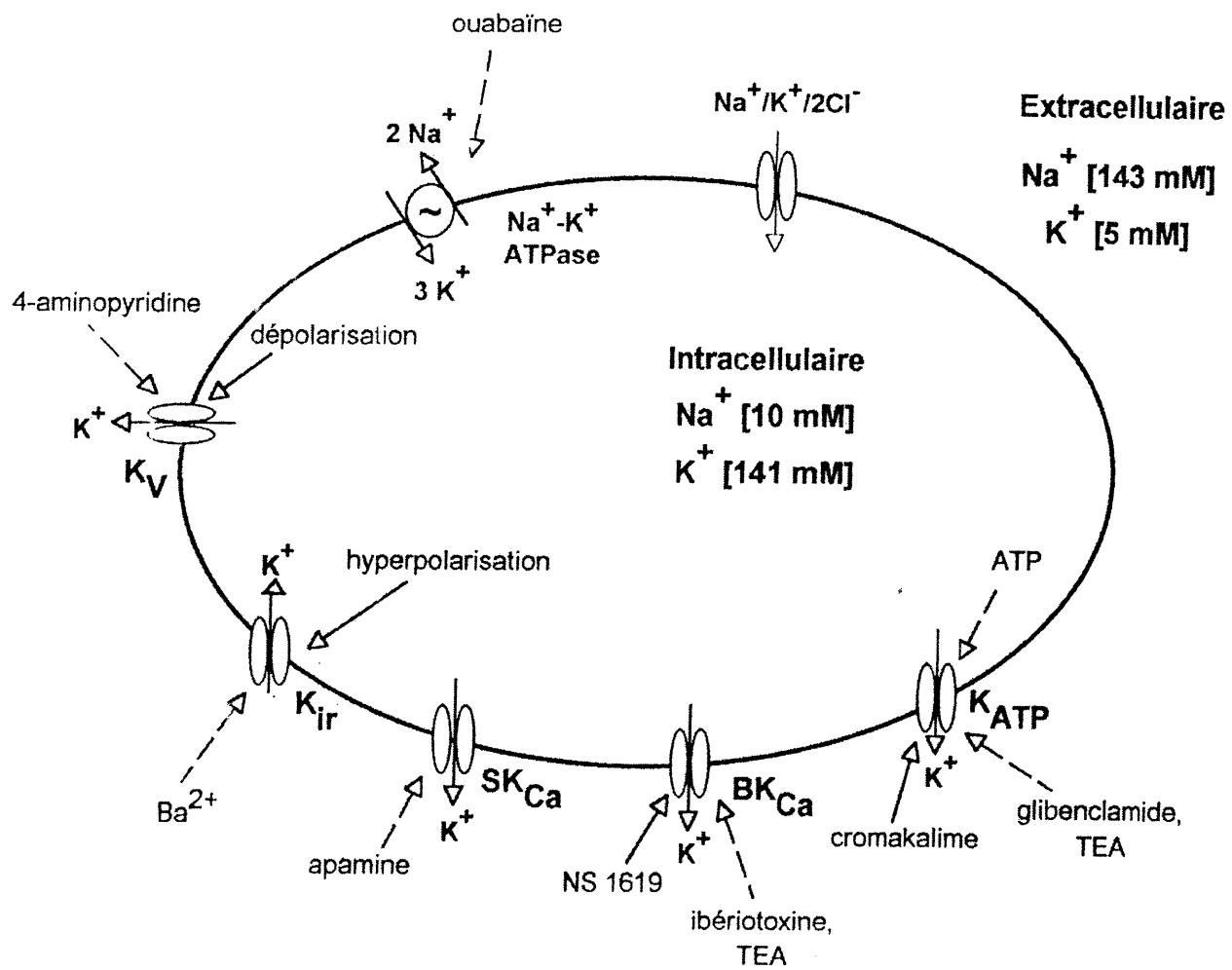
### 1.4.3.2. La nifédipine

La nifédipine appartient à la classe des dihydropyridines et est un puissant inhibiteur de la fonction des canaux calciques de type L. La nifédipine possède une grande affinité pour l'état inactivé du canal mais moins pour l'état fermé ou ouvert. Rappelons que l'état inactivé est celui présent dans les cellules dépolarisées. Elle possède une haute affinité pour son site liaison et s'y lie de façon stéréospécifique et réversible. La constance de dissociation et la densité des sites de liaison peuvent varier selon la température, le tissu et le pH. La constante de dissociation de la nifédipine,  $K_d$ , diminue avec la température. De plus, l'inhibition des courants calciques par la nifédipine est modulée par le potentiel membranaire [47].

### 1.5. Les canaux potassiques

La concentration d'ions potassiques ( $K^+$ ) intracellulaire est maintenue relativement constante grâce à une pompe utilisant l'ATP comme source d'énergie, la pompe  $Na^+/K^+ -ATPase$ , un cotransporteur, le  $Na^+/K^+/2 Cl^-$  et des canaux potassiques [150]. Dans les cellules musculaires lisses, la concentration intracellulaire de potassium est environ 25 fois plus élevées que la concentration extracellulaire (environ 141mM et 5mM, respectivement). La figure 5 résume les principaux transporteurs d'ions potassium ainsi que les activateurs et inhibiteurs de chacun d'eux. Ils sont exprimés à la surface cellulaire des cellules pancréatiques  $\beta$  [1;107], du cœur [118], des muscles lisses vasculaires [24;134], etc. Ils sont impliqués dans plusieurs phénomènes physiologiques allant de la régulation du





tonus vasculaire à la sécrétion d'hormone en passant par l'excitabilité cellulaire. Le potentiel membranaire est principalement régulé par les différentes contributions des transporteurs et des canaux ioniques, en particulier des canaux potassiques [17]. Lors de leur ouverture, ils maintiennent ou aident à retrouver la polarisation basale de la cellule et diminuent les effets dépolarisant entraînés par un influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+$  ou par un efflux d'ions  $\text{Cl}^-$  [134]

En général, les canaux peuvent être divisés en deux grandes catégories selon le stimulus qui induit un changement de conformation menant à l'ouverture du canal : ils peuvent être activés par le voltage ou par un ligand [48]. Les cinq grandes classes de canaux potassiques connues et relativement bien caractérisées seront présentées. La figure 6 décrit la structure schématique de base des principales classes de canaux potassiques.

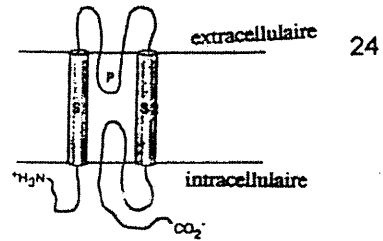
### **1.5.1. Les canaux potassiques à rectification entrante.**

Les canaux potassiques à rectification entrante ( $\text{K}_{ir}$ ) sont activés par un léger changement de concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  et contribueraient au potentiel de repos membranaire. Au repos, la majorité des canaux potassiques sont fermés à l'exception des  $\text{K}_{ir}$  [132] Ils tirent leur nom du fait que leur courant passe à sens inverse de tous les autres; le courant entre dans la cellule. Ils sont activés par l'hyperpolarisation cellulaire plutôt que par la dépolarisation. Puisqu'ils sont activés par une augmentation du potassium extracellulaire, il serait probable qu'ils aient un rôle important à jouer dans certaines pathologies où la concentration de potassium

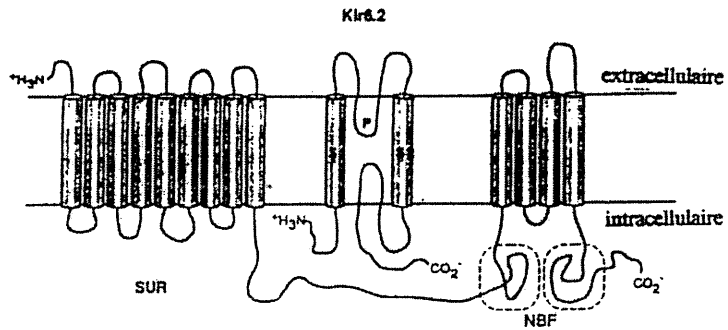




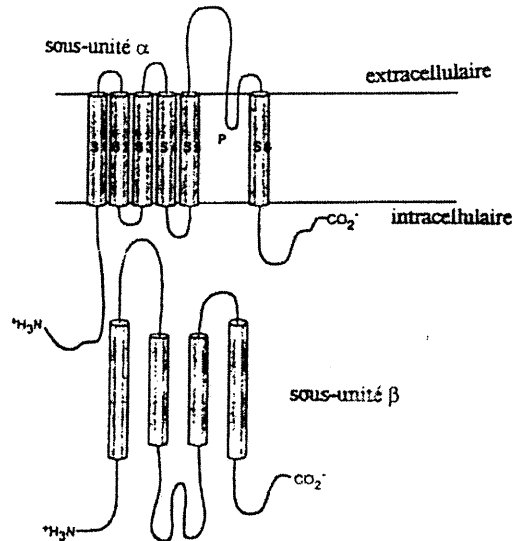
A) Canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{ir}$ )



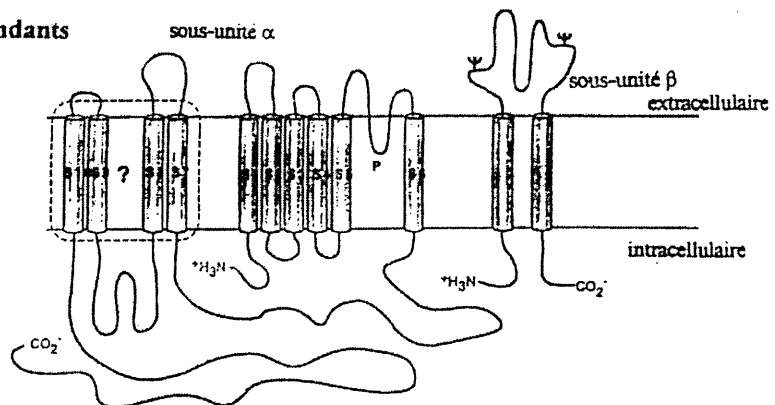
B) Canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ )



C) Canaux potassiques dépendants du voltage ( $K_v$ )



D) Canaux potassiques dépendants du calcium ( $K_{Ca}$ )



augmente à l'extérieur de la cellule. Par exemples, lors d'une augmentation de l'activité neuronale, d'hypoxie, d'hypoglycémie, etc [17].

Les  $K_{ir}$  sont composés de deux domaines transmembranaires hautement conservés et ne sont pas dépendants du voltage [48]. Leur mécanisme d'action est directement lié à des protéines G [61]. On retrouve les  $K_{ir}$  dans les cellules ventriculaires, les cellules musculaires lisses et d'autres cellules excitables [48].

### **1.5.2. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP**

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) ont pour modulateur l'ATP intracellulaire [118]. Ces canaux sont relativement insensibles au voltage et ne requièrent pas de calcium pour leur ouverture [35; 107]. Dans la majorité des organes, à l'exception du pancréas [107] et des coronaires [37], les  $K_{ATP}$  sont inhibés par les concentrations intracellulaires physiologiques d'ATP [48; 28]. L'activité des  $K_{ATP}$  est inhibée de moitié à des concentration intracellulaire d'ATP allant de 10uM à 100uM [37]. Les  $K_{ATP}$  ne participent donc pas activement à la régulation du tonus vasculaire [107]. Cependant, leur ouverture jouerait un rôle important dans la régulation du potentiel membranaire [135].

L'effet inhibiteur de l'ATP n'est pas dû à la phosphorylation du canal. Les nucléotides diphosphates (NDP), comme l'ADP, peuvent affecter les  $K_{ATP}$  en réduisant la sensibilité du canal pour l'ATP en se liant au même site que l'ATP ou à un site distinct couplé allostériquement de façon négative [37]. En fait, le rapport entre l'ATP et les NDP intracellulaires serait le principal régulateur de l'activité de ce

canal [118;163] Les canaux  $K_{ATP}$  sont la cibles de plusieurs vasodilateurs endogènes (oxyde nitrique, EDHF, etc) et sont également influencés par le pH et par les neurohormones [161]. Dans les muscles lisses, les canaux sont caractérisés par : 1) leur activation par des vasodilateurs synthétiques tels que la pinacidile et la levcromakalime, 2) leur inhibition par les sulfonyles telles que la glibenclamide, 3) leur indépendance à la polarité, 4) leur inhibition par l'ATP intracellulaire et 5) leur inhibition par le TEA à des concentration de l'ordre du mM [28; 118; 161;163].

Les canaux  $K_{ATP}$  sont composés de deux sous-unités : une perméable et l'autre régulatrice. La partie régulatrice est composée du récepteur des sulfonyles mais ne forme pas la partie du pore proprement dit. L'isoforme 2B, soit SUR2B, est la sous-unité régulatrice exprimée dans le canal  $K_{ATP}$  des muscles lisses [126]. La partie régulatrice serait impliquée dans l'établissement des caractéristiques pharmacologiques [126] Pour être fonctionnel, les canaux  $K_{ATP}$  doivent être associés à Bir, soit un canal à rectification entrante,  $K_{ir}$  [82]. L'ARNm de la sous-unité SUR2B est également exprimée dans le cœur, le cerveau, les poumons, le foie et la vessie [80].

### **1.5.3. Les canaux potassiques dépendants du voltage**

Les canaux potassiques dépendants du voltage ( $K_V$ ) contribuent au potentiel de repos à l'équilibre. Ils ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses de différents vaisseaux sanguins [5]. L'activité de ces canaux est augmentée par la dépolarisation membranaire et ils se désactivent lentement de façon dépendante du temps après la dépolarisation. Les canaux  $K_V$  sont également inhibés par le calcium

ainsi que le magnésium intracellulaires et sont activés par l'ATP intracellulaire [5; 17]. Ils sont les déterminants majeurs de l'excitabilité cellulaire en influençant le potentiel de repos membranaire, la fréquence et la forme des vagues des potentiels d'action ainsi que le potentiel seuil d'activation [139].

Les canaux  $K_v$  sont constitués de six segments transmembranaires en hélices- $\alpha$  (S1 à S6). Des résidus chargés positivement disposés à chaque quatre acides aminés du segment S4 seraient responsable du changement de conformation lorsque la protéine est stimulée. C'est le segment S4 qui confère aux canaux  $K_v$  leur sensibilité au voltage. Ils contiennent également une région hydrophobe, entre les segment S5 et S6, qui forme la région du pore, P [48].

#### ***1.5.4. Les canaux potassiques activés par le calcium***

Tout comme les canaux dépendants du voltage, les canaux potassiques activés par le calcium sont dépendant du voltage et activés par une dépolarisation membranaire. De plus, ils sont activés par une élévation de calcium intracellulaire [17]. Quelques canaux potassiques sensibles au calcium peuvent se trouver à l'état ouvert au potentiel de repos cellulaire[132].

##### ***1.5.4.1. Haute conductance***

Les canaux potassiques activés par le calcium et à haute conductance ( $K_{Ca}$ ) représentent la classe de canaux potassiques ayant la plus grande conductance pour les ions  $K^+$ [48]. Leur principal rôle est de produire une rétro-inhibition lors d'une

dépolarisation membranaire causée par un influx de calcium [16]. Ils sont impliqués dans la régulation à long terme du débit sanguin et de la pression artérielle [143]. Ils sont bloqués par des inhibiteurs peptidiques tel que l'ibériotoxine et ouverts par la famille des benzimidazolones, comme le NS1619 [36].

Les canaux  $K_{Ca}$  sont composés de 2 sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est un membre de la famille *Slo* tandis que la sous-unité  $\beta$  est une protéine qui module les propriétés biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité  $\alpha$ . Le canal fonctionnel serait constitué de quatre complexes  $\alpha/\beta$  [48]. Leur région N-terminale, très similaire à celle des canaux  $K_V$ , contient également six passages transmembranaire (S1 à S6) et une région P, située entre les segment S5 et S6. C'est aussi leur segment S4 qui joue le rôle de détecteur de voltage. Les canaux  $K_{Ca}$  ont également une région C-terminale de quatre domaines transmembranaires (S7 à S10) qui leur procure la sensibilité au calcium [143].

Dans l'hypertension artérielle, le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses des artérioles et des veinules d'animaux serait de 5 à 7 mV supérieur à celui des animaux normotendus [154]. Cette dépolarisation s'accompagne d'une augmentation d'environ 2.2 fois de la densité des canaux  $K_{Ca}$  sans qu'aucun effet ne soit observé au niveau transcriptionnel [104]. Ces résultats suggèrent que la régulation de ces canaux est un processus dynamique post-transcriptionnel [104; 143]. Ces canaux  $K_{Ca}$  seraient donc impliqués dans un mécanisme homéostasique afin de tamponner l'augmentation de la réactivité artérielle dans l'hypertension. Ils seraient responsables de l'hyperpolarisation suivant la repolarisation rapide qui survient dans les cellules excitables [16].

#### *1.5.4.2. Basse conductance*

Les canaux potassiques activés par le calcium et à basse conductance ( $SK_{Ca}$ ) sont généralement sensibles au calcium intracellulaire. En condition normale, soit lorsque la concentration calcique intracellulaire est d'environ 110nM, ces canaux ne sont pas actifs, mais ils le deviennent complètement lorsque la concentration de calcium intracellulaire grimpe à environ 320nM. Le niveau d'expression des canaux  $SK_{Ca}$  est très bas, soit 1500canaux/cellule [150].

Il a été démontré que les canaux  $SK_{Ca}$  ne sont pas impliqués dans la détermination du tonus vasculaire au repos [16]. Il a également été démontré que ces canaux seraient impliqués dans certaines maladies musculaires, comme lors de paralysie, puisque leur apparition se produit suite à la dénervation des muscles chez l'adulte [61].

### **1.6. Mécanismes d'action des modulateurs de canaux potassiques utilisés**

#### **1.6.1. Généralités sur les activateurs de canaux potassiques**

Dans les conditions physiologiques, les ions traversent la membrane cellulaire suivant le gradient électrochimique entre le cytosol et l'espace extracellulaire. La force conductrice pour les mouvements ioniques est déterminée par deux variables : la distribution différentielle des ions de part et d'autre de la membrane et le potentiel de la membrane ( $E_m$ ). La concentration intracellulaire des ions  $K^+$  est environ 25 fois plus élevée que celle extracellulaire et le  $E_m$  se situe aux environs de -45 à -60Mv.

Donc, la force résultante est dirigée vers l'extérieur de la cellule, vers un efflux de  $K^+$  lors de l'ouverture des canaux. La conséquence de cette perte d'ions positifs est une hyperpolarisation de la membrane. Il est fort possible que l'ouverture de quelques canaux soit suffisante pour induire un léger changement dans le  $E_m$ , ce qui pourrait amener une série de réactions cellulaires conduisant à une relaxation [26,134].

Les activateurs de tous les canaux potassiques agissent en se fixant à un canal, en changeant sa conformation et/ou en augmentant sa probabilité d'ouverture. Cette plus grande probabilité d'ouverture permet le mouvement d'ions potassiques vers le milieu extracellulaire. Cette sortie d'ions positivement chargés engendrera une hyperpolarisation de la cellule. Cette diminution du potentiel membranaire réduit la probabilité d'ouverture des CCDVs de type L et T, diminue la formation d'inositol tri-phosphate ( $IP_3$ ) ce qui restreint la libération du calcium contenu dans les réserves intracellulaires et diminue donc la réactivité tissulaire en diminuant la sensibilité des fibres contractiles pour le calcium [26;53;134]. L'hyperpolarisation intracellulaire pourrait également augmenter la capacité de liaison de la membrane pour le calcium diminuant ainsi la concentration de calcium libre [133]. Comme pour la nifédipine, les activateurs des canaux potassiques utilisés seront discutés plus en détails.

#### *1.6.1.1. La cromakalime*

La cromakalime, un activateur des canaux  $K_{ATP}$ , appartient à la famille des benzopyranes. Il a été démontré que ces agents hyperpolarisent la membrane cellulaire de myocytes d'aorte de rat en augmentant leur probabilité d'ouverture [14].

Dans des études électrophysiologiques, il a été démontré que le courant activé par la cromakalime ou la levcromakalime, son isomère actif, est indépendant du voltage et peut être inhibé par la glibenclamide (inhibiteur des canaux  $K_{ATP}$ ), ce qui suggère que la cromakalime agit bel et bien sur les canaux  $K_{ATP}$  [136]. Elle diminue la durée du potentiel d'action dans les cellules excitables sans affecter la vitesse de dépolarisation [37]. Elle peut inhiber la phase tonique d'une stimulation à la noradrénaline de façon dépendante de la concentration dans les aortes de lapin. Cet effet est inhibé par la glibenclamide. [37] La cromakalime peut également inhiber le remplissage des réserves de calcium intracellulaire. La diminution d'influx  $Ca^{2+}$  par la cromakalime n'est pas due à une action directe sur les canaux opérés par le voltage ou sur l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  [15].

#### 1.6.1.2. Le NS-1619

Le NS-1619 est un activateur sélectif des canaux  $K_{Ca}$  qui appartient au groupe des benzimidazolones. Le NS-1619 est une molécule hétérocyclique très lipophile dont les effets sur les canaux  $K_{Ca}$  sont dépendants de sa concentration. Son action résulte en une réduction du potentiel membranaire qui peut aller jusqu'à 50mV plus négatif [122]. Des études électrophysiologiques ont démontré que le NS-1619 augmente le courant potassique rectificateur sortant d'une façon dépendante de la concentration et diminue les réponse contractiles induites par des stimulations électriques dans les vas deferens de rats. À 40 $\mu$ M, le NS-1619 hyperpolarise la membrane d'environ 25 mV [122]. Il hyperpolarise également les cellules musculaire lisses aortiques de bœuf [36]. Des concentrations de 3 et 30 $\mu$ M augmentent la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{Ca}$  de 5 et 138 fois respectivement sans altérer



leur conductance. Ces concentrations sont suffisantes pour induire une hyperpolarisation et démontrent que les canaux  $K_{Ca}$  peuvent substantiellement influencer le potentiel membranaire au repos. En l'absence de calcium intracellulaire, le NS-1619 ne peut pas activer les canaux  $K_{Ca}$ , ce qui indique qu'il ne peut pas remplacer le rôle du calcium dans l'ouverture des canaux  $K_{Ca}$ . [122].

### **1.6.2. Généralités sur les inhibiteurs de canaux potassiques**

À l'opposé des activateurs de canaux potassiques, les inhibiteurs réduisent la probabilité d'ouverture et empêchent donc la sortie spontanée des ions potassiques. Les inhibiteurs permettent donc le maintien de l'équilibre ionique de la cellule. En réduisant les mouvements ioniques, ils provoquent une dépolarisation du potentiel membranaire. Ils ont principalement des effets inverses à ceux schématisés à la figure 3. Le potentiel se situe alors plus près du potentiel seuil des canaux calciques dépendant du voltage, soit le principal déclencheur de la contraction des muscles lisses vasculaires [26; 133]. Comme pour la nifédipine, la cromakalim et le NS-1619, l'inhibiteur des canaux potassique utilisé sera décrit.

#### **1.6.2.1. Le tétraéthylammonium**

Le tétraéthylammonium (TEA) est un agoniste des récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Il porte une charge positive qui lui confère un pouvoir dépolarisant au niveau des cellules musculaires lisses, effet semblable à celui du chlorure de potassium. De plus, il possède la qualité d'inhibiteur non sélectif de plusieurs canaux potassiques. Cet inhibiteur non spécifique n'a pas d'effet au niveau

des canaux potassiques à rectification interne [135]. De hautes concentration de TEA, supérieure à 10 mM, sont requise afin d'inhiber les canaux potassiques dépendants du voltage (Kv) [17]. Une concentration de 6.2 à 7mM de TEA est requise pour inhiber de moitié (IC<sub>50</sub>) les canaux potassiques situés sur les cellules musculaires lisses d'artères mésentériques [6] et de veine porte de lapin [135]. Les canaux potassiques dépendant du calcium sont les plus sensibles aux effets inhibiteurs du TEA. Il faut environ 0.1 à 1mM d'agent afin d'inhiber ces canaux au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires [17].

### **1.7. Les endothélines**

Les endothélines sont des peptides vasomoteurs produits par l'endothélium vasculaire. À partir de cellules endothéliales d'aorte porcine, un facteur d'origine peptidique ayant des propriétés vasoconstrictrices importantes fut extrait et nommé endothéline-1(ET-1) [174]. Par la suite, deux isoformes de l'ET-1 furent identifiées, l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3). Ces trois endothélines sont codées par trois gènes distincts et sont sécrétées à partir de la pré-pro-endothéline par un processus enzymatique identique [81;105]. Les endothélines sont dérivées d'un précurseur peptidique, la pré-pro-endothéline, qui devient la pro-endothéline (aussi appelée la big-endothéline) suite à son clivage par une convertase, la furine. Finalement, la pro-endothéline devient l'endothéline grâce à l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) située, tout comme la furine, dans les cellules endothéliales [95]. Les endothélines agissent via leurs récepteurs qui sont de type A, B ou C.

### **1.7.1. Les récepteurs de l'endothéline**

Les gènes codant pour les récepteurs humains de l'endothéline de type A et B ont été clonés. Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G, plus spécifiquement  $G_{q/11}$  [2]. Les gènes ETAR et ETBR humains possèdent au moins 85% d'identité structurale avec ceux identifiés dans d'autres espèces de mammifères, telles que le rat, le porc et le bœuf. En revanche, il n'y a que 59% de similitude entre les récepteurs de l'endothéline humain de type A et B.

Lorsqu'ils sont activés, par le biais de protéines G (sensibles à la toxine pertussique dans le muscle vasculaire), ces récepteurs activent la phospholipase C qui, à son tour, produit deux seconds messagers; l'inositol triphosphates ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). Les  $IP_3$  mobilisent le calcium cytoplasmique et le DAG est responsable de l'activation de la protéine kinase C. Cette cascade d'événements intracellulaires mène au développement des mécanismes contractiles (muscle) ou sécrétoires (cellules endothéliales) [90;148].

#### **1.7.1.1. Récepteur de type A ( $ET_A$ )**

Ce récepteur répond aux trois endothélines selon l'ordre de puissance suivant :  $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ . [75]. Il est exprimé abondamment sur les cardiomyocytes et sur les cellules musculaires lisses où il médie des vasoconstrictions via la voie de la phospholipase C décrite précédemment [102].

Des souris transgéniques homozygotes déficientes en récepteurs  $ET_A$  développent des malformations physiques sévères. Cette observation suggère que les récepteurs  $ET_A$  sont impliqués de façon essentielle dans les mécanismes de croissance et de développement [57]. De plus, l'importance physiologique des récepteurs  $ET_A$  dans le maintien du tonus vasculaire et de la pression artérielle a été démontrée [67].

