

Université de Montréal

Implication de l'aldostérone dans les changements hémodynamiques de la grossesse

par

Mylène Provencher

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctorae ès Sciences (Ph.D.)

en Pharmacologie

mars 2012

© Mylène Provencher, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Implication de l'aldostérone dans les changements
hémodynamiques de la grossesse**

Présentée par :
Mylène Provencher

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau
président-rapporteur

Dr Jean St-Louis
directeur de recherche

Dre Jolanta Gutkowska
membre du jury

Dr Richard Larivière
examineur externe

RÉSUMÉ

La grossesse s'accompagne d'importantes modifications hormonales et hémodynamiques. Parmi celles-ci, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est activé très tôt durant la grossesse. De plus, cette augmentation du SRAA est accompagnée d'élévations du débit cardiaque et du volume plasmatique ainsi que des baisses paradoxales de la pression artérielle et de la résistance vasculaire périphérique. Ceci suggère que la grossesse induit un remaniement des réponses physiologiques normales au SRAA. Une résistance vasculaire à l'action des vasopresseurs est également observée durant la gestation. Ce phénomène serait causé par la modification de la fonction des canaux calciques et potassiques. De plus, il serait possiblement dû à la participation de la Na^+/K^+ -ATPase, par son influence sur le potentiel membranaire des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC). La présence des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) dans les VSMC laisse croire que l'aldostérone peut influencer le tonus vasculaire par des effets génomiques et non-génomiques. Compte tenu des connaissances actuelles, nous avons émis l'hypothèse que *l'augmentation des taux sériques d'aldostérone durant la grossesse est responsable des changements hémodynamiques observés et que ces effets sont causés par l'activation des MR.*

Des rates gestantes ont été traitées avec du canrénoate de potassium (20 mg/kg·jr), un antagoniste des MR, durant la dernière semaine de gestation (sur 3). Sur des anneaux aortiques dénudés de leur endothélium, nous avons mesuré les réponses contractiles à la phényléphrine (PhE) et au KCl en présence d'un bloqueur des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), la nifédipine, et d'activateurs des canaux potassiques à large conductance (BK_{Ca}) et ceux dépendants de l'ATP (K_{ATP}), respectivement le NS-1619 et la cromakalim. Les réponses à la PhE et au KCl sont réduites à partir du 17^e jour de gestation et le traitement au canrénoate augmente ces réponses dans tous les groupes. Les modulateurs de canaux ioniques atténuent les réponses à la PhE et au KCl. Cependant, le canrénoate modifie aussi les effets des modulateurs sur les aortes. Aucun effet ou une baisse des réponses est observable chez les rates non gestantes, tandis qu'une hausse de leur effet inhibiteur est notée chez les rates gestantes. Ces effets du canrénoate font croire que l'aldostérone participe à l'adaptation de la réactivité vasculaire durant la grossesse.

Par ailleurs, le potentiel membranaire des VSMC pourrait être affecté dans la gestation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, impliquée dans le contrôle du potentiel membranaire. Nos résultats démontrent que l'activité de la pompe est inhibée à partir du 19^e jour de gestation. Cet effet est renversé par le canrénoate. Toutefois,

comme le renversement de l'inhibition de la pompe est également présent chez les rates gestantes traitées avec du PST 2238, un antagoniste de l'ouabaïne sur la Na^+/K^+ -ATPase, et que le canrénate agit également comme agoniste partiel de la pompe, nous croyons que la diminution d'activité associée à la gestation est liée à une inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase par des stéroïdes cardiotoniques plutôt qu'à un effet des minéralocorticoïdes. L'augmentation d'activité de la pompe liée au canrénate s'accompagne d'une diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$, suggérant que la sous-unité $\alpha 2$ est responsable des variations de contractilité de l'aorte, puisque son expression n'est pas modifiée par le canrénate. Les effets de la diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$, influencée par la signalisation du MR, restent à être déterminés. Néanmoins, nos résultats montrent que les modifications d'activité de la Na^+/K^+ -ATPase influencent l'activité des canaux potassiques et que la pompe pourraient être un des éléments primordiaux dans le contrôle de la réactivité vasculaire durant la grossesse.

Comme le canrénate modifie la réactivité vasculaire, nous voulions déterminer ses impacts sur la pression artérielle. Des rates gestantes ont été traitées avec du canrénate (20 ou 60 mg/kg·jr) et les paramètres hémodynamiques ont été évalués par radiotélémetrie. Aucune modification de la pression artérielle, du rythme cardiaque et de la pression pulsée ne sont mesurées chez les rates recevant le traitement. Toutefois, des augmentations de l'osmolalité, des taux sériques d'aldostérone et de corticostérone ainsi que de l'activité rénine plasmatique sont observées chez les animaux recevant 60 mg/kg·jr. Le canrénate bloque donc le rétrocontrôle du SRAA. Par contre, les MR ne sont pas les principaux responsables du contrôle de la pression artérielle durant la grossesse.

En conclusion, nous avons démontré que le traitement des rates au canrénate influence la réactivité vasculaire de l'aorte durant la gestation. Cet effet est causé par la modification de l'activité de certains canaux ioniques (VDCC, BK_{Ca} et K_{ATP}). De plus, le canrénate renverse l'inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase observée durant la gestation. Finalement, les actions locales de cet antagoniste des MR sur les vaisseaux sanguins ne se répercutent pas sur l'effet systémique global et aucune modification de la pression artérielle n'est observée. D'autres études seront toutefois nécessaires pour déterminer les voies de signalisation par lesquelles l'aldostérone module les réponses des canaux ioniques dans les VSMC.