La régulation de la production de récepteur  $ET_A$  est souvent parallèle à celle de l'endothéline-1. Les facteurs de croissance épidermiques, l'AMPc et l'œstrogène induisent la production de récepteurs  $ET_A$  alors que l'endothéline-2, l'endothéline-3, l'angiotensine II et les facteurs de croissance dérivés des plaquettes inhibent la production de récepteurs  $ET_A$ . [102]

#### *1.7.1.2. Récepteur de type B ( $ET_B$ )*

Ce récepteur répond aux trois endothélines de façon équivalente [75]. Il est exprimé de façon prédominante sur les cellules endothéliales et de façon beaucoup moins importante sur les cellules musculaires lisses [102]. La clairance de l'endothéline est une fonction associée aux  $ET_B$ . Ce rôle a été confirmé en établissant la corrélation nette entre l'élévation de l'endothéline plasmatique et l'administration d'antagonistes des  $ET_B$  [170].

Tout comme les  $ET_A$ , les  $ET_B$  peuvent activer la voie de la phospholipase C. Toutefois, ils sont aussi liés à une protéine G inhibitrice qui peut mener à l'inhibition de la synthèse d'AMPc et à l'activation de l'antiport  $Na^+/H^+$ . Une dilatation des

muscles lisses vasculaires est causée via la relâche d'oxyde nitrique et de prostacycline par l'endothélium lorsque les récepteurs  $ET_B$  présents dans cette structure sont activés [170]. Bien qu'un rôle de vasodilatation via l'activation des  $ET_B$  endothéliaux leur soit essentiellement attribué, les  $ET_B$  pourraient également jouer un rôle vasoconstricteur sur les cellules musculaires lisses. Ce rôle demeure controversé.

Bien que les récepteurs  $ET_B$  de rat et de l'homme soient identiques à 95%, le BQ-788, un antagoniste peptidique sélectif des  $ET_B$ , a une affinité différente pour les récepteurs  $ET_B$  des deux espèces. Ces différences d'affinité semblent liées au fait que le BQ-788 se fixe sur des portions protéiques distinctes de ces deux types de récepteurs  $ET_B$  dans ces deux espèces. De plus, l'existence de deux sous-types de récepteurs  $ET_B$ ,  $ET_{B1}$  et  $ET_{B2}$ , a été suggérée.  $ET_{B1}$  serait le sous-type de récepteur retrouvé sur l'endothélium responsable de la relâche de vasodilateurs. Quant à  $ET_{B2}$ , il serait localisé sur les muscles lisses vasculaires et non vasculaires pour y médier des effets constricteurs. Cette classification n'est toutefois pas justifiée par des études de caractérisation rigoureuses et devra être validée par des études de biologie moléculaire [75]

#### 1.7.1.3. Récepteur de type C ( $ET_C$ )

Ce récepteur a été cloné à partir de la peau de grenouille *Xenopus laevis* et possède une affinité plus grande pour l'endothéline-3 que l'endothéline-1. Chez la grenouille, ce récepteur est retrouvé dans l'hypophyse antérieure, les *vas deferens* et le myocarde. [87] Chez les mammifères, aucune évidence moléculaire ne vient

confirmer jusqu'à ce jour que le récepteur de l'endothéline de type C existe et ce récepteur est mis en évidence seulement de façon indirecte par des approches pharmacologiques. Ses fonctions sont donc encore très mal connues [131]. Actuellement, seule la nomenclature  $ET_A$  et  $ET_B$  des récepteurs de l'endothéline est retenue par l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR) [75].

### **1.7.2. Les ligands des récepteurs de l'endothéline.**

Les ligands des récepteurs de l'endothéline, agonistes ou antagonistes, sont majoritairement de nature peptidique. Actuellement, il existe des agonistes et des antagonistes sélectifs de même que non sélectifs majoritairement pour les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . La majorité des antagonistes développés ont une très grande affinité pour les récepteurs  $ET_A$ . Typiquement, la constante d'inhibition,  $K_i$ , est inférieure à 1nM pour les récepteurs  $ET_A$ . Seuls les ligands des récepteurs de l'endothéline utilisés seront décrits.

#### **1.7.2.2. La sarafotoxine 6c**

La sarafotoxine 6C est un homologue peptidique des endothélines utilisé comme agoniste sélectif des récepteurs  $ET_B$ . Cette toxine, provenant du venin d'*Actractaspis engaddensis*, a permis l'identification des récepteurs fonctionnels  $ET_B$  dans le muscle lisse vasculaire humain. Toutefois, contrairement aux endothélines, il est connu que la sarafotoxine 6C peut activer des mécanismes intracellulaires au niveau du cervelet de rat via une voie qui n'implique pas le couplage du récepteur à une protéine  $G_{q/11}$ . Il est donc possible que les effets vasoconstricteurs médiés par la

sarafotoxine 6C chez les muscles lisses impliquent l'activation de sites distincts de ceux proposés pour les récepteurs ET<sub>B</sub>. [42;153]

La sarafotoxine 6c a permis de démontrer plusieurs rôles attribués aux récepteurs ET<sub>B</sub>. Par exemple, chez des cellules endothéliales canines stimulées à la sarafotoxine 6C, il a été démontré que les récepteurs ET<sub>B</sub> augmentent la sécrétion d'adrénomédulline, un peptide circulant aux propriétés vasodilatrices et natriurétiques originaire de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaires lisses. Ceci confère aux récepteurs ET<sub>B</sub> un rôle de régulation autocrine-paracrine du système vasoactif endothélial [170].

#### 1.7.2.3. Le BQ123

Le BQ123 est un antagoniste peptidique sélectif des récepteurs ET<sub>A</sub>. L'administration par voie intra-artérielle de BQ123 induit une vasodilatation marquée dans l'avant bras chez l'homme. Cette observation confirme le rôle des ET<sub>A</sub> dans le maintien du tonus vasculaire. Aussi, le BQ123 réduit de façon marquée la pression artérielle chez le cobaye, suggérant que les récepteurs ET<sub>A</sub> sont impliqués dans le maintien de la pression artérielle. [75]

## **1.8. Réactivité vasculaire durant la gestation et agents utilisés**

### **1.8.1. Réactivité vasculaire durant la gestation**

Pour des raisons encore mal comprises, les mécanismes de contraction et de relaxation du muscle lisse vasculaire sont modifiés durant la grossesse. Lors de la gestation, la résistance périphérique est diminuée. Ceci s'accompagne d'une diminution de la réactivité aux agents vasoconstricteurs. La diminution de résistance périphérique est un phénomène important dans le changement de réactivité vasculaire au cours de la gestation. Ce phénomène de réactivité vasculaire diminuée pourrait être dû à une diminution de la densité des récepteurs, une diminution de la sensibilité vasculaire aux agents presseurs ou à une augmentation de la production de vasodilateurs endogènes [83]. Plusieurs autres caractéristiques de la gestation sont suggérées comme explication aux changements de réactivité vasculaire. Par exemples, l'augmentation de la compliance vasculaire, les modifications de la fonction des canaux calciques, l'hyperpolarisation des cellules de muscles lisses vasculaires et l'augmentation de l'activité de certains canaux potassiques.

Une augmentation de la compliance vasculaire a été rapportée chez la femme durant la grossesse. Il est connu que la compliance de l'aorte est augmentée en fin de gestation mais non à la mi-gestation [27]. Cette observation a été obtenue en mesurant la résistance à l'étirement passif de vaisseaux isolés de rates gestantes. Ainsi, pour un même étirement, les vaisseaux de rates gestantes développaient moins de tension que ceux de rates non gestantes [124]. Cette diminution de résistance à l'étirement serait liée à une modification du contenu en



collagène/élastine (favorisant l'élastine) ou à une dilution du tissu conjonctif (une réduction du contenu total en fibres de collagène et d'élastine. Il a été observé que l'index de collagène et la concentration d'élastine sont réduits en fin de gestation, ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, la diminution de réactivité vasculaire caractérisant la grossesse [156]

Les résultats de Roy et al. [140] démontrent une diminution d'efficacité des bloqueurs de canaux calciques dépendant du voltage à inhiber la contraction du muscle lisse vasculaire aux agents vasoconstricteurs lors de la grossesse chez la rate. Leurs travaux suggèrent une modification de la fonction des canaux calciques dépendant du voltage, plus précisément les canaux calciques de type L, qui aurait lieu suite à une modification du potentiel membranaire. Il est montré que, durant la gestation, la captation du calcium est diminuée. Chez des rates non gestantes et gestantes, Ezimokhai et al. [39] ont démontré que la diminution de pression artérielle induite par l'administration d'une diète supplémentée de calcium est médiée via une atténuation de la réactivité vasculaire. Ils ont conclu que le supplément calcique est associé à une diminution de la réactivité vasculaire qui serait dépendante de l'endothélium et qui impliquerait une augmentation de la stimulation de la voie oxyde nitrique-guanylate cyclase.

Une hyperpolarisation de 7mV de la membrane des muscles lisses vasculaires des artères mésentériques de rates gestantes comparées aux non gestantes a été rapportée [109]. Cette hyperpolarisation pourrait certainement contribuer à la réponse diminuée aux vasoconstricteurs durant la gestation. En effet, une diminution de la sensibilité en réponse à une élévation de la concentration de

potassium est observée [109]. Notre laboratoire a démontré que le tétraéthylammonium (TEA), un inhibiteur non sélectif des canaux  $K^+$ , et le BayK 8644, une dihydropyridine activatrice des canaux calciques, ont des effets contractiles dans les aortes thoraciques de rates non gestantes, mais ces effets contractiles sont absents dans les vaisseaux de rates gestantes. Par contre, lorsque le potentiel membranaire est modulé par la préincubation des tissus de rates gestantes avec 5 et 10 mM de chlorure de potassium (KCl), on peut alors restaurer la réactivité au TEA et au BayK 8644 [18;140;141].

Il a également été démontré dans nos laboratoires que les canaux  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  sont impliqués dans la diminution de réactivité vasculaire observée durant la gestation [18;140;141]. Les résultats montrent que les canaux  $K_{Ca}$  seraient plus impliqués dans l'atténuation de réponse aux vasoconstricteurs, tels PHE, AVP et KCl, observée durant la gestation. Quant aux canaux  $K_{ATP}$ , ils seraient impliqués dans ce qui semble être une différence de potentiel membranaire [18]. On croit que la capacité générale des canaux potassiques à être inhibée, que ce soient les  $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca}$  ou les  $K_V$ , serait réduite durant la gestation, ce qui supporterait leur implication dans l'hyperpolarisation proposée de la membrane. Durant la gestation, certains canaux  $K_{ATP}$  seraient à l'état ouvert au repos, possiblement en réponse à une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP. Cette ouverture de quelques canaux résulterait en une augmentation de la polarité membranaire, qui pourrait également être due à une différence de conformation ou de régulation des canaux  $K_{Ca}$ . Les canaux  $K_{Ca}$  étant également ouverts, il y aurait accentuation de l'hyperpolarisation et retard de l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage, conséquemment retard de la contraction [18]. De plus, l'activité des canaux

$K_{ATP}$  semble être impliquée dans la modulation de la résistance vasculaire systémique et utérine. Durant la grossesse chez le cochon d'Inde, l'activité des canaux  $K_{ATP}$  est augmentée dans le lit vasculaire utérin, rénal et cérébral. Cette augmentation d'activité des canaux  $K_{ATP}$  semble influencer le contrôle régional de la résistance vasculaire durant la grossesse chez le cochon d'Inde. En inhibant les canaux  $K_{ATP}$  par l'infusion de glibenclamide, Keynes et al. [91] ont observé une augmentation de la résistance vasculaire qui était plus importante chez les sujets gestants que non gestants.

La réactivité vasculaire est connue comme étant altérée durant la prééclampsie lorsque comparée à celle retrouvée durant la gestation normale. Les changements surviennent même plusieurs semaines avant la manifestation de symptômes cliniques de la prééclampsie. L'altération de la réactivité vasculaire durant la prééclampsie apparaît comme étant indépendante de la pression artérielle. La cause des différences de réactivité vasculaire entre les vaisseaux de femmes dont la grossesse est normale et de femmes prééclamptiques est inconnue. Toutefois, elle semble être attribuée, du moins en partie, à des altérations des mécanismes de relaxation dépendants de l'endothélium et à des anomalies de la voie de synthèse du monoxyde d'azote [165].

Durant la grossesse normale et la prééclampsie, les vaisseaux montrent également des propriétés mécaniques distinctes. Dans les vaisseaux de femmes prééclamptiques, le ratio de l'épaisseur de la média vs le diamètre de la lumière est augmenté [165].

## **1.8.2 .Mécanismes d'action des agents pharmacologiques utilisés**

### **1.8.2.1. La stimulation $\alpha$ -adrénergique**

La phényléphrine (PhE) est un agoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques. Ceux-ci sont couplés à une protéine G de type Gq. La protéine Gq active la phospholipase C- $\gamma$ (PLC $\gamma$ ) qui hydrolyse alors des polyphosphoinositides (PIP<sub>2</sub>) pour produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) qui vont respectivement activer la protéine kinase C (PKC) et provoquer la relâche de Ca<sup>2+</sup> des réserves du réticulum sarcoplasmique [154].

Les stimulations  $\alpha$ -adrénergiques dans les muscles lisses vasculaires peuvent être séparées en composantes phasique et tonique. La composante phasique serait probablement dépendante du calcium présent dans les réserves intracellulaires. Quant à la composante tonique, elle serait dépendante du calcium provenant du milieu extracellulaire et à l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub>. Il est probable que le DAG, via PKC, permet l'ouverture de canaux calciques situés à la surface cellulaire. Ceci résulte en une entrée massive de calcium du milieu extracellulaire. Cette voie augmente et maintient la contraction du muscle lisse vasculaire et serait responsable de la composante tonique, donc du maintien de la contraction. [132; 140].

L'augmentation intracellulaire de la concentration de calcium provoquée par la PHE peut induire l'ouverture des canaux K<sub>Ca</sub> et K<sub>v</sub> [154].

### 1.8.2.2. La vasopressine

La vasopressine est contenue dans les extraits du lobe postérieur de l'hypophyse. Ces deux principaux sites d'action sont le rein et les muscles lisses où elle exerce respectivement des effets antidiurétiques et vasoconstricteurs. L'effet constricteur est exercé via les récepteurs  $V_1$  qui causent une augmentation du calcium intracellulaire. Quant à l'effet antidiurétique, il est causé via les récepteurs  $V_2$  qui stimulent la production d'AMPc. Elle provoque une diminution du volume urinaire conduisant à une légère augmentation du volume circulant, sans changement substantiel de la pression sanguine chez les femmes non-gestantes [30;167]

Son mécanisme d'action exact reste encore inconnu, mais s'apparenterait à celui de la PhE. Il est connu que l'AVP augmente la concentration intracellulaire de calcium via l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et de 1,2-diacylglycérol (DAG). La formation de ces molécules conduit respectivement à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire via la vidange des réserves et l'activation de PKC [167]. Les contractions induites par l'AVP sont sensibles à l'influx de calcium via les canaux calciques dépendant du voltage et sont donc sensibles au potentiel membranaire. Il a été proposé que l'influx de calcium intracellulaire via les canaux calciques de type L est plus important dans l'effet constricteur de l'AVP et qu'à l'opposé, la contraction induite par PHE est plus dépendante de la relâche de calcium des réserves intracellulaires combinée à l'influx calcique via les canaux calciques opérés par des récepteurs [35]

### 1.8.2.3. Le chlorure de potassium

Le chlorure de potassium (KCl) n'interagit pas avec un récepteur, mais provoque des contractions en utilisant la dépolarisation comme mécanisme de base. Le KCl, en augmentant la concentration de potassium extracellulaire, provoque une diminution de la différence de potentiel de la cellule qui est suffisante pour provoquer l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et ainsi permettre l'entrée du calcium dans la cellule. Le calcium peut alors se lier à la calmoduline, l'activer et ainsi permettre la contraction de fibres contractiles en réponse à une augmentation de calcium cytosoliques [140].

### 1.8.2.4. L'endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1), peptide de 21 acides-aminés, est la seule membre de la famille des endothélines à être produite à la fois dans les cellules endothéliales et de muscles lisse vasculaire. Elle lie préférentiellement les récepteurs ET<sub>A</sub> et possède une activité vasoconstrictrice très puissante.

L'ET-1 est impliquée dans une multitudes de mécanismes cellulaires, physiologiques et physiopathologiques. Elle serait impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque, d'hypertension, d'hypertension pulmonaire et d'insuffisance rénale [59]. Chez les patients atteints d'hypertension essentielle, les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont normales [175]. De plus, chez les souris où un allèle du gène de l'ET-1 a été rayé, la pression sanguine est augmentée légèrement. Ceci suggère que l'ET-1 n'a pas de rôle certain à jouer dans

cette pathologie [99]. Toutefois, les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont augmentées de deux à trois fois chez les femmes pré-éclampsiques alors qu'elles sont inchangées durant la grossesse normale. Il est connu que l'ET-1 est produite par les cellules amniotiques et endométriales. Conjointement avec la diminution de production de prostacycline et d'oxyde nitrique, l'ET-1 pourrait contribuer à l'hypertension caractérisant la pré-éclampsie [14]. Sur les muscles lisses vasculaires, l'ET-1, en plus de stimuler les récepteurs  $ET_A$ , peut également agir en ouvrant des canaux calciques de type L ainsi que des canaux potassiques [75]

### **1.9. But de l'étude**

La grossesse est une condition physiologique qui amène des adaptations de la vasculature afin de veiller au bien-être de la mère et du fœtus. Si ces adaptations ne surviennent pas, des complications peuvent survenir, comme dans le cas de la prééclampsie. La prééclampsie est la cause majeure de restriction de croissance intra-utérine, de morbidité et mortalité maternelle et fœtale en période périnatale. L'étiologie exacte est loin d'être élucidée. Des altérations spécifiques au niveau de la vasculature pourraient être à la base des changements de pressions artérielles et de réactivité vasculaire durant la prééclampsie. La prééclampsie étant un syndrome spécifique à l'humain, l'absence de modèles animaux complets empêche la détermination des mécanismes physiopathologiques de ce syndrome.

Les travaux effectués dans nos laboratoires ont démontré que, malgré une activation accrue du système rénine-angiotensine-aldostérone induite par une diète faible en sodium, la diminution de pression artérielle en fin de gestation chez la rate a

toujours lieu chez la rate [142]. Nous nous sommes alors intéressés au phénomène inverse, soit à l'effet de suppléments sodiques dans le breuvage (0.9% NaCl et 1.8% NaCl) . Nous avons découvert que l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone induite par les suppléments sodiques provoquait soit l'absence de diminution de pression (supplément 0.9% NaCl), soit une augmentation de la pression artérielle (supplément 1.8% NaCl) en fin de gestation chez la rate. De plus, la prise de suppléments sodiques, 0.9% et 1.8% NaCl, s'accompagne de protéinurie. Ces résultats suggèrent donc que les rates gestantes recevant un supplément sodique, surtout 1.8% NaCl, développent des caractéristiques ressemblant à la prééclampsie [4].

Ayant en main un modèle d'hypertension de grossesse, il nous est alors paru essentiel d'en étudier la réactivité vasculaire afin de mieux caractériser le modèle par analogie à la maladie humaine. Nous nous demandons si la modulation de la pression artérielle en fin de gestation chez la rate par les supplément sodiques 0.9% NaCl et 1.8% NaCl s'accompagne de changements au niveau de la réactivité vasculaire. Les suppléments sodiques renversent-ils également la diminution de réponse aux agents vasoconstricteurs durant la gestation? Entraînent-ils une augmentation de la réponse contractile? La réponse à l'endothéline-1, le potentiel membranaire, les canaux potassiques et calciques sont-ils influencés par les suppléments 0.9% et 1.8% NaCl? La présente étude a été entreprise dans le but de répondre à ces questions.



**2. ARTICLE 1**

SODIUM SUPPLEMENTS DURING GESTATION : EFFECTS ON  
VASCULAR REACTIVITY AND K<sup>+</sup> AND Ca<sup>2+</sup> CHANNELS FUNCTIONS.

(article in preparation)

Karine Auger, Annie Beauséjour, Michèle Brochu and  
Jean St-Louis\*

Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada and  
Departments of Obstetrics-Gynecology and Pharmacology, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada

\* Address for reprints:

Jean St-Louis

Centre de recherche

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Email: [stlouisj@justine.umontreal.ca](mailto:stlouisj@justine.umontreal.ca)

Tel (514) 345-4931 ext 2996

Fax (514) 345-4994

Running title: Effects of sodium supplementations on vascular reactivity during rat  
pregnancy

## Abstract

Normal pregnancy is associated with hyperpolarisation of vascular smooth muscle, activation of  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  channels and diminution of voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels activity. Pregnant rats, on sodium supplementations, show physiological changes that correspond to those observed during preeclampsia. The purpose of this study was to investigate the influence of sodium supplementations on potassium and calcium channels activities in blood vessels during rat pregnancy. Sodium supplementations of 0.9% and 1.8% NaCl in drinking water were given to non-pregnant and pregnant rats for 7 days corresponding to the last week of gestation. Modulation of potassium and calcium channels by sodium supplementations was studied in aortic rings contracted by phenylephrine (PhE), KCl and vasopressin (AVP). Tetraethylammonium (TEA), a nonselective  $K^+$  channels inhibitor, induced by itself concentration-dependent responses only in aortic rings of non-pregnant rats. These responses to TEA were restored in aortic rings of pregnant rats after pre-incubation with 10mM KCl. Sodium supplements did not modify responses to TEA in the pregnant group. Concentration-responses curves to PhE, KCl and AVP were obtained in the absence or presence of cromakalim ( $K_{ATP}$  opener), NS-1619 ( $K_{Ca}$  opener) and nifedipine (voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels). Maximum responses to PhE and AVP were increased by sodium supplements during gestation whereas the sensitivity to KCl was diminished. The inhibitory effect of cromakalim was more important in aortic rings of non pregnant rats when animals were under normal diet whereas it became the same in tissues of both groups when animals were under 0.9% and 1.8% NaCl. NS-1619 had similar effects in both non-pregnant and pregnant animal which were diminished when rats were under sodium supplements. Nifedipine produced larger inhibition of contractile responses in tissues

of non-pregnant rats under normal diet and his effects increased when pregnant rats received sodium supplemented diet. These results suggest that preeclampsia may be characterised by a decreased activity of  $K_{ATP}$  channel and by enhanced activities of  $K_{Ca}$  and voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels.

## Introduction

During normal pregnancy in rats, plasma volume and cardiac output are increased whereas peripheral resistance and arterial blood pressure are decreased (20, 3). The decreased of arterial blood pressure has been associated with diminished influences of vasoconstrictors on blood vessels, hence causing a diminution of peripheral resistance (27). However, the physiological influences that mediate the decrease in blood pressure remain unknown.

Blunted responses to vasoconstrictors (28, 13) is a characteristic of gestation. It was observed in isolated blood vessels in the presence and absence of endothelium during rat pregnancy (20, 21, 28), indicating that it is not a consequence of cardiovascular reflex (5, 13), nor linked to a downregulation of receptors for vasoconstrictors (4), or an increase of endogenous vasodilator release (28). Mechanisms proposed to explain this resistance of pregnancy to vasopressors are thought to be consequent of decreased myogenic responses of blood vessels or uncoupling of receptor-response leading to contraction (19).

Voltage-operated calcium channels antagonists are less efficient in inhibiting vascular smooth muscle responses to vasoconstrictors during rat pregnancy (22). Function of voltage-operated calcium channels, especially L type calcium channels, seems to be altered as a consequence of some modification of membrane potential during pregnancy. Roy and al. (22) demonstrated that gestation is characterised by a diminished calcium influx in isolated aorta, suggesting that mechanisms using calcium during vascular smooth muscle contraction could be altered.

Smooth muscle cell of mesenteric resistance arteries of pregnant rats has been reported to be hyperpolarized by 7mV (14). Recent works from our laboratory support this observation. Indeed, we have demonstrated that tetraethylammonium (TEA), a non-selective potassium channels inhibitor, and BayK 8644, a dihydropyridine calcium channels activator, have contractile effects in thoracic aorta of non- pregnant rats, but not in tissues of pregnant animals. However, when membrane potential was modulated by pre-incubating the aortic rings of pregnant rats with low concentrations of KCl, contractions to TEA and BayK 8644 were obtained as in rings of non-pregnant animals (2, 22).

Potassium and calcium channels were reported to be involved in blunted responses to vasoconstrictor during pregnancy (2, 22). High-conductance calcium-activated potassium channels ( $K_{Ca}$ ) were described as activated during gestation to decrease responses to phenylephrine (PHE), vasopressin (AVP) and chloride potassium (KCl), during gestation. Activation of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) appeared to be involved in regulation of resting membrane potential, though to be increased during pregnancy. During pregnancy,  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  seem to be already in open state in resting condition; this would bring an increase of membrane polarity. This hyperpolarisation could result in delayed opening of voltage-operated calcium channels and, consequently, a delayed contraction (2).

Several observations suggested that the late pregnancy-associated decrease in blood pressure is linked to diminished VDCC function. However, activation of

calcium channels, induced by treating pregnant rats with a calcium channel activator, CGP 28392 (10mg/Kg/day), did not reverse the decrease in blood pressure of pregnant animals. Moreover, treatment with CGP 28392 (10mg/Kg/day) did not modify the reduced influence of VDCC modulators, nifedipin and BayK 8644, on responses of aortic rings to KCl (26, in press)

Renin-angiotensin-aldosterone system is activated when low sodium diet is given to rats. When pregnant rats are so treated, the reduction of blood pressure still occurs (23). With opposite intervention, supplementing the diet with 0.9% NaCl and 1.8% NaCl in the drinking water, we observed inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system, but most importantly, prevention of the decrease in arterial blood pressure (0.9% NaCl supplement) or induction of increased arterial blood pressure (1.8% NaCl supplement) at the end of pregnancy.(1, unpublished)

In order to document the consequences of these treatments or the consequent modulation of blood pressure on vascular reactivity, we investigated the responses of the thoracic aorta of these rats to several vasoconstrictors, as well as the modulation of these responses by calcium channel inhibitor and potassium channels activators. We postulated that with reversal or increase in blood pressure, observed with NaCl supplements diets in pregnant rats, the decreased vascular reactivity of the aorta, normally observed in pregnant animals, will be reverted.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) weighing 225-250g and aged 10-11 weeks were mated with males. The morning when spermatozoa were found in vaginal smears was deemed to be day 1 of pregnancy. Nonpregnant rats of the same age served as control and were picked randomly during the oestrous cycle. All animals were housed under controlled lighting (from 0600 to 1800 h) and temperature ( $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) and received normal diet (Charles River Rodent chow no 5075). This study received approval from the institutional animal care committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

### *Treatment protocol*

The rats were divided into 6 groups: non-pregnant and pregnant controls received tap water, non-pregnant and pregnant experimental animals were given 0.9% NaCl or 1.8% NaCl as beverage. The treatments lasted for 7 days, from day 15 of experimentation until day 22, which corresponds to the last week of 3 weeks gestation.



### *Physiological measurements*

Systolic blood pressure was measured by the indirect tail-cuff method (50-0001-rat tail blood pressure apparatus; Harvard Apparatus Canada, St-Laurent, QC, Canada). The animals were trained for blood pressure measurement on days 5 to 11. Then, systolic blood pressure was recorded from day 12 until day 22 (corresponding to the end of treatment). Data were compared with a two-factor analysis of variance with repeated measures.

### *Organ bath assay*

Vascular reactivity was measured in thoracic aorta rings as previously described (28, 21). After decapitation, the thoracic aorta was removed rapidly, cleaned of fat and extraneous tissue and cut into 4 consecutive rings (2-3 mm). The endothelium of each ring was gently removed by rubbing the lumen with an 18-gauge needle. Rings were mounted in individual jacketed tissue baths (15 mL; Radnotti Glass, Monrovia, CA) maintained at 37°C and equilibrated for 60 min under 2.0 g passive tension with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in Krebs bicarbonate solution (KBS) of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5.5 dextrose. The solution was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>; pH was 7.4. After equilibration, the tissues were challenged with 1.0 µmol/L phenylephrine. At plateau response, carbachol (0.1 mmol/L) was added to verify removal of the endothelium. Tension was measured by force-displacement transducers and recorded on a computerized data acquisition system using Work Bench software

(Kent Scientific, Litchfield, CT). The experiments with NS-1619 were performed under sodium lamps to prevent photodegradation of the substance

#### *Experimental protocol*

In a first set of experiments, cumulative concentration-response curves to TEA (0.3-30 mmol/L) were performed on aortic rings without and with preincubation with low concentration of KCl (10mmol/L).

In other experiments, cumulative concentration-response curves to AVP ( $10^{-11}$  to  $10^{-7}$  mol/L), PhE ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$ ) and KCl (2-100 mmol/L, as hypertonic solution) were obtained. The three curves were separated by frequent washing and performed one hour after return to baseline. In each experiment, four aortic rings of both non-pregnant and pregnant rats were assayed simultaneously. One of the rings of both non-pregnant and pregnant rats (control and treated) served as control, while each of the other rings were pre-incubated with nifedipine (0.1  $\mu$ mol/L), cromakalim (1  $\mu$ mol/L) or NS-1610 (10  $\mu$ mol/L) added 10 min before charting the curve. Concentration of these agents were obtained from previous work (2, 22 ). Each ring was exposed to only one concentration of the same inhibitor or activator throughout the experiment. The sequence of agonist stimulation was changed each day to avoid any effect of the previous curve on the subsequent one.

### *Data analysis*

Each concentration-response curve was analyzed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation with the Prism 3.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA) to evaluate the concentration producing 50% of the maximal response ( $EC_{50}$ ) and the maximum asymptote of the curve ( $E_{max}$ ).  $\Delta E_{max}$  and  $\Delta pD_2$  were calculated by subtracting each individual values of  $E_{max}$  or  $pD_2$ , obtained in presence of nifedipine, cromakalim or NS1619, from the appropriate basal response. Resulting responses were then managed to get an average. Different curves from the same protocol were compared by one-way ANOVA on mean  $pD_2$ , the negative logarithm of the  $EC_{50}$ , on mean  $E_{max}$ , on mean  $\Delta E_{max}$  and on mean  $\Delta pD_2$ . Data are expressed as mean experimental points with their standard error (SEM) along the best curve fitted to these points.

### *Drugs and chemicals*

All salts employed in these experiments were of analytical grade and obtained from Fisher Scientific (Montréal, QC). Phenylephrine hydrochloride, carbamylcholine chloride (carbachol), tétraéthylammonium chloride and cromakalim were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Nifedipine hydrochloride and NS-1619 were obtained from Research Biochemical International (Natick, MA). Cromakalim was prepared in 70% ethanol and NS-1619 was prepared in DMSO.

## Results

### Effects of pregnancy and sodium supplementations on TEA responses.

In aortic rings of animals under normal diet (no supplement), responses to TEA were obtained in non-pregnant, but not in pregnant rats (Fig.1, A<sub>1</sub>). This was also true in tissues from rats receiving either of the sodium supplements (0.9% and 1.8%) (Fig.1, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>). It should be noted that only with 1.8% NaCl supplement, maximal response to TEA was decreased in aorta of non-pregnant animals. Sensitivity to TEA in rings of non-pregnants was not significantly altered by the sodium supplements (Table 1).

When tissues were pre-contracted with 10mM KCl, responses to TEA were observed in rings of all pregnant groups (Fig.1, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> AND B<sub>3</sub>, open symbols). Response to TEA was increased in aorta of all the non-pregnant groups, as shown by significant increases of pD<sub>2</sub> in table 1. Maximal responses were not significantly affected. In tissues of pregnant animals, E<sub>max</sub> and pD<sub>2</sub> to TEA in the presence of 10Mm KCl were always smaller than in their associated non-pregnant group, except with the 1.8% NaCl supplement where the two curves are not significantly different.

Consequently, similar responses to TEA were obtained in aortic rings of pregnant animals when pre-contracted with 10mM KCl and in rings of non-pregnant animals under basal condition. This is true for rats under regular and 0.9% NaCl supplementation (Fig.1, C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>), but not under 1.8% NaCl supplementation (Fig.1,

C<sub>3</sub>). In this last condition, similar responses were obtained when both groups of aorta were pre-incubated with 10mM KCl (Fig.1, B<sub>3</sub>).

These data show that thoracic aorta, obtained during gestation, did not respond to TEA and that both NaCl supplements did not change this condition. Responses of the rings of pregnant rats were restored by pre-incubation of the tissues with 10mM KCl. In the presence of 10mM KCl, only supplementation of the diet with the higher amount of NaCl (1.8%) succeeded in restoring TEA responses to the level reached in aorta of non-pregnant rats.

*Effects of pregnancy and sodium supplementations on PhE responses.*

Compared to tissues of non-pregnant control rats, vascular reactivity for PhE, in the absence of antagonist, was reduced in aortic rings of pregnant control rats (Fig. 2, A<sub>1</sub>,  $P < 0.05$ ). This reduced vascular reactivity, induced by gestation, was reverted when rats are supplemented by 0.9% NaCl and 1.8% NaCl (Fig. 2, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>). Diets did not have any effect on tissues sensitivity of both non-pregnant and pregnant rats. It should be noted that only the 1.8% NaCl supplement induced a diminution of maximum response to PhE in aortic rings of non-pregnant animal whereas both 0.9% NaCl and 1.8% NaCl diets increased the maximum response to PHE in tissues of pregnant rats (Table 2).

Nifedipine reduced maximum responses to PhE in all conditions. In rats under normal diet, it diminished  $E_{max}$  significantly more in aorta of non-pregnant than pregnant rats (Table 2). When rats were supplied with both sodium diet (0.9% and

1.8% NaCl), the different inhibitory effect of nifedipine between non-pregnant and pregnant rats was no more present (Fig.2, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>). Similarly, when animals received normal diet, nifedipine reduced significantly the tissues sensitivity to PhE in non-pregnant rats whereas it did not reach significance in pregnant animal. The same observation was done when rats were under 0.9% NaCl diets. Otherwise, when both non-pregnant and pregnant rats received 1.8% NaCl supplement, sensitivity of aortic ring to PhE is no more significantly reduced by nifedipine.

Cromakalim reduced maximum responses to PhE in all conditions. In rats under normal, 0.9% NaCl and 1.8% NaCl diet, it diminished E<sub>max</sub> more in aorta of non-pregnant than pregnant rats (Table 2). It significantly reduced sensitivity to similar levels with the three diets in both non-pregnant and pregnant animals (Table 2).

Under normal diet, NS-1619 decrease maximum response to PhE in non-pregnant, but not in pregnant rats (Fig.2, C<sub>1</sub>). Under 0.9% NaCl supplement, the K<sub>Ca</sub> activator reduced significantly E<sub>max</sub> to similar levels in both non-pregnant and pregnant rats (Fig.2, C<sub>2</sub>). It also diminished maximum responses in rats receiving 1.8% NaCl supplement, but the effect was less important in aorta of non-pregnant than pregnant rats (Table 2). In non-pregnant rats, it should be noted that the inhibitory effect of NS-1619 over E<sub>max</sub> to PhE was more important when animals were under normal and 0.9% NaCl diets. NS-1619 did not have any influence on sensitivity to PhE (Table 2).

These results show that when rats were under both 0.9% and 1.8% NaCl, aortic ring responses to PhE were then identical in non-pregnant and pregnant animals. Similarly, the smaller inhibitory effect of nifedipine in aortic rings of pregnant control rat compared to non-pregnant control rat was not observed under both high sodium diets. Cromakalim showed also a smaller inhibitory effect in aorta of pregnant rats under normal diet. This effect was maintained in rats who received high sodium diets despite that the difference in reactivity between non-pregnant and pregnant animals was not anymore present. Under normal diet, NS-1619 induced a decreased responsiveness to PhE in non-pregnant, but not in pregnant rats. In both groups under 0.9% NaCl supplement, the  $K_{Ca}$  activator induced significant reduction in responsiveness to PhE. It did similar effects in rats receiving 1.8% NaCl supplement, but the effect was less important in aorta of non-pregnant rats compared to the ones receiving the regular diet (Table 2).

*Effects of pregnancy and sodium supplementations on KCl responses.*

Compared to tissues of non-pregnant control rats, vascular reactivity for KCl, in the absence of antagonist, was reduced in aortic rings of pregnant control rat (Fig. 3, A<sub>1</sub>,  $P < 0.05$ ). When rats received either of the sodium supplements (0.9% and 1.8%), this diminution of reactivity induced by gestation, which was not present with PhE, was conserved with KCl (Fig.3, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>,  $P < 0.05$ ). Diets did not have any influence on sensitivity and  $E_{max}$  of KCl in the aorta of non-pregnant animals, but reduced sensitivity to KCl in aorta of pregnant rats only under 1.8% NaCl supplement (Table 3).

Nifedipine induced a larger inhibition of KCl than of PhE responses. It significantly reduced both sensitivity and E<sub>max</sub> of KCl to similar levels with the three diets in both non-pregnant and pregnant animals. Under normal, 0.9% NaCl and 1.8% NaCl diets, the inhibitory effect of nifedipine was always more important in tissues of non pregnant animals (Table 3).

Cromakalim reduced maximum responses to KCl in all conditions (Fig.3, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, P < 0.05). In non-pregnant animals, it reduced E<sub>max</sub> significantly more in aorta of rats under normal diet than of rats under sodium supplements, but not in pregnant animals. (Table 3). Cromakalim also reduced E C<sub>50</sub> to KCl in all group of aorta (Fig.3, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, P < 0.05), except in aortic rings of pregnant rats under 1.8% NaCl supplement where the sensitivity of tissues is not altered by cromakalim (Fig.3, B<sub>3</sub>). When tissues of pregnant animals are pre-incubated with cromakalim, 0.9% NaCl and 1.8% NaCl diet *per se* induced a diminution of aortic rings sensitivity to KCl (Table 3).

NS-1619 reduced maximum responses to KCl in all conditions (Fig.3, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, P < 0.05). In non-pregnant animals, it reduced E<sub>max</sub> more in aorta of rats under normal and 0.9% NaCl diet than of rats under 1.8% NaCl supplement (Table 3). In non-pregnant animals, NS-1619 reduced sensitivity to KCl to similar levels with the three diets. In pregnant animal, it reduced sensitivity to KCl only when rats were under 0.9% NaCl diet (Fig.3, C<sub>2</sub>). When tissues of pregnant animals are pre-incubated with NS-1619, 0.9% NaCl and 1.8% NaCl diet *per se* induced a diminution of aortic rings sensitivity to KCl (Table 3).



These data show that, under the three given diets, thoracic aorta responses to KCl, in the absence of antagonists, were always diminished during pregnancy. Nifedipine induced a diminution of reactivity to KCl which was similar in both non-pregnant and pregnant rats under normal, 0.9 % NaCl and 1.8% NaCl diet. Otherwise, reduction of  $E_{max}$  to KCl induced by nifedipine was more important in aortic rings of pregnant rats under 1.8% NaCl diet than pregnant rats under normal diet. Cromakalim diminished maximum response to KCl was more importantly in both groups of rats under normal diet. The  $K_{ATP}$  activator also decreased the sensitivity to KCl in all conditions, except with thoracic aorta of pregnant rats under 1.8% NaCl diet. Decreased maximum response to KCl induced by NS-1619 was seen in all tissues, but was less important when rats received the 1.8% NaCl supplement. The  $K_{Ca}$  activator reduced the sensitivity to KCl in all non-pregnant groups and only when pregnant rats were under 0.9% NaCl diet.

*Effects of pregnancy and sodium supplementations on AVP responses.*

Compared to tissues of non-pregnant control rats, both  $E_{max}$  and sensitivity to AVP, in the absence of antagonist, were reduced in aortic rings of pregnant control rats (Fig. 4, A<sub>1</sub>,  $P < 0.05$ ). These decreases of responsiveness, induced by gestation, were not observed when rats were supplied with 0.9% NaCl and 1.8% NaCl (Fig. 4, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>). In non-pregnant rats, it should be noted that with the 0.9% NaCl supplement, diminished maximum response to AVP was observed without influencing the sensitivity whereas with 1.8% NaCl supplement, reduced  $E_{max}$  and  $pD_2$  were obtained (Table 4). In pregnant rats, it should be noted that 0.9% NaCl diet

increased the maximum response to AVP without influencing the sensitivity whereas 1.8% NaCl diet had no influence on responsiveness to AVP.

Nifedipine induced a inhibition of similar magnitude of AVP and PhE responses compared to KCl. Nifedipine reduced maximum responses to AVP in all conditions. In rats under normal diet, it diminished  $E_{max}$  more importantly in aorta of non-pregnant than pregnant rats (Fig.4, A<sub>1</sub>). When rats were supplied with both sodium diet (0.9% and 1.8% NaCl), the inhibitory effect of nifedipine was then similar in aorta of non-pregnant and pregnant rats. (Table 4). Nifedipine did not influence sensitivity to AVP. When tissues of non-pregnant rats were pre-incubated with nifedipine, 0.9% NaCl supplement diminished the maximum response to AVP without influencing the sensitivity whereas 1.8% NaCl supplement reduced both  $E_{max}$  and  $pD_2$ . When tissues were pre-incubated with nifedipine in pregnant rats, it should be noted that both 0.9% and 1.8% NaCl did not influence responsiveness to AVP (Table 4).

Cromakalim reduced significantly maximum responses to AVP in all conditions. In animals under normal diet, cromakalim diminished sensitivity to AVP only in non-pregnant animals (Fig.4, B<sub>1</sub>) and reduced  $E_{max}$  more importantly in non-pregnant than pregnant rats (Table 4). When rats received 0.9% and 1.8% NaCl diet, the inhibitory effect of cromakalim was then similar in both non-pregnant and pregnant animals (Fig.4, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>). In non-pregnant groups only, 0.9% NaCl supplement reduced  $E_{max}$  to AVP when tissues are pre-incubated with cromakalim (Table 4). It should be noted that the  $K_{ATP}$  activator reduced sensitivity to AVP in all

non-pregnant groups whereas it never influenced the sensitivity to AVP in pregnant groups.

NS-1619 reduced significantly maximum response to AVP in a similar way in non-pregnant and pregnant rats under normal diet (Fig.4, B<sub>1</sub>). When rat received 0.9% NaCl supplement, only the maximum response to AVP in pregnant animal was diminished. (Fig.4, B<sub>2</sub>). This diminution was more important in pregnant rat supplied by 0.9% NaCl supplement than in pregnant rat under regular diet (Table 4). NS-1619 did not reach significance in reducing E<sub>max</sub> to AVP when non-pregnant and pregnant animals were under 1.8% diet (Fig.4, B<sub>1</sub>). The K<sub>Ca</sub> never influenced the sensitivity to AVP.

These results show that when rats were under both 0.9% and 1.8% NaCl, aortic rings responses to AVP were then very similar in non-pregnant and pregnant animals. The smaller inhibitory effect of nifedipine and cromakalim in aortic rings of pregnant control rat compared to non-pregnant control rat was not observed under both high sodium diets. In pregnant rats, responsiveness of tissues pre-incubated with nifedipine and cromakalim was never influenced by both high sodium diets. When pregnant rats were under 0.9% NaCl supplement, the reduction of maximum response to AVP induced by NS-1619 was much more important than with pregnant animals under normal diet. NS-1619 lost his capacity to decrease maximum response to AVP when rats were under 1.8% NaCl supplement.

## Discussion

This study was undertaken in order to investigate the effects of sodium supplements, 0.9% and 1.8% NaCl, on  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels activities through they influence on reactivity to vasopressor during pregnancy . The major findings were as follows : 1) the absence of response to TEA in aortic rings of pregnant rats was conserved after sodium supplementation; 2) sodium supplements reversed the decreased reactivity to PhE and AVP, but not that to KCl, associated to normal pregnancy; 3) similarly, the inhibiting activity of nifedipin on PhE and AVP, but not on KCl, was restored by sodium supplements in aortic rings of pregnant rats ; 4) the reduced inhibitory effects of cromakalim on PhE responses in aortic rings of pregnant rats were conserved under sodium supplements; 5) the inhibitory effect of NS-1619 on responses to PhE and AVP were increased in aorta of pregnant rats under sodium supplementation, AVP responses with the 1.8% supplement was the exception. These results suggest that functional changes of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels in the aorta of pregnant rats could be responsible for the increased responses to vasoconstrictors during pregnancy-induced hypertension.

*TEA responses.* TEA can induce contractions in aortic rings of non-pregnant animals but not in pregnant ones. Aortic rings of pregnant animal were totally resistant to the inhibition of  $K^+$  channel by TEA. However, this resistance was overcome by preincubating the aortic rings with low concentration (10mmol/L) of depolarising KCl. These results, combined with those reported by Cadorette et al. (2) in response to TEA and by Roy et al. (22) in response to BayK 8644, support the

observation of Meyer et al. (14) who found an hyperpolarisation of 7mV in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries during gestation.

Beauséjour et al. (unpublished) reported that, in pregnant rats supplemented by 0.9% NaCl, the diminution of blood pressure, usually seen at the end of gestation, was unobservable and that, in pregnant rats under 1.8% NaCl, blood pressure increased. Sodium supplements, 0.9% and 1.8% NaCl, did not restore the absence of response to TEA in aortic rings of pregnant rats. These results show that the specific alteration of vascular smooth muscle cells responsible for this difference in reactivity to TEA, induced by gestation, is still present when animals are under high sodium diet. These results are not in line with those reported by Fujii et al. (9) that high sodium diet (8% NaCl) induced a 6mV membrane depolarisation in SHR mesenteric arteries. Furthermore, Wesselman et al. (31) suggested that an increase of blood pressure in mesenteric arteries is directly linked to the depolarisation observed in those tissues. Because the pregnant rats supplemented by the 1.8% NaCl beverage experienced high blood pressure, we could have expected some depolarisation in vascular smooth cells of their aorta and thus, a restoration of contractile responses to TEA. The reason why it did not happen remains obscure but, as 1mmol/L or less TEA inhibits  $K_{Ca}$  and with more than 6mmol/L inhibits  $K_{ATP}$  (31), we investigated on those  $K^+$  channels activity when animals are under high sodium diet.

*KATP channels.* When animals were under normal diet, the inhibitory effects of cromakalim, a  $K_{ATP}$  channel opener, on responses to PhE, KCl and AVP were always more important on tissues of non-pregnant than pregnant rats. These results

are in agreement with those suggesting that  $K_{ATP}$  channels are open at the resting membrane potential during pregnancy (2). When rats were under 0.9% and 1.8% NaCl diet, the inhibition of  $E_{max}$  induced by cromakalim was the same in rings of non-pregnant and pregnant rats. In pregnant control rats, gestation seemed to be associated with some activation of  $K_{ATP}$  channels, but this effect of gestation was absent when pregnant animals received the 0.9% and 1.8% supplement. Furthermore, when tissues were stimulated by PhE, the inhibitory effect of cromakalim increased in aorta of pregnant rats whereas it did not change in aortic rings of non-pregnant rats. Our results suggest that the fraction of  $K_{ATP}$  channels activated during pregnancy is reduced when rats were supplemented by saline.

One should remember that pregnant rats receiving the 1.8% NaCl supplement were reported to experience increased, rather than decreased, blood pressure as in preeclampsia (1, unpublished). During hypertension, the results concerning  $K_{ATP}$  channels activity are controversial. In patch clamp studies, Ohyaha and al. (18) reported that sensitivity and maximal responses to levcromakalim ( $K_{ATP}$  opener) in mesenteric artery cells of SHR rats were diminished. When  $K_{ATP}$  channels are less responsive to an  $K_{ATP}$  opener, this suggests channels molecules are activated (18). These results agree with the ones of Obiefuna et al. (16) that  $K_{ATP}$  channels are activated in thoracic aorta smooth muscle cells in salt-induced hypertension. However, results suggesting deactivation of  $K_{ATP}$  channel during hypertension and preeclampsia have also been reported. Indeed, on rat tail artery pre-contracted with 35mM KCl, diazoxide ( $K_{ATP}$  channels opener) relaxation was more important in SHR than normotensive rats (10). Furthermore, contractile effects of glyburide (KATP channels blocker) were significantly diminished in tissues of SHR (10). Deactivation

*am die*

of  $K_{ATP}$  channels could also occur during preeclampsia, as reported for relaxation of inferior epigastric artery to cicletanine ( $K_{ATP}$  opener) that was more important in tissues of preeclamptic than women with normal pregnant women (7). Thus, the possible deactivation of  $K_{ATP}$  channel suggested in our study may be hallmark of hypertension or preeclampsia.

*K<sub>Ca</sub> channels.* Under normal diet, the inhibitory effect of NS-1619, a  $K_{Ca}$  opener, over KCl and AVP responses was similar in aorta of non pregnant and pregnant rats. Maximal responses to PhE was not diminished by NS-1619 in tissues of pregnant rats. These results are not concordant with Cadorette et al. (2) who reported that the inhibitory effect of NS-1619 over PhE, KCl and AVP responses was always more important in tissues of non pregnant rats than pregnant ones (2). This difference of inhibitory potential of NS-1619 may be explained by the difference of agent concentration used; 10uM in our study and 30uM in Cadorette et al. (2) works.

In non-pregnant rats, NS-1619 lost partially its inhibitory effect when animals received sodium supplementations. This was particularly true with the 1.8% NaCl supplement. In rats treated with 1.8% NaCl, when tissues were stimulated with AVP, NS-1619 effects were totally abolished. When aortic rings were stimulated with PhE the inhibitory effect of NS-1619 was increased. In general, sodium supplementations, especially 1.8% NaCl, were thus associated with activation of  $K_{Ca}$ .

The increase of  $K_{Ca}$  channels activity observed in our study with hypertensive pregnant rats (under 1.8% NaCl) is in agreement with results reported on  $K_{Ca}$  channels activity during hypertension. Studies on thoracic aorta (25, 24) and carotid

artery (12) reported that 0.1mmol/L to 1mmol/L of TEA induced contractions of those tissues in SHR whereas no answer was observed in normotensive rats. It is suggested that this increase response to TEA could be linked to an increased of  $K_{Ca}$  channels activity (12), which could be modulate by increases of blood pressure (25). During hypertension in SHR, opening probability, number and sensitivity to calcium of  $K_{Ca}$  channels are increased (25, 24), consequently,  $K_{Ca}$  current is increased in arterial muscle (25). This could be a mechanism by which arterial over-excitability and increases of vascular reactivity could be prevented during hypertension (24).

*Voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels.* Under normal diet, the effect of nifedipine, a voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels antagonist, was always more important in aorta of non pregnant than pregnant rats. These results are concordant with Roy et al. (22) who reported that voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels are less sensitive to dihydropyridines (nifedipine and BayK 8644) during pregnancy. When animals received sodium supplementations (0.9% and 1.8% NaCl), the effect of nifedipine was then similar in non-pregnant and pregnant rats when tissues were stimulated by PhE and AVP. The effects of nifedipine on KCl responses were similar in rats under normal and sodium supplemented diets. During gestation, the inhibitory effects of nifedipine on PhE, KCl and AVP contractions were increased when rats received saline as beverage.

These results could be explained in two different ways. During pregnancy, it is reported that reduction of sensitivity of voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels could be linked to an increased proportion of these channels in the closed state (22). Voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels can be in three different states; close, activated and



inactivated. The latter is preferentially bound by dihydropyridines, such as nifedipine (15). During pregnancy, an hyperpolarisation of vascular smooth muscle cells is suggested (2, 14, 22) and it is also known that an hyperpolarisation of 2mV is enough to decrease the opening probability of voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels by 30% (15). In fact, the number of voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  in the inactivated state is thought to be also reduced during pregnancy (22). Thus, our results suggest that some fraction of closed voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels present during pregnancy could shift to inactivated state (favourite state of nifedipine) when rats received sodium supplementation. Our results may also suggest that, without changing the fraction of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the inactivated state, voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  activity is increased when pregnant rats are under 1.8% NaCl supplemented diet.

In salt-induced hypertension, patch clamp studies show that L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels become more available for opening near the resting potential after salt loading (17). Also, high salt diet (1% NaCl and 0.2% KCl in beverage) given to male rats induced hypertension and increased mesenteric arteries sensitivity to BayK 8644, a dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  agonist (30). This increase responsiveness to BayK 8644 is also observed on thoracic aorta of hypertensive rats and may suggest an alteration of voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels function linked to an increase of blood pressure (29). The effect of BayK 8644 on contractile responses of inferior epigastric arteries from normotensive and preeclamptic women was more important in the latter. It was suggested that increased peripheral vascular sensitivity associated with pregnancy-induced hypertension may be due, at least in part, to enhanced activity of the voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (8).

In absence of potassium and calcium modulators, responsiveness to PhE and AVP were increased when pregnant rats were under sodium supplements. PhE and AVP both induce contraction by increasing the intracellular calcium concentration. It is suggested that contractions induced by PhE are more dependent on intracellular calcium release and that AVP-induced contractions are more dependent on extracellular calcium influx (6). These results could also be due to an enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  channels activity but remains to be investigated. Maximal responses to KCl were not changed whereas sensitivity was decreased when pregnant rats received the 1.8% NaCl supplement. It is reported that carotid arteries of SHR are more sensitive to KCl than normotensive rats without changes in maximal responses between the two groups. It is suggested that this increase of sensitivity could be linked to an augmentation of potassium ion permeability during hypertension (12). However, during preeclampsia, potassium ion permeability is decreased (11) and this could explain the diminution of sensitivity to KCl observed in our study.

In summary, the present results showed that 0.9% and 1.8% NaCl supplements can modulate the activity of potassium and calcium channels during pregnancy.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels activity seems to be decreased whereas  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels and voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels activities appear to be increase by sodium supplementations. These changes in activities occurred in a model of mimicking preeclampsia and were similar to results reported during hypertension and/or preeclampsia.

## References

1. Beauséjour A. Auger K. St-Louis J. Brochu M. Sodium supplementation prevents the decrease of blood pressure observed during normal pregnancy in rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (in preparation)
2. Cadorette C. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 278(2):H567-76, 2000.
3. Capeless EL. Clapp JF. Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 161(6 Pt 1):1449-53, 1989.
4. Davidge ST. McLaughlin MK. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from pregnant rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 167: 1691-98, 1992
5. Dogterom J. De Jong W. Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology*. 25(2):267-9, 1974.
6. Dumont E. Lamontagne D. No role of ATP-sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin. *Journal of Vascular Research*. 32(2):138-42, 1995.

7. Ebeigbe AB. Cabanie M. In vitro vascular effects of cicletanine in pregnancy-induced hypertension. [Journal Article] *British Journal of Pharmacology*. 103(4):1992-6, 1991.
8. Ebeigbe AB. Ezimokhai M. Aloamaka CP. Responses of arterial smooth muscle from normotensive and pre-eclamptic subjects to the calcium channel agonist, Bay K 8644. *Research in Experimental Medicine*. 187(6):461-8, 1987.
9. Fujii K. Ohmori S. Onaka U. Abe I. Fujishima M. Effects of salt-loading on membrane potentials in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*. 22(3):181-6, 1999.
10. Furspan PB. Webb RC. Decreased ATP sensitivity of a K<sup>+</sup> channel and enhanced vascular smooth muscle relaxation in genetically hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 11(10):1067-72, 1993.
11. Heilmann L. von Tempelhoff GF. Ulrich S. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> co-transport system in erythrocytes from pregnant patients. *Archives of Gynecology & Obstetrics*. 253(4):167-74, 1993.
12. Koliass TJ. Chai S. Webb RC. Potassium channel antagonists and vascular reactivity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. 6(6 Pt 1):528-33, 1993.

13. Massicotte G. St-Louis J. Parent A. Schiffrin EL. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 2466-71, 1987
14. Meyer MC. Brayden JE. McLaughlin MK. Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 169(6):1510-6, 1993.
15. Nelson MT. Patlak JB. Worley JF. Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology.* 259(1 Pt 1):C3-18, 1990.
16. Obiefuna PC. Obiefuna IP. Salt-induced hypertension in rats alters the response of isolated aortic rings to cromakalim. *West Indian Medical Journal.* 50(1):17-21, 2001.
17. Ohya Y. Fujii K. Eto K. Abe I. Fujishima M. Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in resistance arteries from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research.* 23(6):701-7, 2000.
18. Ohya Y. Setoguchi M. Fujii K. Nagao T. Abe I. Fujishima M. Impaired action of levcromakalim on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 27(6):1234-9, 1996.

19. Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE and vasopressin in pregnant rats. *American Journal of Physiology*. 247: H100-08, 1984
20. Poston L. McCarthy A.L. Ritter J.M. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol. Ther.* 65: 215-39, 1995
21. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology*. 280(1):1-9, 1995.
22. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: Contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biology of Reproduction*. 60(4):979-88, 1999.
23. Roy-Clavel E. Picard S. St-Louis J. Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 180(3 Pt 1):608-13, 1999.
24. Rusch NJ. Liu Y. Pleyte KA. Mechanisms for regulation of arterial tone by Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in hypertension. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 23(12):1077-81, 1996.

25. Rusch NJ. Runnells AM. Remission of high blood pressure reverses arterial potassium channel alterations. *Hypertension*. 23(6 Pt 2):941-5, 1994.
26. Simaan M. Cadorette C. Poterek M. St-Louis J. Brochu M. Activation of calcium channels does not reverse the decrease in blood pressure of pregnant rats. *American Journal of Physiology*. 282 : H665-71, 2002.
27. St-Louis J. Massicotte G. Parent A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse : influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Sciences*. 6(1):358-65, 1988.
28. St-Louis J. Sicotte B. Prostaglandin-or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 166: 684-92, 1992
29. Storm DS. Webb RC. Contractile responses to Bay K 8644 in rats with coarctation-induced hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 203(1):92-9, 1993.
30. Watts SW. Finta KM. Lloyd MC. Storm DS. Webb RC. Enhanced vascular responsiveness to Bay K 8644 in mineralocorticoid- and N-nitro arginine-induced hypertension. *Blood Pressure*. 3(5):340-8, 1994.
31. Wesselman JP. Schubert R. VanBavel ED. Nilsson H. Mulvany MJ. KCa-channel blockade prevents sustained pressure-induced depolarization in rat

mesenteric small arteries. *American Journal of Physiology*. 272(5 Pt 2):H2241-9, 1997.



### Legends of Figures

*Figure 1. Concentration-response curves to tetraethylammonium (TEA) were measured in aortic rings from non-pregnant and pregnant control rats (top) and rats supplemented with 0.9% NaCl (middle) and 1.8% NaCl (bottom). Curves were obtained in the absence ( $A_1, A_2$  and  $A_3$ ), and presence of 10mmol/L KCl for both groups of rats ( $B_1, B_2$  and  $B_3$ ) and in the absence and presence of 10mmol/L KCl for the non-pregnant and pregnant rings respectively ( $C_1, C_2$  and  $C_3$ ). Curves are best fits to mean  $\pm$  SE experimental points ( $n= 10$ ). Ordinate depicts tension responses in (g), whereas abscissa represents the logarithm of TEA concentrations (mol/L)*

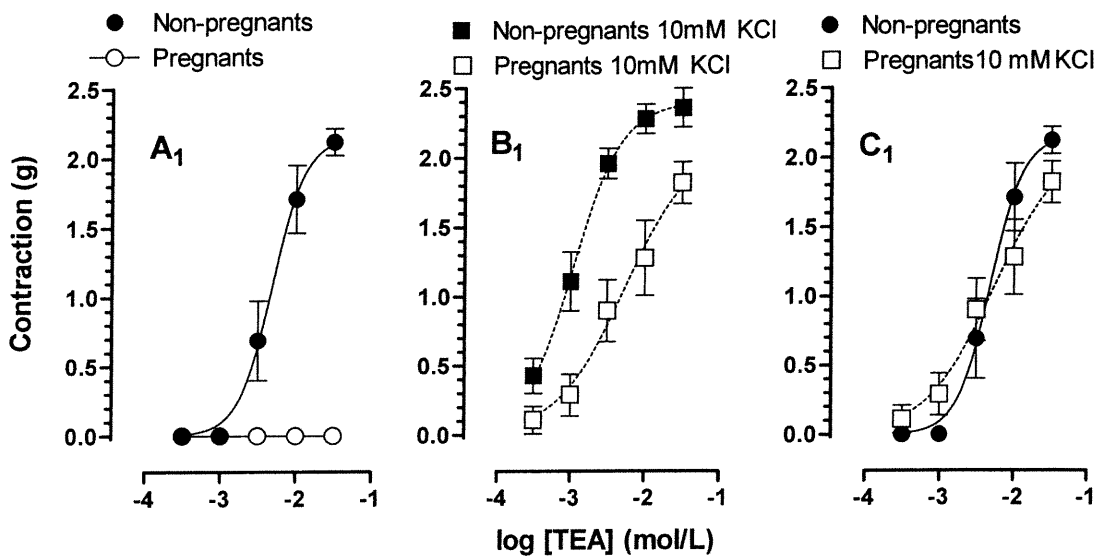
*Figure 2 Concentration-response curves to phenylephrine (PHE) in aortic rings from non-pregnant (filled symbols)) and pregnant (open symbol) control rats (top) and rats supplemented with 0.9% NaCl (middle) and 1.8% NaCl (bottom). Curves were obtained in the absence ( $\bullet$  and  $\circ$ ) and presence of A) 0.1 $\mu$ mol/L nifedipine [ $\blacksquare$  and  $\square$ ], B) 1 $\mu$ mol/L cromakalim [ $\blacktriangle$  and  $\Delta$ ] or C) 10 $\mu$ mol/L NS-1619 ( $\blacklozenge$  and  $\lozenge$ ) Curves are best fits to mean  $\pm$  SE experimental points ( $n= 10$ ). Ordinate depicts responses in tension (g), whereas abscissa represents the logarithm of PHE concentrations (mol/L).*

*Figure 3 Concentration-response curves to potassium chloride (KCl) in aortic rings from non-pregnant (filled symbols)) and pregnant (open symbol) control rats (top) and rats supplemented with 0.9% NaCl (middle) and 1.8% NaCl (bottom). Curves were obtained in the absence ( $\bullet$  and  $\circ$ ) and presence of A) 0.1 $\mu$ mol/L nifedipine [ $\blacksquare$  and  $\square$ ], B) 1 $\mu$ mol/L cromakalim [ $\blacktriangle$  and  $\Delta$ ] or C) 10 $\mu$ mol/L NS-1619 ( $\blacklozenge$  and  $\lozenge$ ) Curves are best fits to mean  $\pm$  SE experimental points ( $n= 10$ ). Ordinate depicts*

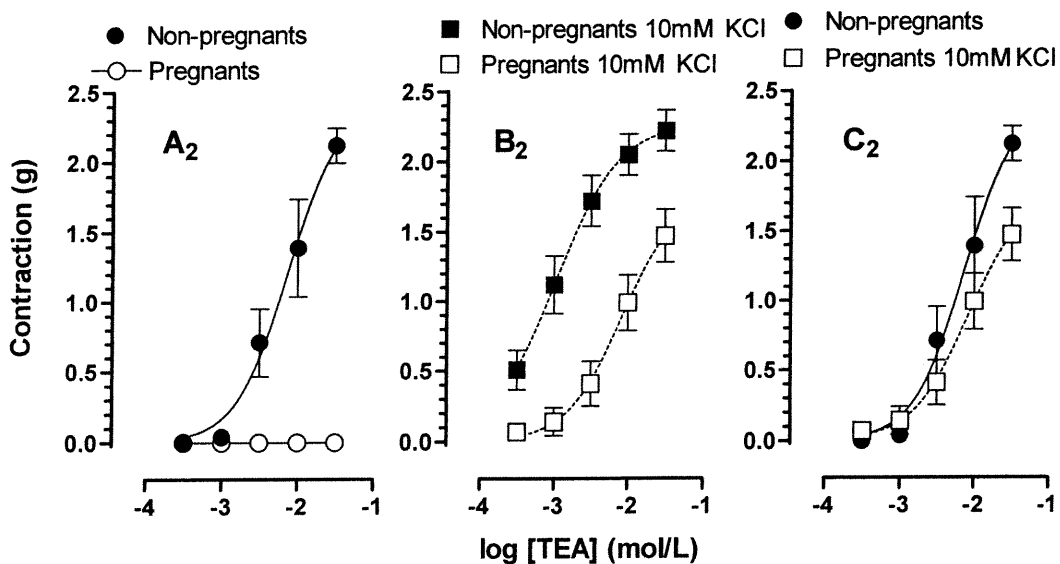
responses in tension (g), whereas abscissa represents the logarithm of KCl concentrations (mol/L).

Figure 4 Concentration-response curves to vasopressin (AVP) in aortic rings from non-pregnant (filled symbols) and pregnant (open symbol) control rats (top) and rats supplemented with 0.9% NaCl (middle) and 1.8% NaCl (bottom). Curves were obtained in the absence (● and ○) and presence of A) 0.1 μmol/L nifedipine [■ and □], B) 1 μmol/L cromakalim [▲ and Δ] or C) 10 μmol/L NS-1619 (◆ and ◇) Curves are best fits to mean ± SE experimental points (n= 10). Ordinate depicts responses in tension (g), whereas abscissa represents the logarithm of AVP concentrations (mol/L).

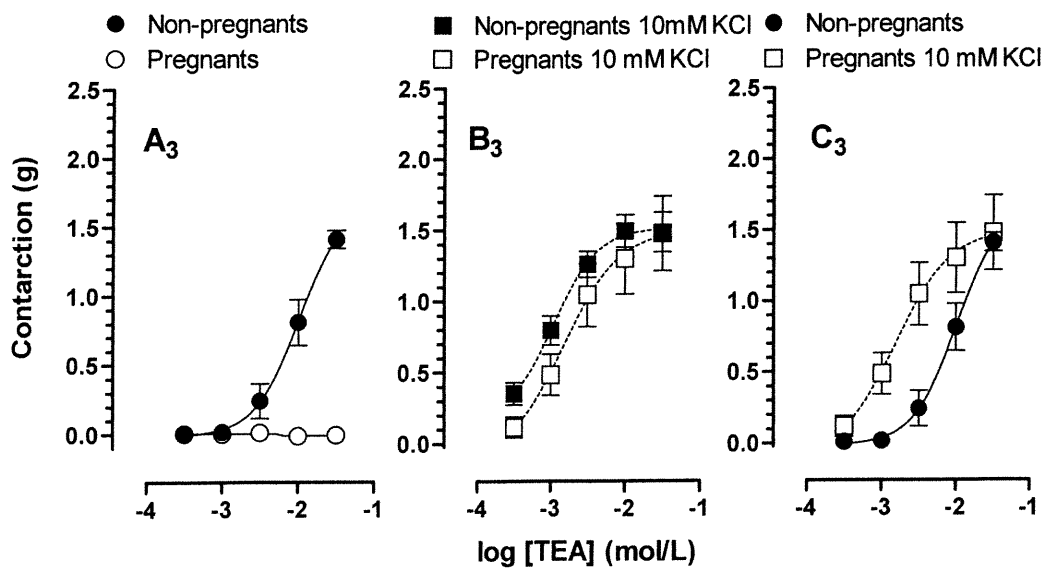
## No Supplement

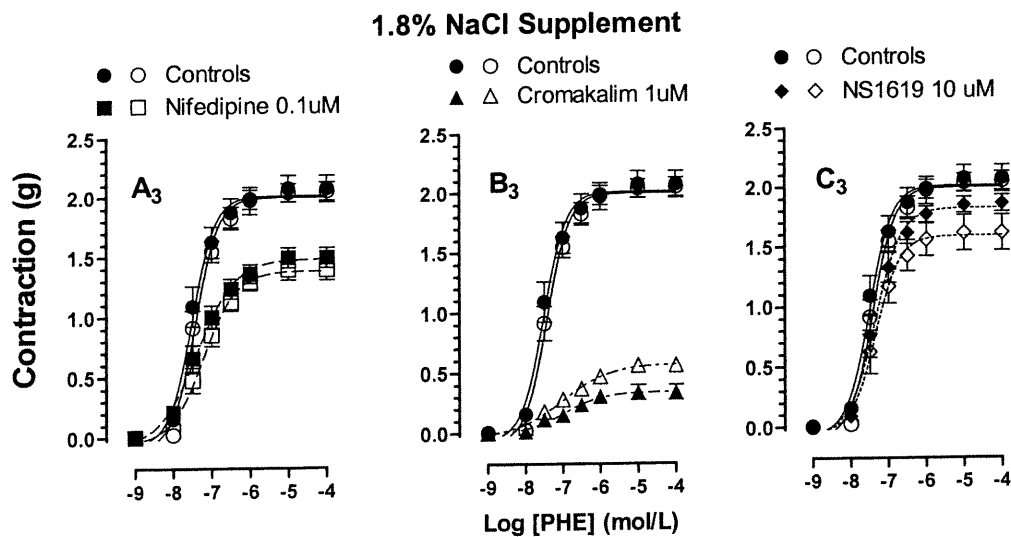
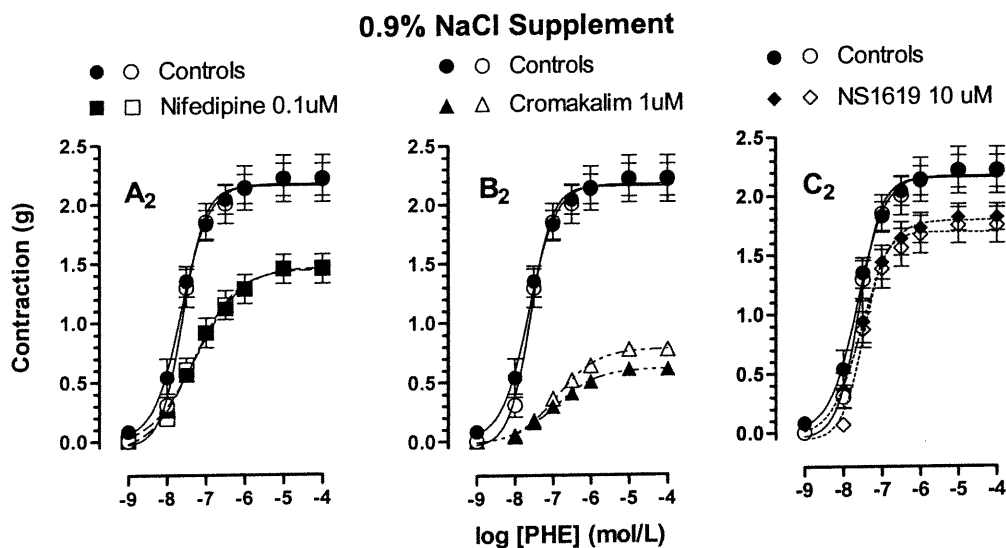
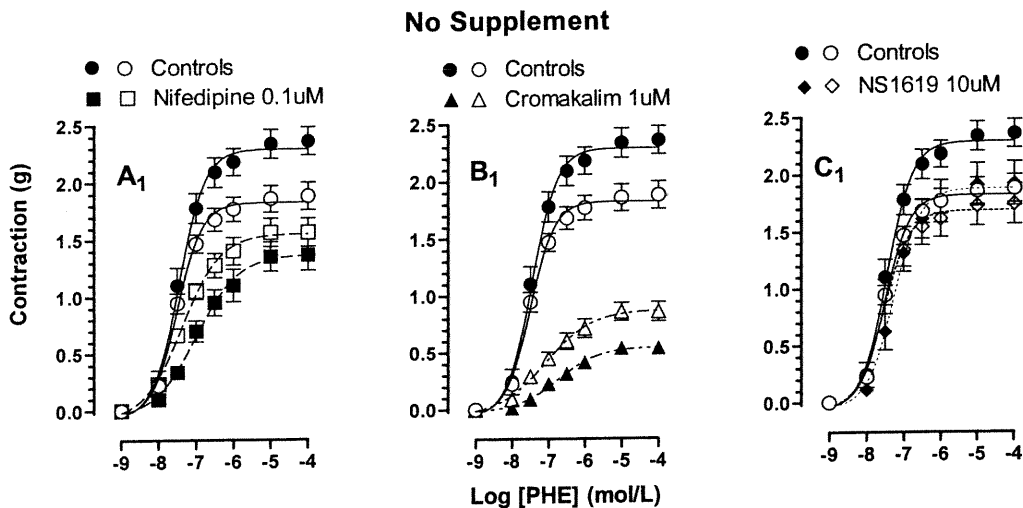


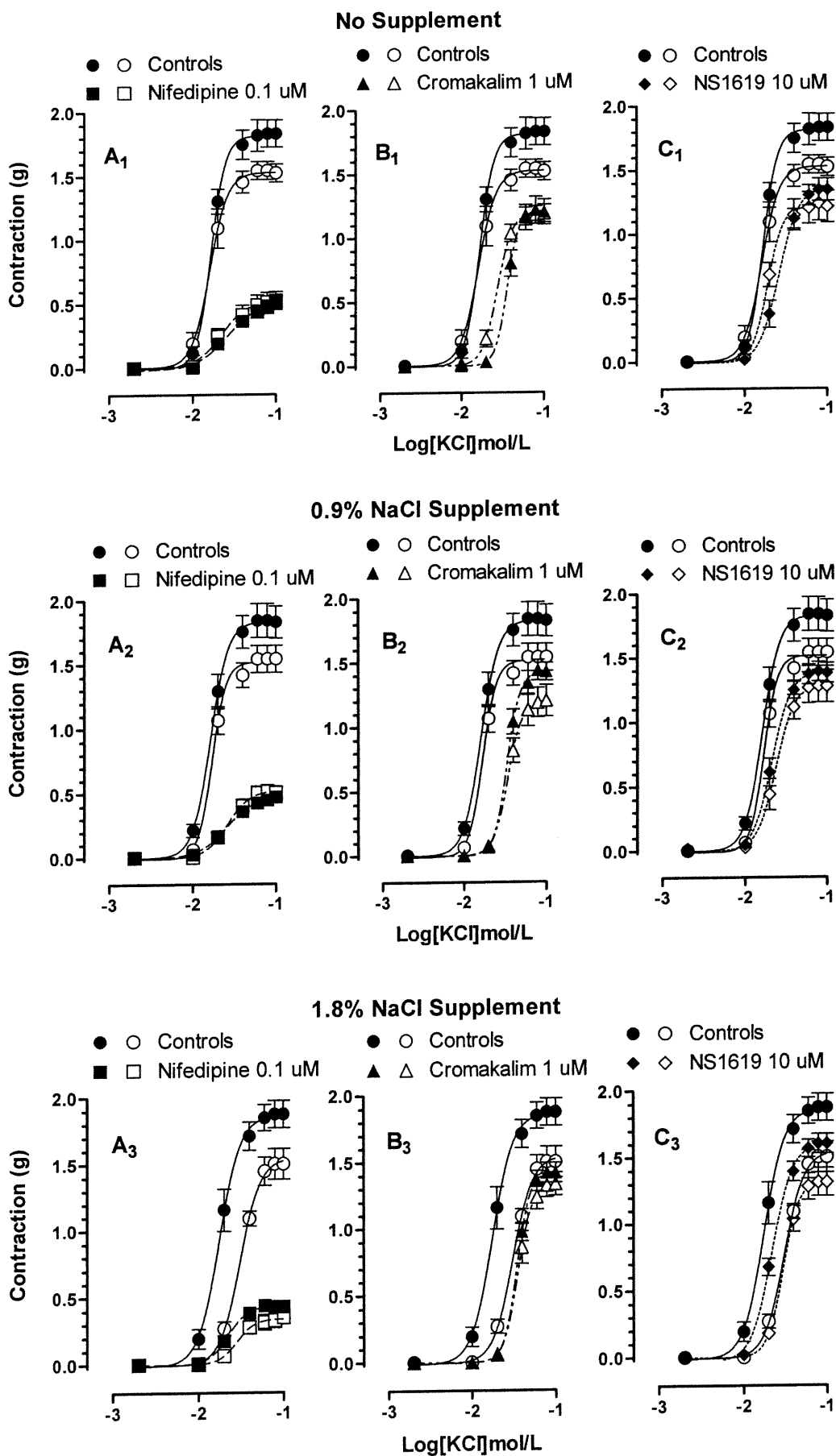
## 0.9% NaCl Supplement



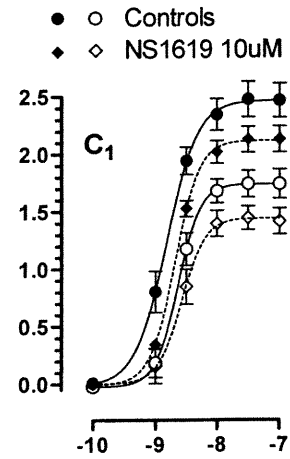
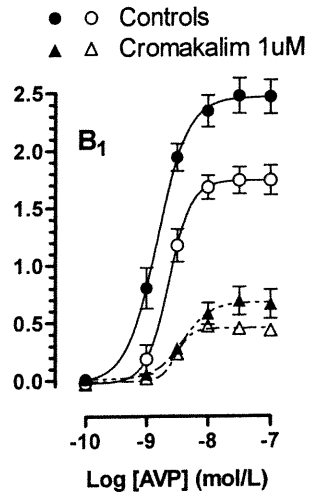
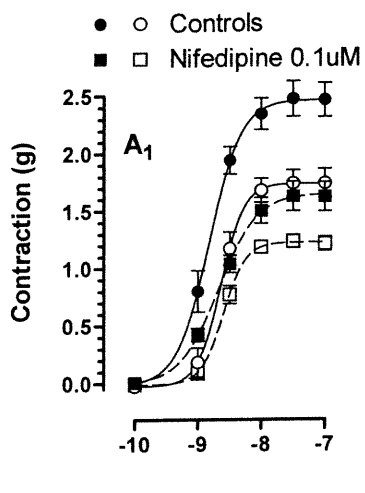
## 1.8% NaCl Supplement



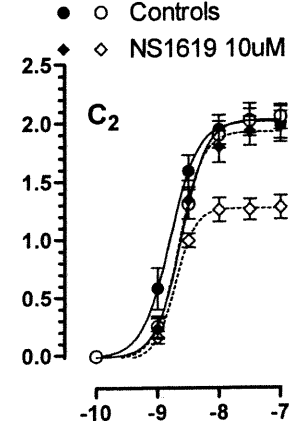
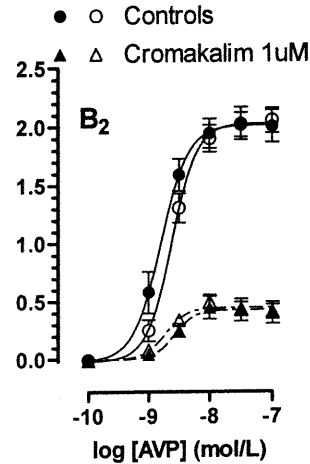
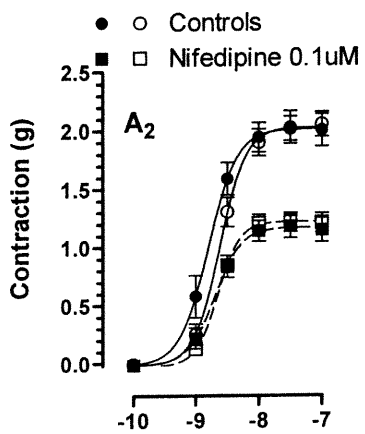




## No Supplement



## 0.9% NaCl Supplement



## 1.8% NaCl Supplement

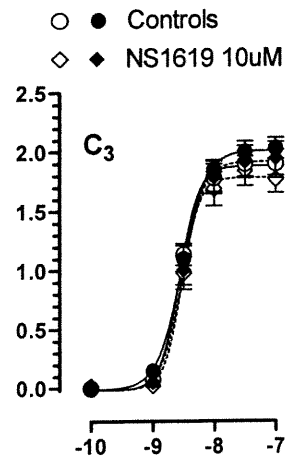
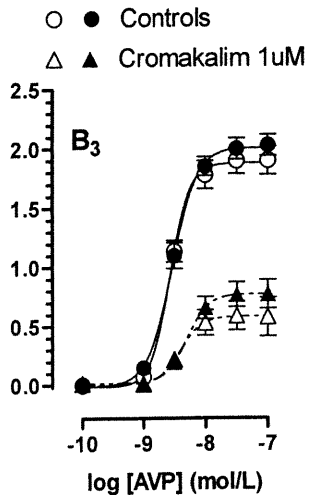
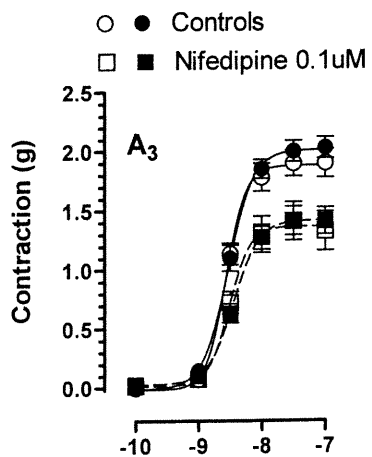


Table 1. Effects of 0.9% and 1.8% NaCl supplements on maximal responses and sensitivity to tetraethylammonium without and with 10mmol/L KCl pre-incubation in non-pregnant and pregnant rats

	Non- pregnant			Pregnants		
	NaCl Supplements			NaCl Supplements		
	None	0.9%	1.8%	None	0.9%	1.8%
<b>Basal Response</b>						
$E_{max}$ :	2.16 ± 0.23	2.11 ± 0.21	1.48 ± 0.41*	NR	NR	NR
$pD_2$ :	2.32 ± 0.10	2.13 ± 0.22	1.99 ± 0.18	NR	NR	NR
<b>10mmol/L KCl</b>						
$E_{max}$ :	2.40 ± 0.14	2.24 ± 0.21	1.52 ± 0.11*	1.79 ± 0.37†	1.50 ± 0.31†	1.47 ± 0.34
$pD_2$ :	2.97 ± 0.08	3.00 ± 0.13	2.96 ± 0.22	2.36 ± 0.26†	2.17 ± 0.32†	2.81 ± 0.20*

NR, no response. Values are means ± SE (n=10).  $pD_2$ , sensitivity;  $E_{max}$ , maximal response. \* vs respective control and † vs same treatment in non pregnant rats.

Table 2. Effects of 0.9% and 1.8% NaCl supplement on maximal responses and sensitivity to phenylephrine without and with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  nifedipin, 1  $\mu\text{mol/L}$  cromakalim or 10  $\mu\text{mol/L}$  NS1619 pre-incubation in non-pregnant and pregnant rats.

	Non- pregnant			Pregnants		
	NaCl Supplements			NaCl Supplements		
	None	0.9%	1.8%	None	0.9%	1.8%
<b>Basal Response</b>						
$E_{\max}$ :	2.29 $\pm$ 0.07	2.17 $\pm$ 0.07	2.01 $\pm$ 0.06*	1.82 $\pm$ 0.05†	2.15 $\pm$ 0.08*	1.99 $\pm$ 0.05*
$pD_2$ :	7.45 $\pm$ 0.08	7.63 $\pm$ 0.09	7.51 $\pm$ 0.07	7.50 $\pm$ 0.07	7.59 $\pm$ 0.09	7.42 $\pm$ 0.05
<b>Nifedipine 0.1 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	1.37 $\pm$ 0.08	1.47 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.06	1.44 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 0.05*
$pD_2$ :	7.00 $\pm$ 0.16	7.26 $\pm$ 0.08	7.39 $\pm$ 0.11*	7.38 $\pm$ 0.14†	7.32 $\pm$ 0.17	7.22 $\pm$ 0.09
$\Delta E_{\max}$ :	0.92 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.05*	0.53 $\pm$ 0.03*	0.27 $\pm$ 0.05†	0.71 $\pm$ 0.08*	0.61 $\pm$ 0.05*
$\Delta pD_2$ :	0.45 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.07*	0.12 $\pm$ 0.09†	0.27 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.07
<b>Cromakalim 1 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	0.54 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.03*	0.87 $\pm$ 0.05†	0.78 $\pm$ 0.03†	0.57 $\pm$ 0.03*†
$pD_2$ :	6.74 $\pm$ 0.14	6.95 $\pm$ 0.16	6.97 $\pm$ 0.27	7.09 $\pm$ 0.19	6.90 $\pm$ 0.10	7.01 $\pm$ 0.17
$\Delta E_{\max}$ :	1.75 $\pm$ 0.05	1.56 $\pm$ 0.06*	1.67 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.05†	1.37 $\pm$ 0.05*†	1.42 $\pm$ 0.03*†
$\Delta pD_2$ :	0.71 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.09†	0.69 $\pm$ 0.09*	0.41 $\pm$ 0.09
<b>NS1619 10 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	1.88 $\pm$ 0.09	1.79 $\pm$ 0.08	1.82 $\pm$ 0.06	1.69 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.07†
$pD_2$ :	7.27 $\pm$ 0.12	7.53 $\pm$ 0.12	7.36 $\pm$ 0.07	7.53 $\pm$ 0.12	7.48 $\pm$ 0.09	7.35 $\pm$ 0.11
$\Delta E_{\max}$ :	0.41 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.06*	0.13 $\pm$ 0.06†	0.46 $\pm$ 0.07*	0.40 $\pm$ 0.05*†
$\Delta pD_2$ :	0.18 $\pm$ 0.09	0.10 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.09	0.11 $\pm$ 0.09	0.07 $\pm$ 0.04

Values are means  $\pm$  SE (n=10).  $pD_2$ , sensitivity;  $E_{\max}$ , maximal response.

\* vs respective control and † vs same treatment in non pregnant rats.



Table 3. Effects of 0.9% and 1.8% NaCl supplement on maximal responses and sensitivity to potassium chloride without and with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  nifedipin, 1  $\mu\text{mol/L}$  cromakalim or 10  $\mu\text{mol/L}$  NS1619 pre-incubation in non-pregnant and pregnant rats

	Non- pregnant			Pregnants		
	NaCl Supplements			NaCl Supplements		
	None	0.9%	1.8%	None	0.9%	1.8%
<b>Basal Responses</b>						
$E_{\max}$ :	1.81 $\pm$ 0.06	1.77 $\pm$ 0.06	1.86 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.05†	1.60 $\pm$ 0.05†	1.54 $\pm$ 0.07†
$pD_2$ :	1.78 $\pm$ 0.04	1.79 $\pm$ 0.04	1.76 $\pm$ 0.03	1.79 $\pm$ 0.03	1.77 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.03*†
<b>Nifedipin 0.1 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	0.52 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.03*
$pD_2$ :	1.58 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.06	1.65 $\pm$ 0.03	1.65 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.07
$\Delta E_{\max}$ :	1.29 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.04	1.43 $\pm$ 0.05*	1.01 $\pm$ 0.05†	1.08 $\pm$ 0.04†	1.20 $\pm$ 0.05*†
$\Delta pD_2$ :	0.20 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.04
<b>Cromakalim 1 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	1.21 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.04*	1.43 $\pm$ 0.04*	1.19 $\pm$ 0.04	1.20 $\pm$ 0.07†	1.34 $\pm$ 0.06*
$pD_2$ :	1.45 $\pm$ 0.03	1.48 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.04*	1.45 $\pm$ 0.03*
$\Delta E_{\max}$ :	0.60 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.05*	0.43 $\pm$ 0.05*	0.34 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.06†
$\Delta pD_2$ :	0.33 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03*†
<b>NS1619 10 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>						
$E_{\max}$ :	1.36 $\pm$ 0.06	1.39 $\pm$ 0.05	1.61 $\pm$ 0.04*	1.21 $\pm$ 0.06	1.29 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.05†
$pD_2$ :	1.59 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.03	1.66 $\pm$ 0.02	1.72 $\pm$ 0.03	1.60 $\pm$ 0.05*	1.52 $\pm$ 0.03*†
$\Delta E_{\max}$ :	0.45 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.05*	0.32 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.06
$\Delta pD_2$ :	0.19 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.02*	0.07 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.03

Values are means  $\pm$  SE (n=10).  $pD_2$ , sensitivity;  $E_{\max}$ , maximal response.

\* vs respective control and † vs same treatment in non pregnant rats.

Table 4. Effects of 0.9% and 1.8% NaCl supplement on maximal responses and sensitivity to vasopressin without and with 0.1 $\mu$ mol/L nifedipin, 1 $\mu$ mol/L cromakalim or 10 $\mu$ mol/L NS1619 pre-incubation in non-pregnant and pregnant rats

	Non- pregnant			Pregnants		
	NaCl Supplements			NaCl Supplements		
	None	0.9%	1.8%	None	0.9%	1.8%
<b>Basal Responses</b>						
$E_{max}$ :	2.46 $\pm$ 0.09	2.01 $\pm$ 0.09*	1.94 $\pm$ 0.05*	1.74 $\pm$ 0.07†	2.03 $\pm$ 0.06*	1.88 $\pm$ 0.06
$pD_2$ :	8.82 $\pm$ 0.07	8.80 $\pm$ 0.07	8.54 $\pm$ 0.04*	8.64 $\pm$ 0.06	8.62 $\pm$ 0.05	8.57 $\pm$ 0.04
<b>Nifedipin 0.1<math>\mu</math>mol/L</b>						
$E_{max}$ :	1.65 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.06*	1.42 $\pm$ 0.06*	1.23 $\pm$ 0.04†	1.22 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.08
$pD_2$ :	8.68 $\pm$ 0.08	8.70 $\pm$ 0.08	8.45 $\pm$ 0.06*	8.60 $\pm$ 0.05	8.65 $\pm$ 0.05	8.51 $\pm$ 0.07
$\Delta E_{max}$ :	0.81 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.06*	0.51 $\pm$ 0.05†	0.81 $\pm$ 0.05*	0.51 $\pm$ 0.07
$\Delta pD_2$ :	0.14 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.08	0.09 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.05
<b>Cromakalim 1<math>\mu</math>mol/L</b>						
$E_{max}$ :	0.68 $\pm$ 0.07	0.43 $\pm$ 0.05*	0.77 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.02†	0.45 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.07†
$pD_2$ :	8.40 $\pm$ 0.13	8.57 $\pm$ 0.15	8.30 $\pm$ 0.10	8.51 $\pm$ 0.04	8.72 $\pm$ 0.11	8.40 $\pm$ 0.15
$\Delta E_{max}$ :	1.78 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.07	1.17 $\pm$ 0.05*	1.29 $\pm$ 0.05†	1.58 $\pm$ 0.04*	1.30 $\pm$ 0.06
$\Delta pD_2$ :	0.42 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.07	0.13 $\pm$ 0.05†	0.10 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.09
<b>NS1619 10<math>\mu</math>mol/L</b>						
$E_{max}$ :	2.12 $\pm$ 0.05	1.93 $\pm$ 0.08	1.92 $\pm$ 0.08	1.44 $\pm$ 0.08†	1.27 $\pm$ 0.05†	1.78 $\pm$ 0.07*
$pD_2$ :	8.68 $\pm$ 0.04	8.66 $\pm$ 0.06	8.52 $\pm$ 0.05*	8.57 $\pm$ 0.08	8.71 $\pm$ 0.06	8.53 $\pm$ 0.04
$\Delta E_{max}$ :	0.34 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.05*	0.02 $\pm$ 0.07*	0.30 $\pm$ 0.07	0.76 $\pm$ 0.05*†	0.10 $\pm$ 0.06*
$\Delta pD_2$ :	0.14 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.04

Values are means  $\pm$  SE (n=10).  $pD_2$ , sensitivity;  $E_{max}$ , maximal response.

\* vs respective control and † vs same treatment in non pregnant rats.

**3. ARTICLE 2**

EFFECTS OF SODIUM SUPPLEMENTS DURING GESTATION ON  
ENDOTHELIN RESPONSES OF THE AORTA.

(article in preparation)

Karine Auger, Annie Beauséjour, Michèle Brochu and  
Jean St-Louis\*

Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada and  
Departments of Obstetrics-Gynecology and Pharmacology, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada

\* Address for reprints:

Jean St-Louis

Centre de recherche

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Email: stlouisj@justine.umontreal.ca

Tel (514) 345-4931 ext 2996

Fax (514) 345-4994

Running title: Effects of sodium supplementations on vascular reactivity during rat  
pregnancy

## Abstract

Normal pregnancy is associated with blunted responses to vasoconstrictors and normal endothelin-1 plasma concentrations whereas preeclampsia is characterised by increased responses to vasoconstrictors and a two to threefold higher plasma concentration of endothelin-1. Pregnant rats under sodium supplementation experience physiological changes that correspond to some manifestations of preeclampsia. The purpose of this study was to investigate the influence of sodium supplementation on endothelin responses during pregnancy in the rat. Sodium supplementation (0.9% or 1.8% NaCl as drinking water) was given to non-pregnant and pregnant rats for 7 days corresponding to the last week of gestation. Using aortic rings, concentration-responses curves to ET-1 were obtained in the absence or presence of BQ123, an ET<sub>A</sub> antagonist. Sarafotoxin S6c, a selective ET<sub>B</sub> agonist, was also tested. Under normal diet, contractile responses to ET-1 show reduced maximum responses and sensitivity in aorta of pregnant rats. Under 0.9% NaCl supplement, the effects of ET-1 were similar in both groups of rats, as indicated by reduced E<sub>max</sub> in tissues of non pregnant rats and increased E<sub>max</sub> and sensitivity in aorta of pregnant rats, both compared with their control on normal diet. When animals were supplied with 1.8% NaCl, maximum response to ET-1 was more important in aortic rings of pregnant than non pregnant rats and both groups showed marked increased in sensitivity to ET-1. BQ123 produced strong inhibition of responses to ET-1 in all groups of animals. The effects on aortic rings of ET-1 in the presence of the antagonist appeared to be less affected by sodium supplements than in its absence. Sarafotoxin 6C did not show any effects effects on aorta of all groups of animals. These results show that the effects of ET-1 in aorta of non pregnant rats are mediated by ET<sub>A</sub> receptors, ET<sub>B</sub> receptors not being present. These results

suggest that sodium supplements modulated different responses on ETA receptors of the aorta of non pregnant and pregnant rats.

**Key Words** : endotheline-1, BQ123, ET<sub>A</sub> receptors, voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels, pregnancy, sodium supplementations, vasoconstriction, aortic rings

## Introduction

Endothelin (ET), a 21 amino-acid peptide produced by endothelial and smooth muscle cells, belongs to a family of structurally homologous peptides that includes ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxins. ET-1, ET-2 and ET-3 are found in mammals whereas sarafotoxins are constituents of the venom of *Actractaspis engaddensis* (1,2). By their vasoconstrictor activity, endothelins modulate vascular tone, but also induce cell proliferation and hormone production (3,4). Pharmacological studies reveal that there are at least three distinct ET receptors, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> and ET<sub>C</sub>, all members of G-protein coupled receptor superfamily (5,6,7). The main target for ET-1 is the vasculature, where it mediates transient vasodilatation via endothelial ET<sub>B</sub> receptors, followed by sustained contraction via ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors on vascular smooth muscles (8).

During normal pregnancy, significant changes in cardiovascular functions occur to meet metabolic needs of the mother and the foetus. For example, responses to exogenously given vasopressor agents are markedly blunted (9). Moreover, maternal cardiac output and blood volume increase whereas total peripheral resistance and arterial blood decrease (10,11). The marked hemodynamic changes that normally occur during pregnancy do not manifest themselves in women who develop pre-eclampsia (10,11). Pre-eclampsia is a human pregnancy-specific syndrome of unknown etiology, characterised by hypertension, associated with proteinuria, oedema or activation of the coagulation cascade. Despite being one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity, the mechanisms responsible for its pathogenesis are unclear (12).

Rat is a widely used model to study the hemodynamic manifestations of pregnancy . It has been shown that almost all the hemodynamic functions of normal pregnancy in human are also found in pregnant rats (13). In our laboratory, we found that giving 0.9% and 1.8% NaCl as drinking water supplied to pregnant Sprague Dawley rats induced some hemodynamic and electrolytes effects that resemble pre-eclampsia (unpublished). Furthermore, we demonstrated that blunted responses to vasoconstrictive agents seen in normal pregnancy are reversed in that experimental models (unpublished).

As a potent pressor peptide, ET-1 has been studied in pregnancy and pre-eclampsia with regard to plasma and urinary levels (16) , binding sites and localization of ET-1 production (17,18) , regulation of blood pressure homeostasis and isolated arteries contractile experiments (19,20). For instance, plasma concentrations of endothelin have been measured in a number of studies involving women in normal pregnancy and with pre-eclampsia. Most investigators have found higher plasma concentrations of endothelin, of approximately two to threefold, in women with pre-eclampsia (21,22,23). However, to the best of our knowledge, the potential contractile effect of ET-1 on rat thoracic aorta , via ET<sub>A</sub> and/or ET<sub>B</sub> receptor, has not been evaluated either in late normal or 0.9 % and 1.8% NaCl supplemented hypertensive pregnancies. Therefore, the aims of this study were to investigate the contractile effect of ET-1 and the contribution of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor mediating this response in both conditions. Contractile responses to ET-1 in absence or presence of BQ123, an ET<sub>A</sub> receptor antagonist, were thus assessed in thoracic aorta of non-



pregnant and pregnant control rats, supplied by 0.9% or 1.8% NaCl, along with appropriated controls. A selective ET<sub>B</sub> agonist, sarafotoxin S6c, was also tested.

## Materials and Methods

### *Animals*

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) weighing 225-250g and aged 10-11 weeks were mated with males. The morning when spermatozoa were found in vaginal smears was deemed to be day 1 of pregnancy. Nonpregnant rats of the same age served as control and were picked randomly during the oestrous cycle. All animals were housed under controlled lighting (from 0600 to 1800 h) and temperature ( $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) and received normal diet (Charles River Rodent chow no 5075). This study received approval from the institutional animal care committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

### *Treatment protocol*

The rats were divided into 6 groups: nonpregnant and pregnant controls received tap water, nonpregnant and pregnant experimental animals were treated with 0.9% NaCl in water or with 1.8% NaCl in water. Stock solutions of NaCl diet (9 g/L and 18 g/L) were prepared in water. The treatments lasted for 7 days, from day 15 of experimentation until day 22, which corresponds to the last week of gestation (i.e. the third week).

### *Physiological measurements*

Systolic blood pressure was measured by the indirect tail-cuff method (50-0001-rat tail blood pressure apparatus; Harvard Apparatus Canada, St-Laurent, QC, Canada). The animals were trained for blood pressure measurement on days 5 to 11. Then, systolic blood pressure was recorded from day 12 until day 22 (corresponding to the end of treatment). Data were compared with a two-factor analysis of variance with repeated measures.

### *Organ bath assay*

Vascular reactivity was measured in thoracic aorta rings as previously described (24,25). After decapitation, the thoracic aorta was removed rapidly, cleaned of fat and extraneous tissue and cut into 4 consecutive rings (2-3 mm), which were mounted in individual jacketed tissue baths (15 mL; Radnotti Glass, Monrovia, CA) maintained at 37°C. The endothelium of each ring was gently removed by rubbing the lumen with an 18-gauge needle. In each experiment, 4 rings from both nonpregnant and pregnant rats were used. They were equilibrated for 60 min under 2.0 g passive tension, the optimal tension for both groups of tissues (25) with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in Krebs bicarbonate solution (KBS) of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5.5 dextrose. The solution was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>; pH was 7.4. After equilibration, the tissues were challenged with 1.0 µM phenylephrine. At plateau response, carbachol (0.1 mM) was added to ensure removal of the endothelium. Tension was measured

by force-displacement transducers and recorded on a computerized data acquisition system using Work Bench software (Kent Scientific, Litchfield, CT).

#### *Experimental protocol*

Cumulative concentration-response curves to endothelin-1 ( $10^{-11}$ M to 3 $\mu$ M) and sarafotoxin -6C ( $10^{-11}$ M to 3 $\mu$ M) were performed.

In each experiment, three aortic rings of both nonpregnant and pregnant rats were assayed simultaneously. Two rings of both nonpregnant and pregnant rats (control and treated) were contracted with endothelin-1. One served as control while the other was pre-incubated with BQ123 ( $10^{-6}$  M) added 10 min before charting the curve. The third ring of both non-pregnant and pregnant rats (control and treated) was assayed with sarafotoxin-6C.

#### *Data analysis*

Each concentration-response curve was analyzed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation with the Prism 3.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA) to evaluate the concentration producing 50% of the maximal response ( $EC_{50}$ ) and the maximum asymptote of the curve ( $E_{max}$ ).  $\Delta E_{max}$  and  $\Delta pD_2$  were calculated by subtracting each individual values of  $E_{max}$  or  $pD_2$ , obtained in presence of BQ123, from the appropriate basal response. Resulting responses were then managed to get an average. Different curves from the same protocol were compared by one-way ANOVA on mean  $pD_2$ , the negative logarithm of the  $EC_{50}$ , on mean  $E_{max}$ ,

on mean  $\Delta E_{\max}$  and on mean  $\Delta pD_2$ . Data are expressed as mean experimental points with their standard error (SEM) along the best curve fitted to these points.

### *Drugs and chemicals*

All salts employed in these experiments were of analytical grade and obtained from Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada). Phenylephrine hydrochloride, carbamylcholine chloride (carbachol) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Endothelin-1, BQ123 and sarafotoxin-6C were purchased from Bachem (Torrance, CA).

## Results

*Control groups* : Compared to non-pregnant animals, responsiveness and sensitivity to Et-1 were reduced in aortic rings of pregnant control rat (Fig.1A,  $P < 0.01$ ). This was manifested by significant reductions in both  $E_{max}$  and  $pD_2$  to Et-1. BQ123 antagonized the effect of Et-1 by significantly reducing both  $E_{max}$  and  $pD_2$  of the peptide in tissues of both non-pregnant and pregnant control rats (Fig 1A,  $P < 0.05$ ). The reduction of  $E_{max}$  and sensitivity to Et-1 induced by BQ123 were more important in non-pregnant rats (Table 1). These results indicate that pregnancy in the rat is associated with decreased vasoconstrictor responses to ET-1, as has been reported for other vasoconstrictors (see below).

*0.9% NaCl treated group* : Responses to Et-1 in both group of rats treated with 0.9% NaCl were similar in terms of  $E_{max}$  and  $pD_2$  (Figure1 and Table 1). The presence of  $10^{-6}$  mol/L BQ123, without affecting  $E_{max}$ , produced a right shift of the concentration-responses curve to Et-1 that was more important in aorta of pregnant rats compared to non-pregnant (Table 1). This show that under 0.9% NaCl diet, the difference in reactivity to ET-1, associated with pregnancy, is abolished.

Indeed, compared to control diet,  $E_{max}$  to Et-1 was significantly reduced in aorta of 0.9% NaCl treated non-pregnant animals and increased in the ones of pregnant rats. Sensitivity,  $pD_2$ , to Et-1 was also significantly increased by 0.9% NaCl in aorta of pregnant animals (Table 1). In the presence of BQ123,  $E_{max}$  and  $pD_2$  of ET-1 on aortic rings were increased by 0.9% NaCl supplement in the non-pregnant group (Table 1), while only  $E_{max}$  was increased in vessels of pregnant animals. This

suggest that 0.9% NaCl supplement had opposite effects of aortic responses to ET-1 in non-pregnant and pregnant rats.

*1.8% NaCl treated groups* : Emax to ET-1 was significantly more important in aortic rings of pregnant rats compared to non-pregnant rats when both groups were supplied by 1.8% NaCl. Otherwise, tissues of non-pregnant rats were significantly more sensitive to ET-1 than aortic rings of pregnant rats (Fig. 1B). BQ123 induced a reduction in Emax only in the aorta of pregnant animals while it reduced sensitivity to ET-1 to the same level (similar pD<sub>2</sub>). Indeed, the rightward shift of the concentration-responses curve to Et-1 induced by 10<sup>-6</sup>mol/L BQ123 was significantly more important in aorta of non-pregnant rats than of pregnant animals. These data show that under the 1.8% NaCl supplement, aortic rings of pregnant rat has an increased responsiveness to ET-1, but still show reduced sensitivity to the peptide.

Compared to control diet, Emax to Et-1 was significantly reduced in aorta of non-pregnant animals and significantly increased in the ones of pregnant when animals were under 1.8% NaCl supplement. Sensitivity (pD<sub>2</sub>) to Et-1 was increased in both tissues of non-pregnant and pregnant rats when animals were treated with 1.8% NaCl and this increase was more important in aortic rings of non-pregnant rats. (Table 1). Furthermore, the reduction in sensitivity to Et-1 induced by BQ123 was more important when rats were treated with 1.8% NaCl supplement than with 0.9% NaCl supplement (Table 1). Finally, potency of BQ123 appeared to be significantly increased in aortic rings of non-pregnant and pregnant rats treated with 1.8% NaCl compared to tap water supplied (Table 1). Increased NaCl supplementation of the diet further decreased Emax to ET-1 in aorta of non-pregnant animal while it had the

opposite effect on aorta of pregnant rats. Moreover, the 1.8% NaCl supplement was accompanied by increased sensitivity to the peptide in tissues of both groups of rats. It was strongly and significantly more important in non pregnant animals (Table 1).

We have also measured in the aortic rings of all animals the effect of sarafotoxin 6C. We did not observe any effect of this agonist, suggesting that in the conditions tested,  $ET_B$  receptors were absent.



## Discussion

This study was undertaken to investigate the contractile effects of Et-1 and the contributions of  $ET_A$  and  $ET_B$  receptor mediating this response during normal gestation and after increased sodium intake in this condition. The major findings of this work are that :1) as for other vasoconstrictors, gestation is accompanied by a decreased reactivity of the thoracic aortic rings to Et-1; 2) in non pregnant animals, sodium supplements, through NaCl in the drinking water, reduced maximum responses to endothelin-1 but has different effect on sensitivity to the peptide; 3) in pregnant rats, sodium supplements increased progressively both maximum responses and sensitivity of the aorta to Et-1; 4) sarafotoxin 6C, an  $ET_B$  agonist, did not have any contractile effect on the thoracic aorta of all groups of animals; 5) BQ123, an  $ET_A$  antagonist, strongly reduced the effect of Et-1 in the aortic rings of all groups of animals, with a potential that did not appear to be much affected by sodium supplements. These results suggest that sodium supplementations modulated endothelin-1 responses in different ways between non-pregnant and pregnant rats.

When animals were under normal diet, gestation was accompanied by a decreased reactivity of the thoracic rings to Et-1. During gestation, vascular resistance to many exogenous vasoactive substances has been reported. Decreased responses to vasoconstrictors are also observed in isolated blood vessels, indicating that the mechanisms responsible are not dependent on cardiovascular reflex (26,9). It has been shown that the decreased responsiveness of blood vessels to vasoconstrictors agent is not dependent on a downregulation of their receptors (27), or an increased release of endogenous vasodilators (28) and still persist when

endothelium is removed from blood vessels (28,29). It was also suggested that modifications of mechanical properties of tissue composition leading to increased compliance of vessels and/or alterations of receptor-responses coupling could be involved (30,31).

In non pregnant animals, sodium supplements progressively reduced maximum responses to ET-1 whereas only the 1.8% NaCl supplement increased sensitivity to the peptide. In pregnant rats, sodium supplements increased progressively both maximum responses and sensitivity of the aorta to Et-1. One must keep in mind that the pregnant rats under 1.8% NaCl diet showed elevation of blood pressure and proteinuria, manifestations that also accompanied preeclampsia (14). Thus, the progressive increase of responsiveness to Et-1 may be linked to an upregulation of ET<sub>A</sub> receptors. This possibility is concordant with Montagnani et al. (32) who suggested that increased responsiveness of SHR vascular mesenteric bed to Et-1 was due to an increase of the number of ET<sub>A</sub> receptors during hypertension. However, decreased density of ET<sub>A</sub> receptor on thoracic aorta of SHR (33) and hypertensive human (34) has also reported. In fact, if a modulation of the number of ET<sub>A</sub> receptors by sodium supplementations occurred in our study, our results suggested that it was in a different way between non-pregnant and pregnant rats.

Another possibility for the progressive increased responsiveness to Et-1 in aorta of pregnant rats by NaCl supplement may be linked to an increased L-type voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel activity and Ca<sup>2+</sup> influx. In vascular smooth muscle, ET-1 induced membrane depolarisation is associated with activation of voltage-dependent ion channels and Ca<sup>2+</sup> influx from the extracellular space. Voltage clamp

studies in single cells confirmed that L-type channels were activated and it was proposed that Et-1 was a direct activator of these  $\text{Ca}^{2+}$  channels (35). A later report supported this claim by providing additional data indicative of a specific G-protein directly linking endothelin-1 receptors and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (36). During hypertension and preeclampsia, voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  activity (37-40) and calcium influx are increased (41-43). Our previous study showed that  $\text{Ca}^{2+}$  channels sensitive to dihydropyridines were possibly more active during pregnancy when rats were under sodium supplementations. During this study, if L-type voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels activity and  $\text{Ca}^{2+}$  influx were to be increased as in other reports, it could explain why responsiveness to Et-1 was increased in the aorta of pregnant animals under sodium supplements. These speculations remain to be confirmed. However, our results suggest that if sodium supplementations modulate voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  activity and  $\text{Ca}^{2+}$  influx, it is done in different way in non-pregnant and pregnant rats.

It was observed that responses of the aorta to ET-1 in the presence of BQ123 show much less variation than in its absence. By only comparing, from our results, the difference in  $\text{pD}_2$  to ET-1 in absence and presence of BQ123 (Table 1), it appears that potency of the antagonist was greater in aorta of non pregnant than pregnant rats and was upregulated in both groups by the 1.8% NaCl supplement. Under normal diet, the effects of BQ123 on ET-1 responses were more important in tissues of non pregnant rats. The opposite was true in aorta of rats under 0.9% NaCl. When animals were supplied by the 1.8% NaCl supplemented diet, the inhibitory effects of BQ123 on ET-1 responses was increased in both groups compared to control diet. Again it was more important in aortic rings of non-pregnant rats. These results

suggest that sodium supplementations modulated the sensitivity of ET<sub>A</sub> receptors in thoracic aorta in different way between non-pregnant and pregnant rats.

During this study, no contractile response to sarafotoxine 6C, an ET<sub>B</sub> agonist, was observed. These results suggest that ET<sub>B</sub> receptors are absent from the rat thoracic aorta and concordant with Kuc et al who did not detect ETB receptors on the human aorta of patients with and without cardiovascular disease (34).

In summary, this study showed that sodium supplementation modulates ET-1 responses in different ways between non-pregnant and pregnant rats. Responsiveness to ET-1 was increased by sodium supplementation during pregnancy. This is possibly due to an upregulation of ET<sub>A</sub> receptor and/or an increase of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels activity and/or calcium influx, but remains to be confirmed.

## References

1. Yanagisawa M. Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends in Pharmacological Sciences*. 10(9):374-8, 1989.
2. Highsmith RF. Blackburn K. Schmidt DJ. Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Annual Review of Physiology*. 54:257-77, 1992.
3. Vane JR. Anggard EE. Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England Journal of Medicine*. 323(1):27-36, 1990.
4. Kelly JJ. Whitworth JA. Endothelin-1 as a mediator in cardiovascular disease. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 26(2):158-61, 1999.
5. Miller RC. Pelton JT. Huggins JP. Endothelins--from receptors to medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 14(2):54-60, 1993.
6. Arai H. Hori S. Aramori I. Ohkubo H. Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 348(6303):730-2, 1990.
7. Sakurai T. Yanagisawa M. Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 13(3):103-8, 1992.
8. Haynes HG. Endothelins as regulators of vascular tone in man. *Clinical Sciences*. 88: 509-17, 1995.

9. Massicotte G. St-Louis J. Parent A. Schiffrin EL. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 2466-71, 1987.
10. Cunningham FG. Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy. *New England Journal of Medicine.* 326(14):927-32, 1992.
11. Chesley LC. Hypertensive disorder in pregnancy. New York, Appleton-Century-Crofts 1978.
12. Granger J. Alexander B. Bennett W. Khali R. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *American Journal of Hypertension.* 14 (1) : 178S-85S, 2001.
13. Poston et al. Aortic function during normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 154 (1) : 887-91, 1995.
14. Beauséjour A. Auger K. St-Louis J. Brochu M. Sodium supplementation prevents the decrease of blood pressure observed during normal pregnancy in rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (in preparation)
15. Auger K. Beauséjour A. Brochu M. St-Louis J. Sodium supplements during gestation : effects on vascular reactivity and K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels functions. *American journal of Physiology* (in preparation)

16. Barden A. Beilin LJ. Ritchie J. Walters BN. Michael CA. Plasma and urinary endothelin 1, prostacyclin metabolites and platelet consumption in pre-eclampsia and essential hypertensive pregnancy. *Blood Pressure*. 3(1-2):38-46, 1994.
17. Malassine A. Cronier L. Mondon F. Mignot TM. Ferre F. Localization and production of immunoreactive endothelin-1 in the trophoblast of human placenta. [Journal Article] *Cell & Tissue Research*. 271(3):491-7, 1993.
18. Mondon F. Malassine A. Robaut C. Vial M. Bandet J. Tanguy G. Rostene W. Cavero I. Ferre F. Biochemical characterization and autoradiographic localization of [125I]endothelin-1 binding sites on trophoblast and blood vessels of human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 76(1):237-44, 1993.
19. Sabry S. Mondon F. Levy M. Ferre F. Dinh-Xuan AT. Endothelial modulation of vasoconstrictor responses to endothelin-1 in human placental stem villi small arteries. *British Journal of Pharmacology*. 115(6):1038-42, 1995.
20. Bogoni G. Rizzi A. Calo G. Campobasso C. D'Orleans-Juste P. Regoli D. Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein. *British Journal of Pharmacology*. 119(8):1600-4, 1996.
21. Dekker GA. Kraayenbrink AA. Zeeman GG. van Kamp GJ. Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia.

- European Journal of Obstetrics, Gynecology, & Reproductive Biology.*  
40(3):215-20, 1991.
22. Clark BA. Halvorson L. Sachs B. Epstein FH. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 166(3):962-8, 1992.
23. Taylor RN. Varma M. Teng NN. Roberts JM. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 71(6):1675-7, 1990.
24. St-Louis J. Sicotte B. Prostaglandin-or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 166: 684-92, 1992
25. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology.* 280(1):1-9, 1995.
26. Dogterom J. De Jong W. Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology.* 25(2):267-9, 1974.



27. Davidge ST. McLaughlin MK. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from pregnant rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 167: 1691-98, 1992
28. St-Louis J. Sicotte B. Prostaglandin-or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 166: 684-92, 1992.
29. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology*. 280(1):1-9, 1995.
30. Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE and vasopressin in pregnant rats. *American Journal of Physiology*. 247: H100-08, 1984.
31. St-Louis J. Massicotte G. Parent A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse : influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Sciences*. 6(1):358-65, 1988.
32. Montagnani M. Potenza MA. Rinaldi R. Mansi G. Nacci C. Serio M. Vulpis V. Pirrelli A. Mitolo-Chieppa D. Functional characterization of endothelin receptors in hypertensive resistance vessels. *Journal of Hypertension*. 17(1):45-52, 1999.

33. Clozel M. Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 7(11):913-7, 1989.
34. Kuc RE. Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 36(5 Suppl 1):S377-9, 2000.
35. Goto K. Kasuya Y. Matsuki N. Takuwa Y. Kurihara H. Ishikawa T. Kimura S. Yanagisawa M. Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(10):3915-8, 1989.
36. Kasuya Y. Takuwa Y. Yanagisawa M. Masaki T. Goto K. A pertussis toxin-sensitive mechanism of endothelin action in porcine coronary artery smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 107(2):456-62, 1992.
37. Ohya Y. Fujii K. Eto K. Abe I. Fujishima M. Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in resistance arteries from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research*. 23(6):701-7, 2000.
38. Storm DS. Webb RC. Contractile responses to Bay K 8644 in rats with coarctation-induced hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 203(1):92-9, 1993.

39. Watts SW. Finta KM. Lloyd MC. Storm DS. Webb RC. Enhanced vascular responsiveness to Bay K 8644 in mineralocorticoid- and N-nitro arginine-induced hypertension. *Blood Pressure*. 3(5):340-8, 1994.
40. Ebeigbe AB. Ezimokhai M. Aloamaka CP. Responses of arterial smooth muscle from normotensive and pre-eclamptic subjects to the calcium channel agonist, Bay K 8644. *Research in Experimental Medicine*. 187(6):461-8, 1987.
41. Crews JK. Novak J. Granger JP. Khalil RA. Stimulated mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry into vascular smooth muscle during NO synthesis inhibition in pregnant rats. *American Journal of Physiology*. 276(2 Pt 2):R530-8, 1999.
42. Khalil RA. Crews JK. Novak J. Kassab S. Granger JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension*. 31(5):1065-9, 1998.
43. Rapp JP. Nghiem CX. Onwochei MO. Aortic calcium uptake and efflux in spontaneously hypertensive and inbred Dahl rats. *Journal of Hypertension*. 4(4):493-9, 1986.

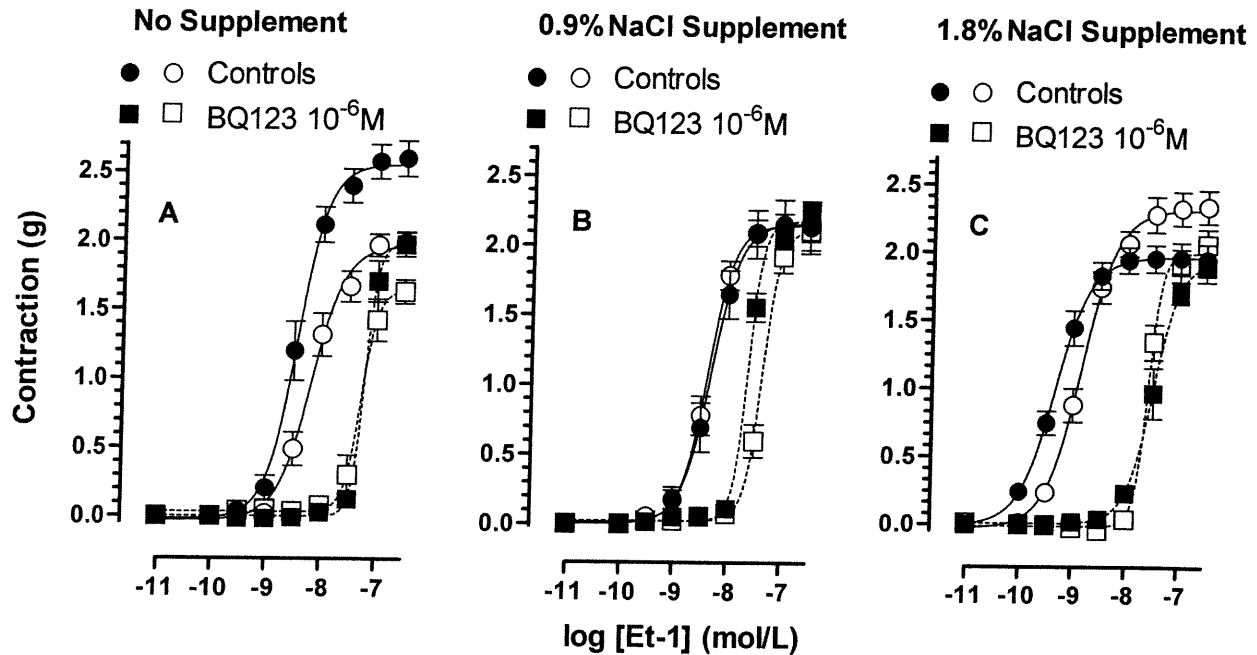


Fig.1 Concentration-response curves to endothelin-1 (Et-1) in aortic rings from non-pregnant (filled symbols) and pregnant (open symbol) control rats (A), and rats supplemented with 0.9% NaCl (B) and 1.8% NaCl (C). Curves were obtained in the absence ( $\bullet$  and  $\circ$ ) or in the presence of  $10^{-6}$  mol/L BQ123 ( $\blacksquare$  and  $\square$ ). Curves are best fits to mean  $\pm$  SE experimental points ( $n=10$ ). Ordinate depicts responses in tension (g), whereas abscissa represents the logarithm of endothelin-1 concentrations (mol/L).

Table 1. Effects of 0.9% and 1.8% NaCl supplement on maximal responses and sensitivity to endothelin-1 without and with BQ123  $10^{-6}$ M pre-incubation in non-pregnant and pregnant rats

	Non- pregnant			Pregnants		
	NaCl Supplement			NaCl Supplement		
	None	0.9%	1.8%	None	0.9%	1.8%
<b>Basal Responses</b>						
$E_{max}$ :	2.56 ± 0.07	2.17 ± 0.09*	1.97 ± 0.05*	1.96 ± 0.06†	2.15 ± 0.05*	2.42 ± 0.06*†
$pD_2$ :	8.45 ± 0.05	8.31 ± 0.07	9.34 ± 0.07*	8.18 ± 0.05†	8.37 ± 0.04*	8.74 ± 0.06*†
<b><math>10^{-6}</math>mol/L BQ123</b>						
$E_{max}$ :	1.98 ± 0.08	2.18 ± 0.04*	1.93 ± 0.09	1.64 ± 0.08†	2.12 ± 0.08*	2.00 ± 0.06*
$pD_2$ :	7.20 ± 0.03	7.62 ± 0.02*	7.50 ± 0.05*	7.27 ± 0.05	7.35 ± 0.04†	7.59 ± 0.03*
$\Delta E_{max}$ :	0.58 ± 0.07	0.01 ± 0.06*	0.04 ± 0.07*	0.32 ± 0.07†	0.03 ± 0.06*	0.42 ± 0.06†
$\Delta pD_2$ :	1.25 ± 0.04	0.69 ± 0.04*	1.84 ± 0.06*	0.91 ± 0.05†	1.02 ± 0.04†	1.15 ± 0.04†

Values are means ± SE.  $pD_2$ , sensitivity;  $E_{max}$ , maximal response.

\* vs respective control and † vs same treatment in non pregnant rat

## **4. DISCUSSION**

#### 4. Discussion

Les travaux que nous avons décrits dans ce mémoire ont été entrepris afin de caractériser les mécanismes de réactivité vasculaire dans un modèle expérimental de prééclampsie. Les principales observations que nous avons faites sont que les suppléments sodiques 0.9% et 1.8% NaCl entraînent des changements hémodynamiques importants durant la grossesse chez les rates. Des modifications de la pression artérielle (0.9% et 1.8% NaCl) et l'apparition de protéinurie (1.8% NaCl) permettent de croire que la plus forte concentration en sodium induirait la prééclampsie chez les rates gestantes. Durant cette présente étude, nous voulions déterminer si la modulation de la pression artérielle par les suppléments sodiques s'accompagnait également de modifications au niveau de la réactivité vasculaire. Nous avons principalement étudié les canaux potassiques et calciques ainsi que les récepteurs de l'endothéline. Nous voulions déterminer comment les suppléments sodiques influencent lesdits canaux et récepteurs.

Les résultats obtenus avec les courbes au tétraéthylammonium (TEA), un bloqueur non sélectif des canaux potassiques, démontrent une importante différence de réactivité des anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes. Nous avons observé que le TEA induit, en lui-même, une contraction et ce uniquement sur les anneaux aortiques de rates non gestantes sans produire d'effet important sur ceux de rates gestantes malgré les hautes concentrations utilisées. En l'absence de préstimulation sur les anneaux de rates non gestantes, la réponse au TEA est identique à celle obtenue sur les aortes de rates gestantes préstimulées avec 10mM de KCl. Ces résultats suggèrent, comme ceux obtenus par Cadorette et al. [18] avec

le TEA et par Roy et al. [140] avec le Bay 8644, qu'il y aurait une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses durant la gestation. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Meyer et al. [109] qui rapportent une hyperpolarisation de 7mV de la membrane des muscles lisses vasculaires des artères mésentériques de résistance de rates gestantes.

Les différences de réactivité vasculaire au TEA observées entre les tissus de rates non gestantes et gestantes ne sont pas renversées par les suppléments sodiques 0.9% et 1.8% NaCl. Ceci suggère donc que les suppléments 0.9% et 1.8% NaCl ne modifient pas les mécanismes dans les cellules musculaire lisses qui sont responsables des différentes réponses au TEA durant la gestation. Cependant, Bayorh et al. [45] ont mesuré le potentiel membranaire à l'aide de microélectrodes sur des vaisseaux mésentériques de résistance et de conductance de rats spontanément hypertendus (SHR) recevant une diète normale ou riche en sel (8% NaCl). Les rats SHR recevant la diète riche en sel avaient une pression artérielle systolique significativement plus élevée que celle des rats SHR sous diète normale. De plus, le potentiel membranaire des vaisseaux mésentériques de rats SHR sous diète riche en sel était toujours moins négatif d'environ 6mV comparativement à celui des rats SHR témoins. Les résultats obtenus ont mené à la conclusion qu'une diète riche en sel (8% NaCl) conduit à une dépolarisation membranaire qui pourrait contribuer à l'aggravation de l'hypertension [45]. De plus, Wesselman et al. ont démontré que l'élévation de la pression dans les artères mésentériques cannulées de rats males induit une dépolarisation des muscles lisses [171].



Durant notre étude, les rates gestantes recevant le supplément 0.9% NaCl ne présentaient pas de diminution de pression artérielle systolique en fin de gestation alors que celles recevant le supplément 1.8% NaCl avaient une pression artérielle systolique significativement augmentées [4]. À la lumière des résultats obtenus par Bayorh et al. et Wesselman et al., on aurait donc peut-être pu s'attendre à ce que les anneaux aortiques de rates gestantes recevant le supplément 1.8% NaCl aient un potentiel membranaire moins négatifs et donc qu'ils répondent au TEA en l'absence de pré-stimulation au KCl. Les résultats de Beauséjour et al. [4] montrent que les rates gestantes recevant de la saline 1.8% NaCl comme breuvage possèdent certaines caractéristiques de la prééclampsie (augmentation de la pression artérielle, protéinurie, restriction de croissance intrautérine), mais une caractérisation plus approfondie du modèle animal demeure nécessaire. Le potentiel membranaire chez des cellules musculaires lisses reste à être établi puisqu'à ce jour, aucune mesure directe de potentiel membranaire chez des sujets prééclamptiques, humains ou animaux, ne semble avoir été réalisée.

Puisque les canaux potassiques sont parmi les principaux acteurs dans la régulation du potentiel membranaire, nous avons tenté de déterminer s'ils étaient différemment régulés durant la gestation suite aux suppléments sodiques 0.9% et 1.8% NaCl. Nous avons concentré nos études sur deux classes de canaux potassiques qui joueraient un rôle prédominant; ceux sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et ceux qui sont dépendants du calcium ( $K_{Ca}$ ) qui jouent respectivement des rôles dans la détermination du potentiel membranaire au repos ainsi qu'au niveau d'une rétro-inhibition négative lors de la contraction.

Les canaux potassiques auraient un rôle important dans le phénomène d'hyperpolarisation rencontrée dans les cellules de muscle lisse vasculaire durant la gestation [18]. Il a été démontré que le TEA, à des concentrations inférieures à 1mM, est sélectif au  $K_{Ca}$  et, qu'à des concentrations d'environ 6mM, il inhibe les canaux  $K_{ATP}$ . Il devient de moins en moins sélectif avec l'augmentation de sa concentration [94]. Ces résultats suggèrent, tout comme ceux obtenus en réponse au TEA par Cadorette et al. [18], que la capacité générale des canaux potassiques à être inhibés, que ce soient les  $K_{Ca}$  ou les  $K_{ATP}$ , est réduite durant la gestation, ce qui supporte leur implication dans l'hyperpolarisation présumée. Cette réduction ne semble pas être levée par les suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl) puisque, en l'absence de pré-stimulation au KCl, aucune contraction au TEA n'est observée chez les rates gestantes recevant ces suppléments.

Des études effectuées sur l'aorte thoracique [143;144] et la carotide [96] de rates spontanément hypertendues (SHR) rapportent que le TEA a un effet contractile sur ces tissus. En effet, des concentrations de 0.1mM à 1mM de TEA induisent des contractions dépendantes de la concentration sur les tissus de rats SHR alors qu'à ces concentrations, aucune réponse n'est observée chez les tissus de rats normotendus. Il est suggéré que l'augmentation de réponse au TEA chez les tissus de rats SHR soit associée à une augmentation de l'activité des canaux  $K_{Ca}$  au potentiel de repos [96]. Cette augmentation d'activité des canaux  $K_{Ca}$  serait directement modulée par une augmentation de pression artérielle. De plus, lors d'études de patch clamp, pour un potentiel membranaire et une concentration de calcium intracellulaire donnés, les canaux  $K_{Ca}$  de cellules aortiques de rats SHR présentent toujours une plus grande probabilité d'ouverture que les canaux  $K_{Ca}$

retrouvés chez les cellules aortiques de rates normotendues [144]. Les canaux  $K_{Ca}$  se retrouvent également en nombre supérieur sur les cellules aortiques de rats SHR et apparaissent comme étant plus sensibles au calcium que les canaux retrouvés sur l'aorte de rats normotendus. L'augmentation de l'activité, du nombre et de la sensibilité au calcium des canaux  $K_{Ca}$  se traduisent par une augmentation du courant  $K_{Ca}$  dans les membranes de muscles artériels de rats SHR. Ceci pourrait représenter un mécanisme homéostatique visant à tamponner l'excitabilité artérielle et à prévenir d'ultérieures augmentations de la résistance vasculaire durant l'hypertension [143].

L'effet contractile du TEA a été observé chez les tissus de rates normotendues à partir d'environ 6 mmol/L, [96;143;144], ce qui est tout à fait en accord avec les résultats obtenus chez les rates non gestantes dans la présente étude. En effet, les rates non gestantes sous diète régulière et recevant les suppléments sodique 0.9% et 1.8% NaCl sont toutes normotendues [4] et le TEA induit une contraction de leurs anneaux thoraciques à partir de concentrations d'environ 6mmol/L.

Durant notre étude, l'activité des canaux  $K_{Ca}$ , qui auraient un rôle important à jouer au niveau de la rétroinhibition lors d'une contraction, fut également étudiée à l'aide d'un activateur des canaux  $K_{Ca}$ , le NS1619. Le NS-1619 est un activateur des canaux potassiques à haute conductance et activés par le calcium. Il inhibe les contractions induites par la norépinéphrine dans la partie épидидymale des *vas deferens* [77], l'activité spontanée dans la veine porte de rat d'une façon dépendante de la concentration ainsi que les contractions induites par le KCl dans l'aorte de rat

[36]. Dans notre étude, lorsque les rates étaient sous diète normale, l'effet inhibiteur du NS-1619 sur les réponses contractiles à l'AVP étaient similaires sur les tissus de rates non gestantes et gestantes. Lorsque les tissus étaient stimulés à la PhE et au KCl, le NS-1619 ne parvenait à diminuer significativement l' $E_{max}$  que sur les anneaux aortiques de rates non gestantes. Ces résultats diffèrent de ceux de Cadorette et al. qui ont rapporté que l'effet inhibiteur du NS-1619 sur les réponses contractiles à la PhE, au KCl et à l'AVP est toujours plus important sur les tissus de rates gestantes que non gestantes [18]. Cette différence de l'effet inhibiteur du NS-1619 peut peut-être s'expliquer par la différente concentration d'agent utilisée, soit 10uM durant notre étude et 30uM durant les travaux de Cadorette et al. [18]. Chez les non gestantes, le NS-1619 perd de son pouvoir inhibiteur lorsque les animaux reçoivent les suppléments sodiques. Ceci est particulièrement vrai lorsque les tissus sont stimulés à l'AVP et que les rates non gestantes reçoivent la saline 1.8% NaCl comme breuvage; le NS1619 n'a alors plus de pouvoir inhibiteur. Chez les rates gestantes, la même tendance est observée, sauf quand les tissus sont stimulés à la PhE où l'effet inhibiteur du NS-1619 est alors augmenté. Ainsi, le traitement avec les suppléments sodiques (particulièrement 1.8%) serait associé à une activation des canaux  $K_{Ca}$ . Toutefois, étant donné que l'activité des canaux  $K_{Ca}$  est également modulée par les diètes 0.9% et 1.8% NaCl chez les tissus de rates non gestantes, cette augmentation d'activité ne peut pas être attribuée à l'hypertension (ou la possible prééclampsie) survenant durant la grossesse. Le sel semble moduler l'activité des canaux  $K_{Ca}$  par un mécanisme restant à être élucidé.

Nous avons également observé que l'activateur de canaux  $K_{ATP}$ , soit la cromakalime, atténuent les réponses myotropes à la phényléphrine (PhE), au

chlorure de potassium ainsi qu'à la vasopressine (AVP). L'effet inhibiteur de la cromakalime était toujours beaucoup plus important lorsque les tissus étaient contractés à l'AVP et à la PhE qu'au KCl. La plus grande efficacité de la cromakalime sur les courbes à l'AVP pourrait être expliquée par les études d'électrophysiologie sur les artères coronaires de porc qui ont montré que la vasopressine agissait en bloquant les canaux  $K_{ATP}$  [167]. Cependant, Dumont et Lamontagne [31] expliquent ce phénomène en prédisant que la vasopressine serait plus dépendante de l'influx de calcium via les canaux calciques dépendants du voltage que la vasoconstriction induite par la PhE. Ces conclusions appuient le mécanisme d'action de la cromakalime qui, en stimulant les canaux  $K_{ATP}$ , pourrait maintenir le potentiel membranaire près du potentiel d'équilibre du  $K^+$  [65], soit de -45 à -60mV, diminuant ainsi la probabilité d'ouverture des canaux calciques de type L et T.

Les résultats obtenus en présence de cromakalime semblent montrer qu'elle n'arrive pas à produire les mêmes effets inhibiteurs sur la réponse maximale en réponse au KCl. Quast [133] a démontré que l'effet hyperpolarisant de la cromakalime n'est plus observable lorsque la concentration de KCl utilisée afin de dépolariser la cellule est supérieure à 50mM. De plus, nous avons observé une différence de réactivité au KCl, dont l'action est indépendante d'un récepteur, entre les tissus témoins des rates non gestantes et gestantes peu importe la diète reçue. Ces résultats démontrent que l'atténuation de réactivité aux vasopresseurs durant la gestation ne survient pas uniquement en réponse aux agents contractiles liés à des récepteurs, ce qui est en accord avec Meyer et al [109] et qui fut plusieurs fois rapporté par notre laboratoire. Cependant, les artères carotidiennes de rates

spontanément hypertendues sont plus sensibles à la dépolarisation au KCl que les rates normotendues sans que leur réponse maximale ne soit différente. Cette augmentation de sensibilité au KCl serait liée à une augmentation de la perméabilité aux ions potassium durant l'hypertension [96]. Durant cette présente étude, les rates gestantes hypertensives, soient celles recevant le supplément 1.8% NaCl, présentaient au contraire une diminution marquée de sensibilité au KCl. Ces résultats sont donc plus en accord avec ceux de Heilmann et al. qui rapportent que durant l'hypertension de grossesse, la perméabilité aux ions potassium est diminuée [69].

Durant la gestation normale, certains canaux  $K_{ATP}$  seraient à l'état ouvert au repos, possiblement en réponse à une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP [18]. Conséquemment, l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par la cromakalime a un effet plus important dans les vaisseaux de rates non gestantes. Alternativement, l'inhibition de ces canaux avec la glibenclamide montre plus d'effet chez les aortes de rates gestantes. Cette activation de quelques canaux résulterait en une diminution de la polarité membranaire [18]. Dans l'hypertension, les résultats entourant l'activité des canaux  $K_{ATP}$  sont controversés. Lors d'une étude effectuée sur l'artère carotide de rates, Koliass et al. ont rapporté que la relaxation des vaisseaux à la diazoxide (activateur des canaux  $K_{ATP}$ ) et la contraction subséquente à la glyburide (bloqueur des canaux  $K_{ATP}$ ) ne sont pas différentes chez les rates spontanément hypertendues et normotendues. Ils suggèrent que l'activité des canaux  $K_{ATP}$  n'aurait pas de rôle à jouer dans l'augmentation de la réponse vasculaire aux vasopresseurs durant l'hypertension [96]. Kitazomo et al. [93] rapportent quant à eux que la dilatation des artères mésentériques par l'aprikalim est similaire chez les rats SHR et normotendus malgré une diminution de la sensibilité des tissus de rats SHR pour cet ouvreur de

canaux  $K_{ATP}$ . Lors d'études de patch clamp effectuées sur des cellules d'artères mésentériques, Ohya et al. [121] ont démontré que la sensibilité et la réponse maximale à la levcromakalim (ouvreur canaux  $K_{ATP}$ ) sont diminuées chez les rats SHR. De plus, lorsque les artères mésentériques sont stimulées à la levcromakalime subséquemment à la contraction des vaisseaux par 1 $\mu$ M de phényléphrine, la courbe concentration-réponse est alors déplacée vers la droite chez les tissus de rats SHR. Étant donné que les tissus de rats SHR répondent moins à la stimulation des ouvreurs de canaux  $K_{ATP}$  que ceux des rats normotendus, ceci suggère donc que les canaux  $K_{ATP}$  seraient activés durant l'hypertension. Ces résultats sont en accord avec ceux de Obiefuna et al. [119] qui rapportent que les canaux  $K_{ATP}$  sur les muscles lisse d'aorte thoracique seraient activés durant l'hypertension induite par une diète riche en sel. En effet, lorsque les anneaux thoraciques sont pré-contractés avec 10 $\mu$ M noradrénaline, la relaxation des tissus induite par la cromakalime (ouvreur canaux  $K_{ATP}$ ) est significativement moins importante chez les rats recevant une diète riche en sel (80g/Kg NaCl) que chez les animaux recevant une diète normale (3g/Kg NaCl) [119].

Toutefois, des résultats contradictoires sont également rapportés. Furspan et al. [46] ont démontré que, chez les artères de queue de rat pré-contractées avec 35mM KCl, la relaxation des tissus induite par la diazoxide (ouvreur de canaux  $K_{ATP}$ ) est significativement plus élevée chez les rats SHR que normotendus. De plus, les effets de la glyburide (bloqueur canaux  $K_{ATP}$ ), sont diminués de façon marquée dans les artères de queue de rats SHR. L'augmentation de réponse à la diazoxide et la diminution de réponse à la glyburide suggèrent que les canaux  $K_{ATP}$  seraient plutôt désactivés durant l'hypertension. Les résultats de Ebeidge et al. [32] suggèrent que

le même phénomène pourrait être rencontré durant la prééclampsie. Leurs études ont été effectuées chez des artères épigastriques inférieures de femmes prééclamptiques et dont la grossesse se déroulait normalement. Lorsque les tissus sont pré-contractés avec  $10^{-7}$ M noradrénaline ou 60mM KCl, l'effet relaxant de la cicletanine (ouvreur canaux  $K_{ATP}$ ) est alors significativement plus important chez les tissus de femmes prééclamptiques.

St-Louis et al. [156] ont démontré que la différence de réactivité vasculaire observée durant la gestation chez les artères mésentériques de rates se rencontre également de la même façon chez les aortes thoraciques. Durant la présente étude, lorsque les anneaux aortiques étaient stimulés avec la PhE et le KCl, la cromakalime avait toujours eu un effet inhibiteur plus important chez les tissus de rates non gestantes lorsque les animaux étaient sous diète normale. Ces résultats sont en accord avec ceux de Cadorette et al. qui suggèrent que les canaux  $K_{ATP}$  seraient à l'état ouvert durant la gestation [18]. Lorsque les rates reçoivent les suppléments 0.9% et 1.8% NaCl, l'effet inhibiteur de la cromakalime est alors très similaire chez les rates non gestantes et gestantes. Chez les rates témoins, la gestation semble être accompagnée d'une activation des canaux  $K_{ATP}$ , mais cet effet de gestation est levé lorsque les rates reçoivent une diète supplémentée de sodium (0.9% et 1.8% NaCl). Nos résultats suggèrent que la fraction de canaux  $K_{ATP}$  activés durant la gestation ne l'est plus lorsque les rates gestantes reçoivent de la saline comme breuvage. Les suppléments 0.9% et 1.8% NaCl auraient donc une influence pour désactiver des canaux  $K_{ATP}$  durant la gestation. De plus, lorsque les tissus sont stimulés à la phényléphrine, l'effet inhibiteur de la cromakalime augmente chez les rates gestantes recevant les suppléments 0.9% et 1.8% alors qu'il ne change pas



chez les rates non gestantes. Ces résultats suggèrent que certains canaux  $K_{ATP}$  sont désactivés en l'absence de diminution de pression artérielle (0.9% NaCl) ainsi que lorsque la pression s'élève (1.8% NaCl) en fin de gestation. Toutefois, cette tendance n'est pas maintenue lorsque les anneaux thoraciques sont préstimulés au KCl et à l'AVP.

L'activité des canaux calciques dépendant du voltage (CCDV) pendant la gestation et leur modification fonctionnelle par les suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl) fut également étudiée à l'aide d'une dihydropyridine activatrice de ces canaux, soit la nifédipine. Les résultats de Roy et al. [140] indiquent que les CCDVs sont sujets à des changements menant à un potentiel membranaire modifié durant la gestation. Ils ont démontré que les effets de deux dihydropyridines (la nifédipine et le BayK 8644), qui sont connues pour agir exclusivement sur les CCDVs, étaient significativement moins importants sur les tissus de rates gestantes que sur ceux de rates non gestantes. En effet, dans les anneaux aortiques de rates gestantes, les réponses maximales à la PhE et au KCl étaient beaucoup moins diminuées par la nifédipine que chez les rates non gestantes. De façon similaire, le BayK 8644, une dihydropyridine activatrice des CCDVs, induit une contraction dans les tissus de rates non gestantes mais non chez les anneaux aortiques de rates gestantes [140]. Durant notre étude, chez les rates sous diète normale, l'effet de la nifédipine était toujours plus important chez les tissus de rates non gestantes que gestantes. Ces résultats sont donc en accord avec ceux de Roy et al. [141] qui rapportent que les canaux CCDVs sont moins sensibles aux effets des dihydropyridines durant la gestation, ce qui pourrait être responsable de l'altération de réponses aux vasoconstricteurs rencontrée durant la gestation. Cette diminution de sensibilité serait due à une plus

grande proportion de CCDVs à l'état fermé durant la gestation [141]. Les canaux CCDVs peuvent adopter trois états différents; fermés, activés et inactivés. Le temps que passe le canal dans un état donné est contrôlé par le potentiel membranaire. Plus la cellule est dépolarisée, plus le canal demeure à l'état activé [164]. Il est connu que les dihydropyridines lient préférentiellement les canaux CCDVs lorsqu'ils se trouvent à l'état inactivé [73]. Durant la gestation, une hyperpolarisation des cellules de muscles lisses vasculaire est suggérée [18;109;140;141]. Cette hyperpolarisation pourrait expliquer la diminution d'efficacité de la nifédipine et du BayK 8644 à atténuer les réponses contractiles aux vasoconstricteurs. En effet, une faible hyperpolarisation de la membrane de l'ordre de 2 mV pourrait diminuer la probabilité d'ouverture du canal d'environ 30% [117]. Si la probabilité d'ouverture du canal diminue en raison d'une hyperpolarisation, la quantité des canaux CCDVs à l'état inactivé diminue aussi. Ceci pourrait être la raison de la baisse d'efficacité des bloqueurs des canaux calciques observée durant la gestation [141]. L'activation des canaux CCDVs serait également plus lente durant la gestation, ce qui résulterait en une altération de la mobilisation du calcium extracellulaire [141].

Les résultats de Roy et al. [141] sont en accord avec ceux de Crew et al. [25;92] qui rapportent que les mécanismes d'entrée du calcium dans les muscles lisses vasculaires sont inhibés durant la grossesse. Ils ont démontré que l'influx de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  dans des anneaux aortiques dépourvus d'endothélium était diminué chez les rates gestantes [25] et que ces anneaux aortiques répondaient également moins à la PhE et au KCl que les rates non gestantes [92]. De plus, ils ont démontré que lorsque les rates gestantes recevaient de l'eau additionnée de L-NAME (1mg/jour) comme breuvage, soit une façon d'obtenir un modèle proposé de prééclampsie

[128], l'influx de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  tout comme les réponses à la PhE et au KCl étaient augmentés [25; 92]. Une augmentation de l'influx calcique est également rapporté chez des modèles animaux d'hypertension [137]. Plusieurs études rapportent aussi que la concentration de calcium intracellulaire dans les muscles lisse vasculaires est augmentée durant la prééclampsie comparativement à la gestation normale, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de réactivité vasculaire rencontrée durant cette physiopathologie [116;125].

Durant notre étude, lorsque les animaux reçoivent les suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl), l'effet inhibiteur de la nifédipine est alors le même chez les rates non gestantes et gestantes lorsque les tissus sont stimulés à la PhE et à l'AVP. Toutefois, cette tendance n'est pas maintenue lorsque les tissus sont stimulés au KCl, situation durant laquelle l'effet inhibiteur de la nifédipine demeure plus important chez les tissus de rates non gestantes. De plus, durant la gestation, l'effet de la nifédipine sur la contraction à la PhE, au KCl et à l'AVP augmente lorsque les animaux reçoivent la saline comme breuvage. Ces résultats peuvent s'interpréter de deux façons. D'abord, ils suggèrent qu'une portion des canaux CCDVs présents à l'état fermés durant la gestation passe alors à la configuration inactive (état sensible aux dihydropyridines) lorsque les rates gestantes reçoivent les suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl). Comme le montrent les tableaux II et III du premier article, les rates gestantes hypertendues, celles recevant le suppléments 1.8% NaCl, sont plus sensibles aux effets de la nifédipine, possiblement parce que leur canaux CCDVs se retrouvent à l'état inactivé de façon plus importante que durant la gestation normale. Deuxièmement, si on se réfère à la logique employée pour interpréter les résultats relatifs aux canaux potassiques, ces résultats peuvent

suggérer que l'activité des canaux CCDVs est augmentée durant la grossesse suite à l'administration de suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl) aux rates gestantes. Cette dernière interprétation serait en accord avec les résultats observés durant l'hypertension et la prééclampsie.

En effet, l'activité des canaux CCDVs est altérée durant l'hypertension de même que durant la prééclampsie. Durant l'hypertension induite par une diète riche en sel (8% NaCl) administrée à des rates, des études de patch clamp effectuées sur des cellules isolées de petites artères mésentériques ont démontré que les canaux CCDVs de type L deviennent plus disponibles à l'ouverture à des valeurs de potentiel proches du potentiel basal [120]. Aussi, une diète riche en sel (1% NaCl + 0.2% KCl) administrée à des rats mâles les rend hypertendus et augmente la sensibilité de leurs artères mésentériques au BayK 8644 [169]. Cette augmentation de réponse au BayK 8644 est également observée dans les aortes thoraciques de rats hypertensifs, ce qui suggère une altération fonctionnelle des canaux CCDVs qui serait dépendante de l'augmentation de pression [157]. La même tendance est observée durant la prééclampsie. Ebeigbe et al. [33] ont démontré que le BayK 8644 induit une contraction plus importante sur les artères épigastriques inférieures de femmes prééclamptiques que normotensives. Ils suggèrent que l'augmentation de la sensibilité vasculaire périphérique rencontrée durant l'hypertension de grossesse pourrait être due, du moins en partie, à une augmentation de l'activité des canaux CCDVs.

Les canaux calciques dépendant du voltage et sensibles aux dihydropyridines peuvent être activés par l'endothéline-1 (Et-1). Les études de patch clamp de Goto et al. [56], effectuée sur des cellules d'artère coronarienne de porc, suggèrent en effet

que l'endothéline augmente l'influx de calcium via les CCDVs de type L. Ils rapportent également que l'effet prédominant de l'endothéline-1 serait d'augmenter le nombre ou la disponibilité des canaux calciques en question. Ces résultats sont en accord avec ceux de Scotland et al. [151] qui suggèrent que la contraction de la *vasa vasorum* induite par l'endothéline-1 via les récepteurs de l'endothéline-1 de type A et B (ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) impliquerait l'influx de calcium via des canaux calciques de types L et de types autres que L. Toutes ces données sont supportées par les résultats de Kasuya et al. [89] qui furent les premiers à démontrer un lien entre les récepteurs de l'endothéline-1 et les CCDVs de type L via une protéine G spécifique.

De plus, l'endothéline-1 possède une activité vasoconstrictrice très puissante et n'est pas régulée de la même façon durant la gestation normale et la prééclampsie, d'où notre intérêt marqué pour l'étude de ce peptide. En effet, les taux plasmatiques d'Et-1 sont inchangés durant l'hypertension et la grossesse normale alors qu'ils sont augmentés de deux à trois fois durant la prééclampsie [14]. Cette augmentation des niveaux plasmatiques d'Et-1 contribuerait à l'augmentation de vasoconstriction et aurait alors un rôle à jouer avec l'hypertension retrouvée durant la prééclampsie chez la femme [58] tout comme chez la rate à laquelle le L-NAME est administré [123], via l'activation récepteurs ET<sub>A</sub>. Étant donné l'augmentation possible d'activité des canaux calciques dépendant du voltage chez les gestantes recevant les suppléments sodiques démontrée précédemment et l'augmentation des niveaux plasmatiques d'Et-1 rapportée durant la prééclampsie, nous avons donc cherché à savoir si la réactivité des aortes thoraciques à l'Et-1 étaient modifiée durant la gestation suite à la prise de suppléments sodiques (0.9% et 1.8% NaCl).

Durant la prééclampsie chez la femme, la réponse contractile à l'Et-1 n'est pas modifiée comparativement à la gestation normale lorsque les artères omentales humaines [166] et les artères ombilicales [8;146] sont stimulées et ce, malgré une augmentation marquée des taux d'Et-1 plasmatiques. Ces résultats sont en opposition avec le rôle qu'aurait l'Et-1 à jouer durant la prééclampsie. La même tendance est aussi observée chez des modèles animaux d'hypertension. Barton et al. rapportent [3] que lors d'hypertension induite par une diète riche en sel (4 % NaCl) administrée à des rats mâles sensibles au sel, la réponse contractile de l'aorte thoracique à l'Et-1 est diminuée, le contenu des anneaux aortiques en Et-1 est augmenté de 4.2 fois et l'aorte est hypertrophiée. L'administration de LUI35252, soit un antagoniste des ET<sub>A</sub>, normalise la pression artérielle, le contenu en Et-1, la réponse contractile à l'Et-1 et inhibe l'hypertrophie. Les auteurs suggèrent que l'Et-1, via les ET<sub>A</sub>, agirait comme médiateur local des dysfonctions vasculaires durant l'hypertension. Ils suggèrent que la diminution de réponse à l'Et-1 serait due à une régulation à la baisse (downregulation) des récepteurs de l'Et-1 en réponse à une augmentation locale de la production d'Et-1. Chez les rats mâles spontanément hypertendus, une diminution de la contraction induite par l'Et-1 dans l'aorte thoracique est également rapportée [26;41].

Ces résultats sont cependant contradictoires avec ceux de la présente étude ainsi qu'avec ceux de Suzuki et al. [158]. Durant notre étude, chez les contrôles, la réponse maximale pour l'Et-1 est plus importante chez les tissus de rates non gestantes que gestantes. Cette réponse à l'Et-1 devient similaire entre les deux groupes lorsque les rates reçoivent le supplément 0.9% NaCl et devient plus importante chez les tissus de rates gestantes lorsque les animaux reçoivent le

supplément 1.8% NaCl. La même tendance est observée pour l'effet inhibiteur du BQ123, soit un antagoniste des  $ET_A$ . L'augmentation graduelle de réactivité à l'Et-1 durant la gestation suite à l'administration de suppléments sodiques 0.9% et 1.8% NaCl est peut être due à une augmentation du nombre de récepteurs  $ET_A$ . Cette supposition serait en accord avec les travaux de Montagnani et al. [114] qui suggèrent que l'augmentation de réactivité du lit vasculaire mésentérique à l'Et-1 est due à une augmentation du nombre de récepteurs  $ET_A$  chez les rates spontanément hypertendues. Toutefois, une diminution de la densité des récepteurs  $ET_A$  sur l'aorte de rates spontanément hypertendue [22] et de patients hypertendus [98] est également rapportée. Quant à Suzuki et al. [158], ils rapportent que durant l'hypertension induite par l'acétate de déoxycorticostérone et le sel (3mg/jour DOCA + 1% NaCl) chez des rats mâles, la réponse contractile de l'aorte thoracique à l'Et-1 est augmentée alors que le niveau d'Et-1 plasmatique ne diffère pas du niveau témoin. Ils observent également une augmentation de la réactivité des anneaux thoraciques à l'Et-1 chez les rats mâles spontanément hypertendus alors que leur niveau plasmatique d'Et-1 est diminué.

Durant notre étude, l'endothélium des aortes thoraciques était toujours enlevé alors que toutes les études rapportées précédemment furent effectuées en présence d'endothélium intact. Ceci pourrait expliquer pourquoi, en partie du moins, les réponses contractiles des aortes thoraciques à l'Et-1 ne diffèrent pas des réponses témoins durant la prééclampsie et l'hypertension. Durant la prééclampsie induite par l'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique chez la rate, l'effet vasodilateur de l'Et-1 est classiquement décrit dans la littérature comme passant par la stimulation des récepteurs  $ET_B$  présents sur les cellules endothéliales. Cet effet vasodilateur de l'Et-

1, via les ET<sub>B</sub>, est augmenté durant la prééclampsie et est suggéré comme étant un mécanisme visant à contrebalancer les augmentations de sensibilité aux vasoconstricteurs généralement rencontrées durant la physiopathologie en question [106]. Durant l'hypertension induite par le sel, un phénomène semblable est rapporté par Giardina et al [49]. En effet, un mécanisme impliquant les ET<sub>B</sub> et la relâche d'oxyde nitrique semble actif en condition basal et pourrait protéger l'organisme contre les vasoconstrictions excessives et l'augmentation de pression rencontrées durant l'hypertension. Ces mécanismes possibles de protection expliquent peut-être pourquoi la réactivité à l'endothéline-1 est similaire dans les aortes thoraciques de rates témoins, hypertendues et prééclamptiques malgré l'augmentation de réactivité vasculaire souvent rapportée dans les deux dernières conditions. Durant l'hypertension et la prééclampsie, l'augmentation de vasodilatation dépendante de l'endothélium ramène peut-être les valeurs de contractions tissulaires à l'Et-1 à des niveaux proches des valeurs témoins. Par conséquent, puisque l'endothélium fut enlevé durant notre étude, l'effet protecteur médié par les ET<sub>B</sub> de l'endothélium n'était pas présent et ceci pourrait expliquer l'augmentation de réactivité à l'Et-1 observée chez les tissus de rates gestantes recevant les suppléments sodiques.

L'endothéline-1 peut activer les canaux calciques dépendant du voltage de type L. Durant notre étude, nos résultats ont démontré que l'activité des canaux calciques dépendant du voltage pourrait être augmentée durant la gestation lorsque les rates reçoivent les suppléments sodiques. Peut-être que l'augmentation de réactivité à l'Et-1 suite à l'administration de suppléments sodiques 0.9% et 1.8% NaCl chez les rates gestantes pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité des CCDVs ou par une augmentation de l'influx calcique dépendant de la stimulation à l'Et-1.



Durant notre étude, aucune réponse contractile à la sarafotoxine 6c, un agoniste des ET<sub>B</sub>, ne fut observée. Ces résultats suggèrent que les ET<sub>B</sub> sont absents sur l'aorte de rate et sont en accord avec les travaux de Kuc et al. [98] qui ont démontré l'absence de détection des ET<sub>B</sub> chez l'aorte humaine de patients normaux et atteints de maladie cardiovasculaire.

## **5. CONCLUSIONS**

## 5. Conclusions

Cette étude fut entreprise dans le but d'évaluer si les suppléments sodiques 0.9% NaCl et 1.8% NaCl pouvaient, en plus de renverser la diminution de pression artérielle en fin de gestation, influencer les canaux potassiques et calciques, le potentiel membranaire ainsi que la réponse contractile à l'endothéline-1.

La première partie de nos travaux démontre que la différence de réactivité au TEA chez les aortes thoraciques de rates non gestantes n'est pas renversée par les suppléments sodiques. Ceci suggère une différence de polarisation toujours présente entre les cellules musculaires lisses de rates non gestantes et gestantes malgré la prise de suppléments sodiques. Aussi, l'utilisation des inhibiteurs de canaux  $K_{ATP}$  et  $K_{Ca}$  (soient la cromakalime et le NS-1619) et de l'activateur des canaux calciques dépendants du voltage (soit la nifédipine) a démontré que l'activité des canaux  $K_{ATP}$  est diminuée alors que celle des  $K_{Ca}$  et des canaux calciques dépendants du voltage sont augmentées lorsque des suppléments sodiques sont pris durant la gestation.

La deuxième partie de nos travaux a démontré que la réponse contractile des aortes thoraciques à l'endothéline-1, via les  $ET_A$ , diminue chez les non gestantes alors qu'elle augmente chez les gestantes lors de la prise des suppléments 0.9% et 1.8% NaCl. Les  $ET_A$  semblent modulés de façon différente par les suppléments sodiques durant la gestation.

Il est important de poursuivre les travaux afin de clarifier comment s'exerce l'influence des suppléments sodiques durant la gestation.

## **6. PERSPECTIVES**

## 6. Perspectives

Pour donner suite à ce projet, plusieurs expériences se révéleraient utiles. Suite aux résultats des courbes concentration-réponses au TEA en présence de 10 mmol/L KCl, il serait intéressant de déterminer exactement quel(s) type(s) de canal potassique est ou sont impliqué(s) dans la diminution de contraction lors de la gestation et comment les suppléments sodiques influencent les canaux en question. Ceci pourrait s'effectuer en répétant ces expériences en présence de différents inhibiteurs de ces canaux. En utilisant des inhibiteurs des différents types de canaux potassiques impliqués dans les effets du TEA ( $K_{Ca}$ ,  $K_V$  et  $K_{ATP}$ ), nous pourrions évaluer leur contribution relative en observant la modulation de la sensibilité des tissus aux effets du TEA. Nous pourrions ainsi déterminer si l'inhibition d'un ou de plusieurs canaux potassiques permettrait d'obtenir des niveaux de réactivité similaire chez les tissus de rates non gestantes et gestantes.

Nos résultats, en combinaison avec ceux obtenus dans nos laboratoires avec le BayK 8644 (Roy et al.) et le TEA (Cadorette et al.), semblent indiquer une hyperpolarisation des cellules de muscles lisses vasculaires lors de la gestation. Cette différence de polarité ne semble pas levée par la prise de suppléments sodiques durant la grossesse. Il serait donc intéressant d'effectuer des études électrophysiologiques et de déterminer le potentiel membranaire à l'aide de l'ion TPP<sup>+</sup> marqué qui entre dans la cellule en fonction de la polarité.

Finalement, des études de liaison de ligands marqués, d'immunobuvardages de type Western et d'immunobuvardage de type Northern seraient utiles afin de

déterminer les niveaux de transcription et d'expression des canaux potassiques et calciques ainsi que des récepteurs de l'endothéline. Ceci nous permettrait de déterminer à quel niveau une éventuelle différence de régulation pourrait survenir durant la gestation. Ceci nous permettrait également de déterminer comment cette régulation différentielle potentielle est influencée par les suppléments sodiques.

## **7. BIBLIOGRAPHIE**

## 7. Bibliographie

1. Aguilar-Bryan L. Nichols CG. Wechsler SW. Clement JP 4th. Boyd AE 3rd. Gonzalez G. Herrera-Sosa H. Nguy K. Bryan J. Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 268(5209):423-6, 1995.
2. Arai H. Hori S. Aramori I. Ohkubo H. Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 348(6303):730-2, 1990.
3. Barton M. d'Uscio LV. Shaw S. Meyer P. Moreau P. Luscher TF. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 31(1 Pt 2):499-504, 1998.
4. Beauséjour A. Auger K. St-Louis J. Brochu M. Sodium supplementation prevents the decrease of blood pressure observed during normal pregnancy in rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (in preparation)
5. Beech DJ. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *Pharmacology & Therapeutics*. 73(2):91-119, 1997.



6. Beech DJ. Zhang H. Nakao K. Bolton TB. Single channel and whole-cell K-currents evoked by levcromakalim in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *British Journal of Pharmacology*. 110(2):583-90, 1993.
7. Bertolino M. Llinas RR. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 32:399-421, 1992.
8. Bodelsson G. Marsal K. Stjernquist M. Reduced contractile effect of endothelin-1 and noradrenalin in human umbilical artery from pregnancies with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Early Human Development*. 42(1):15-28, 1995 May 12.
9. Bohlender J. Ganten D. Luft FC. Rats transgenic for human renin and human angiotensinogen as a model for gestational hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*. 11(11):2056-61, 2000.
10. Boles RG. Yamamura HI. Schoemaker H. Roeske WR. Temperature-dependent modulation of [3H]nitrendipine binding by the calcium channel antagonists verapamil and diltiazem in rat brain synaptosomes. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 229(2):333-9, 1984.
11. Bond M. Somlyo AV. Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle. *Journal of Cell Biology*. 95(2 Pt 1):403-13, 1982.

12. Bosse E. Regulla S. Biel M. Ruth P. Meyer HE. Flockerzi V. Hofmann F. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters*. 267(1):153-6, 1990.
13. Boyle MB. MacLusky NJ. Naftolin F. Kaczmarek LK. Hormonal regulation of K<sup>+</sup>-channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy. *Nature*. 330(6146):373-5, 1987.
14. Branch DW. Dudley DJ. Mitchell MD. Preliminary evidence for homeostatic mechanism regulating endothelin production in pre-eclampsia. *Lancet*. 337(8747):943-5, 1991.
15. Bray KM. Weston AH. Duty S. Newgreen DT. Longmore J. Edwards G. Brown TJ. Differences between the effects of cromakalim and nifedipine on agonist-induced responses in rabbit aorta. *British Journal of Pharmacology*. 102(2):337-44, 1991.
16. Brayden JE. Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*. 256(5056):532-5, 1992.
17. Brayden JE. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 23(12):1069-76, 1996.

18. Cadorette C. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 278(2):H567-76, 2000.
19. Capeless EL. Clapp JF. Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 161(6 Pt 1):1449-53, 1989.
20. Catterall WA. Seagar MJ. Takahashi M. Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 263(8):3535-8, 1988.
21. Cavanagh D. Rao P S. Tsai C C. O'Connor TC. Experimental toxemia in the pregnant primate. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 128(1):75-85, 1977.
22. Clozel M. Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 7(11):913-7, 1989.
23. Combs CA. Katz MA. Kitzmiller JL. Brescia RJ. Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 169(1):215-23, 1993.

24. Cook NS. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta. [Journal Article] *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 13(2):299-306, 1989.
25. Crews JK. Novak J. Granger JP. Khalil RA. Stimulated mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry into vascular smooth muscle during NO synthesis inhibition in pregnant rats. *American Journal of Physiology*. 276(2 Pt 2):R530-8, 1999.
26. Criscione L. Nellis P. Riniker B. Thomann H. Burdet R. Reactivity and sensitivity of mesenteric vascular beds and aortic rings of spontaneously hypertensive rats to endothelin: effects of calcium entry blockers. *British Journal of Pharmacology*. 100(1):31-6, 1990.
27. de Groot CJ. Taylor RN. New insights into the etiology of pre-eclampsia. *Annals of Medicine*. 25(3):243-9, 1993.
28. Dellsperger KC. Potassium channels and the coronary circulation. [Review] [42 refs] [Journal Article. Review. Review, Tutorial] *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 23(12):1096-101, 1996.
29. Dogterom J. De Jong W. Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology*. 25(2):267-9, 1974.

30. Doyle VM. Ruegg UT. Vasopressin induced production of inositol trisphosphate and calcium efflux in a smooth muscle cell line. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 131(1):469-76, 1985.
31. Dumont E. Lamontagne D. No role of ATP-sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin. *Journal of Vascular Research*. 32(2):138-42, 1995.
32. Ebeigbe AB. Cabanie M. In vitro vascular effects of cicletanine in pregnancy-induced hypertension. [Journal Article] *British Journal of Pharmacology*. 103(4):1992-6, 1999.
33. Ebeigbe AB. Ezimokhai M. Aloamaka CP. Responses of arterial smooth muscle from normotensive and pre-eclamptic subjects to the calcium channel agonist, Bay K 8644. *Research in Experimental Medicine*. 187(6):461-8, 1987.
34. Edwards DL. Arora CP. Bui DT. Castro LC. Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 175(2):484-8, 1996.
35. Edwards G. Ibbotson T. Weston AH. Levromakalim may induce a voltage-independent K-current in rat portal veins by modifying the gating properties of the delayed rectifier. *British Journal of Pharmacology*. 110(3):1037-48, 1993.

36. Edwards G. Niederste-Hollenberg A. Schneider J. Noack T. Weston AH. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 113(4):1538-47, 1994.
37. Edwards G. Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 33:597-637, 1993.
38. Everett RB. Worley RJ. MacDonald PC. Gant NF. Effect of prostaglandin synthetase inhibitors on pressor response to angiotensin II in human pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 46(6):1007-10, 1978.
39. Ezimokhai M. Osman N. Calcium supplementation is associated with endothelium dependent attenuation of vascular smooth muscle reactivity in normotensive pregnant and nonpregnant rats. *American Journal of Hypertension*. 11(1 Pt 1):88-96, 1998.
40. Faas MM. Schuiling GA. Baller JF. Visscher CA. Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 171(1):158-64, 1994.
41. Filippelli A. Palla A. Lampa E. Rossi F. Aging and in vitro vascular responses to endothelin-1 in several rat strains. *Pharmacological Research*. 28(3):193-202, 1993.

42. Flynn DA. Sargent CA. Brazdil R. Brown TJ. Roach AG. Sarafotoxin S6c elicits a non-ETA or non-ETB-mediated pressor response in the pithed rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 26 Suppl 3:S219-21, 1995.
43. Fox AP. Nowycky MC. Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *Journal of Physiology*. 394:149-72, 1987.
44. Fox AP. Nowycky MC. Tsien RW. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *Journal of Physiology*. 394:173-200, 1987.
45. Fujii K. Ohmori S. Onaka U. Abe I. Fujishima M. Effects of salt-loading on membrane potentials in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*. 22(3):181-6, 1999.
46. Furspan PB. Webb RC. Decreased ATP sensitivity of a K<sup>+</sup> channel and enhanced vascular smooth muscle relaxation in genetically hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 11(10):1067-72, 1993.
47. Galizzi JP. Fosset M. Lazdunski M. Properties of receptors for the Ca<sup>2+</sup>-channel blocker verapamil in transverse-tubule membranes of skeletal muscle. Stereospecificity, effect of Ca<sup>2+</sup> and other inorganic cations, evidence for two

- categories of sites and effect of nucleoside triphosphates. *European Journal of Biochemistry*. 144(2):211-5, 1984.
48. Garcia ML. Hanner M. Knaus HG. Koch R. Schmalhofer W. Slaughter RS. Kaczorowski GJ. Pharmacology of potassium channels. [Review] [225 refs] [Journal Article. *Advances in Pharmacology*. 39:425-71, 1997.
49. Giardina JB. Green GM. Rinewalt AN. Granger JP. Khalil RA. Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet. *Hypertension*. 37(2 Part 2):516-23, 2001.
50. Glossmann H. Ferry DR. Goll A. Striessnig J. Schober M. Calcium channels: basic properties as revealed by radioligand binding studies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 7 Suppl 6:S20-30, 1985.
51. Glossmann H. Linn T. Rombusch M. Ferry DR. Temperature-dependent regulation of d-cis-[3H]diltiazem binding to Ca<sup>2+</sup> channels by 1,4-dihydropyridine channel agonists and antagonists. *FEBS Letters*. 160(1-2):226-32, 1983 .
52. Glossmann H. Striessnig J. Calcium channels. *Vitamins & Hormones*. 44:155-328, 1988.



53. Godfraind T. Govoni S. Recent advances in the pharmacology of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels. *Trends in Pharmacological Sciences*. 16(1):1-4, 1995.
54. Godfraind T. Miller R. Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacological Reviews*. 38(4):321-416, 1986.
55. Golden JG. Hughes HC. Lang CM. Experimental toxemia in the pregnant guinea pig (*Cavia porcellus*). *Laboratory Animal Science*. 30(2 Pt 1):174-9, 1980.
56. Goto K. Kasuya Y. Matsuki N. Takawa Y. Kurihara H. Ishikawa T. Kimura S. Yanagisawa M. Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(10):3915-8, 1989.
57. Goto K. Warner TD. Molecular pharmacology. Endothelin versatility. *Nature*. 375(6532):539-40, 1995.
58. Granger J. Alexander B. Bennett W. Khali R. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *American Journal of Hypertension*. 14 (1) : 178S-85S, 2001.
59. Gray GA. Battistini B. Webb DJ. Endothelins are potent vasoconstrictors, and much more besides. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21(2):38-40, 2000.

60. Gris JC. Schved JF. Aguilar-Martinez P. Arnaud A. Sanchez N. [Endothelial mediators regulating vascular tonus. *Presse Medicale*. 20(7):303-8, 1991.
61. Grissmer S. Potassium channels still hot. *Trends in Pharmacological Sciences*. 18(10):347-50, 1997.
62. Guy HR. Conti F. Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends in Neurosciences*. 13(6):201-6, 1990.
63. Hai CM. Murphy RA. Regulation of shortening velocity by cross-bridge phosphorylation in smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 255(1 Pt 1):C86-94, 1988.
64. Haller H. Oeney T. Hauck U. Distler A. Philipp T. Increased intracellular free calcium and sensitivity to angiotensin II in platelets of preeclamptic women. *American Journal of Hypertension*. 2(4):238-43, 1989.
65. Hamilton TC. Norton J. Poyser RH. Thormahlen D. Comparison of some effects of paroxetine with amitriptyline on the cardiovascular system in animals. *Arzneimittel-Forschung*. 36(3):460-3, 1986.

66. Hathaway DR. March KL. Lash JA. Adam LP. Wilensky RL. Vascular smooth muscle. A review of the molecular basis of contractility. *Circulation*. 83(2):382-90, 1991.
67. Haynes WG. Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet*. 344(8926):852-4, 1994.
68. Hefler LA. Tempfer CB. Moreno RM. O'Brien WE. Gregg AR. Endothelial-derived nitric oxide and angiotensinogen: blood pressure and metabolism during mouse pregnancy. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*. 280(1):R174-82, 2001.
69. Heilmann L. von Tempelhoff GF. Ulrich S. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> co-transport system in erythrocytes from pregnant patients. *Archives of Gynecology & Obstetrics*. 253(4):167-74, 1993.
70. Heinemann SH. Terlau H. Stuhmer W. Imoto K. Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. [Journal Article] *Nature*. 356(6368):441-3, 1992.
71. Henry P. Escande D. Do potassium channel openers compete with ATP to activate ATP sensitive potassium channels? *Cardiovascular Research*. 28(6):754-9, 1994.

72. Highsmith RF. Blackburn K. Schmidt DJ. Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Annual Review of Physiology*. 54:257-77, 1992.
73. Hille B. Ionic Channels of Excitable membranes. 205-225 : -225, 1984
74. Hillman D. Chen S. Aung TT. Cherksey B. Sugimori M. Llinas RR. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(16):7076-80, 1991.
75. Hirning LD. Fox AP. McCleskey EW. Olivera BM. Thayer SA. Miller RJ. Tsien RW. Dominant role of N-type  $Ca^{2+}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*. 239(4835):57-61, 1988.
76. Hofmann F. Flockerzi V. Nastainczyk W. Ruth P. Schneider T. The molecular structure and regulation of muscular calcium channel. *Current Topics in Cellular Regulation*. 31:223-39, 1990.
77. Huang Y. Lau CW. Ho IH. NS 1619 activates  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  currents in rat vas deferens. *European Journal of Pharmacology*. 325(1):21-7, 1997.
78. Hurwitz L. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 26:225-58, 1986.

79. Huxley HE. Sliding filaments and molecular motile systems. *Journal of Biological Chemistry*. 265(15):8347-50, 1990.
80. Inagaki N. Tsuura Y. Namba N. Masuda K. Gono T. Horie M. Seino Y. Mizuta M. Seino S. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *Journal of Biological Chemistry*. 270(11):5691-4, 1995.
81. Inoue A. Yanagisawa M. Kimura S. Kasuya Y. Miyauchi T. Goto K. Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(8):2863-7, 1989.
82. Isomoto S. Kondo C. Yamada M. Matsumoto S. Higashiguchi O. Horio Y. Matsuzawa Y. Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry*. 271(40):24321-4, 1996.
83. Jain V. Vedernikov YP. Saade GR. Chwalisz K. Garfield RE. Effect of gestational age on in-vitro responses of pregnant rat aorta. *Human Reproduction*. 13(1):214-9, 1998.
84. Janis RA. Silver PJ. Triggle DJ. Drug action and cellular calcium regulation. *Advances in Drug Research*. 16 : 309-591, 1987.

85. Jay SD. Sharp AH. Kahl SD. Vedvick TS. Harpold MM. Campbell KP. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 266(5):3287-93, 1991.
86. Kanayama N. Tsujimura R. She L. Maehara K. Terao T. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *Journal of Hypertension*. 15(4):383-9, 1997.
87. Karne S. Jayawickreme CK. Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *Journal of Biological Chemistry*. 268(25):19126-33, 1993.
88. Kassab S. Miller MT. Hester R. Novak J. Granger JP. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension*. 31(1 Pt 2):315-20, 1998.
89. Kasuya Y. Takuwa Y. Yanagisawa M. Masaki T. Goto K. A pertussis toxin-sensitive mechanism of endothelin action in porcine coronary artery smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 107(2):456-62, 1992.
90. Kelly RA. Eid H. Kramer BK. O'Neill M. Liang BT. Reers M. Smith TW. Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular

- myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 86(4):1164-71, 1990.
91. Keyes L. Rodman DM. Curran-Everett D. Morris K. Moore LG. Effect of K<sup>+</sup>ATP channel inhibition on total and regional vascular resistance in guinea pig pregnancy. *American Journal of Physiology*. 275(2 Pt 2):H680-8, 1998.
92. Khalil RA. Crews JK. Novak J. Kassab S. Granger JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension*. 31(5):1065-9, 1998.
93. Kitazono T. Heistad DD. Faraci FM. ATP-sensitive potassium channels in the basilar artery during chronic hypertension. *Hypertension*. 22(5):677-81, 1993.
94. Kleppisch T. Nelson MT. ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation. *American Journal of Physiology*. 269(5 Pt 2):H1634-40, 1995.
95. Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *American Journal of Kidney Diseases*. 29(1):2-26, 1997.
96. Koliass TJ. Chai S. Webb RC. Potassium channel antagonists and vascular reactivity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. 6(6 Pt 1):528-33, 1993.

97. Kongsamut S. Lipscombe D. Tsien RW. The N-type Ca channel in frog sympathetic neurons and its role in alpha-adrenergic modulation of transmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 560:312-33, 1989.
98. Kuc RE. Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1?. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 36(5 Suppl 1):S377-9, 2000.
99. Kurihara Y. Kurihara H. Suzuki H. Kodama T. Maemura K. Nagai R. Oda H. Kuwaki T. Cao WH. Kamada N. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 368(6473):703-10, 1994.
100. Latorre R. Oberhauser A. Labarca P. Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annual Review of Physiology*. 51:385-99, 1989.
101. Lauger P. Voltage dependence of sodium-calcium exchange: predictions from kinetic models. *Journal of Membrane Biology*. 99(1):1-11, 1987.
102. Levin ER. Endothelins. *New England Journal of Medicine*. 333(6):356-63, 1995.



103. Lindheimer MD. Katz AI. Hypertension in pregnancy: advances and controversies. *Clinical Nephrology*. 36(4):166-73, 1991.
104. Liu Y. Knaus HG. Rush NJ Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension*. 30 :1403-09, 1997.
105. Lotersztajn S. Les endothélines. *Médecine/Sciences*. 9(1):1084-93, 1993.
106. Matz RL. Van Overloop B. Gairard A. Hypotensive effect of endothelin-1 in nitric oxide-deprived, hypertensive pregnant rats. *American Journal of Hypertension*. 14(6 Pt 1):585-91, 2001.
107. McPherson GA. Current trends in the study of potassium channel openers. *General Pharmacology*. 24(2):275-81, 1993.
108. Mershon JL. Mikala G. Schwartz A. Changes in the expression of the L-type voltage-dependent calcium channel during pregnancy and parturition in the rat. *Biology of Reproduction*. 51(5):993-9, 1994.
109. Meyer MC. Brayden JE. McLaughlin MK. Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 169(6):1510-6, 1993.

110. Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*. 235(4784):46-52, 1987.
111. Mintz IM. Adams ME. Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*. 9(1):85-95, 1992.
112. Mochizuki M. Morikawa H. Yamasaki M. Maruo T. Vascular reactivity in normal and abnormal gestation. *American Journal of Kidney Diseases*. 17(2):139-43, 1991.
113. Molnar M. Suto T. Toth T. Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 170(5 Pt 1):1458-66, 1994.
114. Montagnani M. Potenza MA. Rinaldi R. Mansi G. Nacci C. Serio M. Vulpis V. Pirrelli A. Mitolo-Chieppa D. Functional characterization of endothelin receptors in hypertensive resistance vessels. *Journal of Hypertension*. 17(1):45-52, 1999.
115. Mulvany MJ. Nilsson H. Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *Journal of Physiology*. 332:363-73, 1982.

116. Murphy JG. Fleming JB. Cockrell KL. Granger JP. Khalil RA.  $[Ca^{2+}]_i$  signaling in renal arterial smooth muscle cells of pregnant rat is enhanced during inhibition of NOS. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*. 280(1):R87-99, 2001.
117. Nelson MT. Patlak JB. Worley JF. Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology*. 259(1 Pt 1):C3-18, 1990.
118. Noma A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature*. 305(5930):147-8, 1983.
119. Obiefuna PC. Obiefuna IP. Salt-induced hypertension in rats alters the response of isolated aortic rings to cromakalim. *West Indian Medical Journal*. 50(1):17-21, 2001.
120. Ohya Y. Fujii K. Eto K. Abe I. Fujishima M. Voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in resistance arteries from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research*. 23(6):701-7, 2000.
121. Ohya Y. Setoguchi M. Fujii K. Nagao T. Abe I. Fujishima M. Impaired action of levocromakalim on ATP-sensitive  $K^+$  channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 27(6):1234-9, 1996.

122. Olesen SP. Munch E. Moldt P. Drejer J. Selective activation of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels by novel benzimidazolone. *European Journal of Pharmacology*. 251(1):53-9, 1994.
123. Olson GL. Saade GR. Buhimschi I. Chwalisz K. Garfield RE. The effect of an endothelin antagonist on blood pressure in a rat model of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 181(3):638-41, 1999.
124. Parent A. Schiffrin EL. St-Louis J. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 163(1 Pt 1):229-34, 1990.
125. Pereyra AC. Uribe S. Amato D. Baptista H. Karchmer S. Importance of free intracellular calcium in the physiopathology of pre-eclampsia *Ginecologia y Obstetricia de Mexico*. 59:141-5, 1991.
126. Philipson LH. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: paradigm lost, paradigm regained. *Science*. 270(5239):1159, 1995.
127. Pipkin FB. Hunter JC. Turner SR. O'Brien PM. Prostaglandin E<sub>2</sub> attenuates the pressor response to angiotensin II in pregnant subjects but not in nonpregnant subjects. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 142(2):168-76, 1982.

128. Podjarny E. Baylis C. Losonczy G. Animal models of preeclampsia. *Seminars in Perinatology*. 23(1):2-13, 1999.
129. Podjarny E. Ben-Chetrit S. Rathaus M. Korzets Z. Green J. Katz B. Bernheim J. Pregnancy-induced hypertension in rats with adriamycin nephropathy is associated with an inadequate production of nitric oxide. *Hypertension*. 29(4):986-91, 1997.
130. Podjarny E. Bernheim J. Rathaus M. Pomeranz A. Tovbin D. Shapira J. Bernheim J. Adriamycin nephropathy: a model to study effects of pregnancy on renal disease in rats. *American Journal of Physiology*. 263(4 Pt 2):F711-5, 1992.
131. Pollock DM. Keith TL. Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB Journal*. 9(12):1196-204, 1995
132. Pongs O. Structural basis of voltage-gated K<sup>+</sup> channel pharmacology. [Review] [37 refs] [Journal Article. Review. Review, Tutorial] *Trends in Pharmacological Sciences*. 13(9):359-65, 1992.
133. Quast U. Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 14(9):332-7, 1993.

134. Quast U. Guillon JM. Caverio I. Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research*. 28(6):805-10, 1994.
135. Quayle JM. Bonev AD. Brayden JE. Nelson MT. Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *American Journal of Physiology*. 269(5 Pt 1):C1112-8, 1995.
136. Quayle JM. Standen NB. KATP channels in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research*. 28(6):797-804, 1994.
137. Rapp JP. Nghiem CX. Onwochei MO. Aortic calcium uptake and efflux in spontaneously hypertensive and inbred Dahl rats. *Journal of Hypertension*. 4(4):493-9, 1986.
138. Rembold CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*. 20(2):129-37, 1992.
139. Rettig J. Heinemann SH. Wunder F. Lorra C. Parcej DN. Dolly JO. Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. [Journal Article] *Nature*. 369(6478):289-94, 1994.

140. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology*. 280(1):1-9, 1995.
141. Roy B. Sicotte B. Brochu M. St-Louis J. Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: Contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biology of Reproduction*. 60(4):979-88, 1999.
142. Roy-Clavel E. Picard S. St-Louis J. Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 180(3 Pt 1):608-13, 1999 Mar.
143. Rusch NJ. Liu Y. Pleyte KA. Mechanisms for regulation of arterial tone by Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in hypertension. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 23(12):1077-81, 1996.
144. Rusch NJ. Runnells AM. Remission of high blood pressure reverses arterial potassium channel alterations. *Hypertension*. 23(6 Pt 2):941-5, 1994.
145. Ruth P. Rohrkasten A. Biel M. Bosse E. Regulla S. Meyer HE. Flockerzi V. Hofmann F. Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. 245(4922):1115-8, 1989.

146. Saijo Y. Maeda K. Nakaya Y. Kamada M. Mitani R. Endo S. Irahara M. Yamano S. Aono T. Altered sensitivity to a novel vasoconstrictor endothelin-1 (1-31) in myometrium and umbilical artery of women with severe preeclampsia. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 286(5):964-7, 2001.
147. Sakawi Y. Tarpey M. Chen YF. Calhoun DA. Connor MG. Chestnut DH. Parks DA. Evaluation of low-dose endotoxin administration during pregnancy as a model of preeclampsia. *Anesthesiology*. 93(6):1446-55, 2000.
148. Sakurai T. Yanagisawa M. Takuwa Y. Miyazaki H. Kimura S. Goto K. Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 348(6303):732-5, 1990.
149. Sanguinetti MC. Kass RS. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circulation Research*. 55(3):336-48, 1984.
150. Schmid-Antomarchi H. Hugues M. Lazdunski M. Properties of the apamin-sensitive  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel in PC12 pheochromocytoma cells which hyper-produce the apamin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 261(19):8633-7, 1986.



151. Scotland R. Vallance P. Ahluwalia A. Endothelin alters the reactivity of vasa vasorum: mechanisms and implications for conduit vessel physiology and pathophysiology. *British Journal of Pharmacology*. 128(6):1229-34, 1999.
152. Sharp AH. Campbell KP. Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 264(5):2816-25, 1989.
153. Shraga-Levine Z. Galron R. Sokolovsky M. Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. *Biochemistry*. 33(49):14656-9, 1994.
154. Smiley RM. Finster M. Do receptors get pregnant too? Adrenergic receptor alterations in human pregnancy. *Journal of Maternal-Fetal Medicine*. 5(3):106-14, 1996.
155. Somlyo AV. Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 159(1):129-45, 1968.
156. St-Louis J. Massicotte G. Parent A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse : influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Sciences*. 6(1):358-65, 1988.

157. Storm DS. Webb RC. Contractile responses to Bay K 8644 in rats with coarctation-induced hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 203(1):92-9, 1993.
158. Suzuki N. Miyauchi T. Tomobe Y. Matsumoto H. Goto K. Masaki T. Fujino M. Plasma concentrations of endothelin-1 in spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt hypertensive rats. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 167(3):941-7, 1990.
159. Tanabe T. Adams BA. Numa S. Beam KG. Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature*. 352(6338):800-3, 1991.
160. Tanabe T. Beam KG. Adams BA. Niidome T. Numa S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*. 346(6284):567-9, 1990.
161. Terzic A. Tung RT. Kurachi Y. Nucleotide regulation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovascular Research*. 28(6):746-53, 1994.
162. Thatcher CD. Keith JC Jr. Pregnancy-induced hypertension: development of a model in the pregnant sheep. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 155(1):201-7, 1986.

163. Thuringer D. Cavero I. Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire : une aventure physiologique à suspense moléculaire. *Médecine/Sciences*. 13(1):1049-52, 1997.
164. Tsien RW. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annual Review of Physiology*. 45:341-58, 1983.
165. Vedernikov Y. Saade GR. Garfield RE. Vascular reactivity in preeclampsia. *Seminars in Perinatology*. 23(1):34-44, 1999.
166. Vedernikov YP. Belfort MA. Saade GR. Moise KJ Jr. Pre-eclampsia does not alter the response to endothelin-1 in human omental artery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 26 Suppl 3:S233-5, 1995.
167. Wakatsuki T. Nakaya Y. Inoue I. Vasopressin modulates K(+)-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. *American Journal of Physiology*. 263(2 Pt 2):H491-6, 1992.
168. Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 152(3):335-40, 1985.
169. Watts SW. Finta KM. Lloyd MC. Storm DS. Webb RC. Enhanced vascular responsiveness to Bay K 8644 in mineralocorticoid- and N-nitro arginine-induced hypertension. *Blood Pressure*. 3(5):340-8, 1994.

170. Webb DJ. Monge JC. Rabelink TJ. Yanagisawa M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends in Pharmacological Sciences*. 19(1):5-8, 1998.
171. Wesselman JP. Schubert R. VanBavel ED. Nilsson H. Mulvany MJ. KCa-channel blockade prevents sustained pressure-induced depolarization in rat mesenteric small arteries. *American Journal of Physiology*. 272(5 Pt 2):H2241-9, 1997.
172. White MM. Zamudio S. Stevens T. Tyler R. Lindenfeld J. Leslie K. Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocrine Reviews*. 16(6):739-51, 1995.
173. Yallampalli C. Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 169(5):1316-20, 1993.
174. Yanagisawa M. Kurihara H. Kimura S. Goto K. Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Hypertension - Supplement*. 6(4):S188-91, 1988.

175. Yokokawa K. Tahara H. Kohno M. Murakawa K. Yasunari K. Nakagawa K. Hamada T. Otani S. Yanagisawa M. Takeda T. Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Annals of Internal Medicine*. 114(3):213-5, 1991.
176. Zlatnik MG. Buhimschi I. Chwalisz K. Liao QP. Saade GR. Garfield RE. The effect of indomethacin and prostacyclin agonists on blood pressure in a rat model of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 180(5):1191-5, 1999.

24 janvier 2002



Sujet : Accord des coauteurs

À qui de droit,

Je, Karine Auger, étudiante à la maîtrise Msc. Pharmacologie, vous fais parvenir cette lettre dans le but d'obtenir votre accord pour inclure l'article suivant dans mon mémoire de maîtrise :

1. Karine Auger, Annie Beauséjour, Michèle Brochu et Jean St-Louis. St-Louis. *Sodium supplements during gestation : effects on vascular reactivity and  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels functions*. Cet article est normalement destiné à la revue American Journal of Physiology et est en phase finale de préparation.

**Déclaration de tous les coauteurs**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Karine Auger inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Effets de suppléments sodiques sur la réactivité vasculaire durant la gestation : influence des canaux potassiques et calciques

Annie Beauséjour  
Coauteur



Signature

24 janvier 2002  
Date

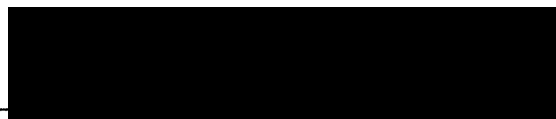
Michèle Brochu  
Coauteur



Signature

24 janvier 2002  
Date

Jean St-Louis  
Coauteur



Signature

24 janvier 2002  
Date

## **8. REMERCIEMENTS**

## 8. Remerciements

Les quelques milliers de premiers MERCI sont, du fond du cœur, pour mes parents... Merci à vous, pour m'avoir toujours laissée libre de mes choix, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir appuyée... Merci à toi maman, merci toi papa, d'être les personnes formidables que vous êtes.

Merci également à Jean St-Louis et à toute l'équipe du 1725-1726.