Mots-clés : Grossesse, Système rénine-angiotensine-aldostérone, Récepteurs des minéralocorticoïdes, Réactivité vasculaire, Pression artérielle, Aorte, Canaux calciques, Canaux potassiques, Na^+/K^+ -ATPase

ABSTRACT

Pregnancy is accompanied by important hormonal and hemodynamic modifications. Among them, the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is activated early during pregnancy. Furthermore, this increase of RAAS is accompanied by raises of cardiac output and blood volume as well as paradoxical decreases in blood pressure and peripheral vascular resistance. These suggest that pregnancy induces reorganization of the normal physiological responses to RAAS. In addition, a decreased vascular reactivity to vasoconstrictive agents is observed during pregnancy. Modifications of calcium and potassium channels function would be implicated in this phenomenon. Furthermore, an implication of the Na^+/K^+ -ATPase is suspected, through its influence on the membrane potential of vascular smooth muscle cells (VSMC). Aldosterone, through the presence of mineralocorticoid receptors (MR) in VSMC, could control vascular tone by its genomic and non-genomic effects. With our knowledge at this time, we submit the hypothesis that *the increased serum aldosterone levels of pregnancy are responsible for the hemodynamic changes associated with pregnancy and that these effects are caused by the activation of MR.*

Pregnant rats were treated with potassium canrenoate (20 mg/kg-d), a MR antagonist, during the last week of pregnancy (out of 3 weeks). Vascular reactivity of endothelium-denuded aortic rings was measured. Contractile responses to phenylephrine (PhE) and KCl were studied in the presence of a voltage-dependent calcium channel (VDCC) blocker, nifedipine, as well as calcium-activated (BK_{Ca}) and ATP-dependent (K_{ATP}) potassium channels activators, NS-1619 and cromakalim respectively. Vascular responses to PhE and KCl were reduced as of the 17th day of gestation. Canrenoate increased the responses to both agonists in the aortas of all the groups. Ionic channel modulators reduced the contractile responses to PhE and KCl. However, canrenoate also modified the responses to the modulators. In the aortas of non pregnant rats, no effect or a decrease of their inhibitory effect were observed while with the pregnant rats we noticed an increased effect. These results suggest that aldosterone could be implicated in the adaptation of vascular responses to pregnancy.

On the other hand, VSMC membrane potential could be affected during pregnancy. To verify this hypothesis, Na^+/K^+ -ATPase activity was evaluated since it is implicated in its control. Our results demonstrated that the pump is inhibited as of the 19th day of pregnancy. This effect was reversed by canrenoate. However, since the reversal of the inhibition of the pump was also present in pregnant rats treated with PST 2238, an ouabain antagonist on the Na^+/K^+ -ATPase, and

because canrenoate can also act as a partial agonist of the pump, we believe that the decreased activity associated with pregnancy is linked to the inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase by cardiotoxic steroids rather than the effect of mineralocorticoids. The increased activity of the pump by canrenoate is linked with a decreased of the $\alpha 1$ subunit expression. This suggests that the $\alpha 2$ subunit of the pump would be responsible for the variations of aortic contractility since its expression is not modified by canrenoate. The effects of the diminished expression of the $\alpha 1$ subunit, influenced by the MR signalization, still need to be determined. Nevertheless, our results showed that modifications of Na^+/K^+ -ATPase activity had an impact on the activity of potassium channels and that the pump could be one of the principal elements implicated in the control of vascular reactivity during pregnancy.

Since canrenoate modified vascular reactivity, we wanted to determine its impact on blood pressure. Pregnant rats were treated with canrenoate (20 or 60 mg/kg·d) and hemodynamic functions were determined by radiotelemetry. No modification was observed in blood pressure, cardiac output and pulse pressure among the treated rats. However, increases in osmolality, aldosterone and corticosterone levels as well as plasma renin activity were observed in the animal receiving the 60 mg/kg·d canrenoate. Thus, canrenoate blocks the negative feedback of the RAAS. However, MR are not the principal element responsible for the control of blood pressure during pregnancy.

In conclusion, we have demonstrated that canrenoate affects aortic vascular reactivity during pregnancy. This effect is perpetuated by modifying the activity of certain ionic channels (VDCC, BK_{Ca} and K_{ATP}). Furthermore, canrenoate is able to reverse the inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase observed during pregnancy. Finally, the local actions of this MR antagonist on blood vessels are not reflected by the global systemic effect and no modification of the blood pressure was observed. Other studies will be necessary to determine the signaling pathways by which aldosterone modulate ionic channel responses in VSMC.

Key words: Pregnancy, Renin-angiotensin-aldosterone system, Mineralocorticoid receptors, Vascular reactivity, Blood pressure, Aorta, Calcium channels, Potassium channels, Na^+/K^+ -ATPase.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
REMERCIEMENTS.....	XIX
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	21
1. LA GROSSESSE	22
1.1 LES CHANGEMENTS HÉMODYNAMIQUES.....	22
1.2 LES CHANGEMENTS HÉMODYNAMIQUES CHEZ LE RAT	27
1.3 LES CHANGEMENTS HORMONAUX.....	28
1.3.1 Les Hormones Peptidiques.....	28
1.3.2 Les Hormones Stéroïdiennes.....	30
2. LE SYSTÈME RÉNINE ANGIOTENSINE ALDOSTÉRON.....	36
2.1.1. La Rénine	38
2.1.2. Les Enzymes de Conversion ACE/ACE2	41
2.1.3. L'Angiotensine II.....	42
2.1.4. L'Angiotensine 1-7.....	43
2.1.5. L'Angiotensine III et l'Angiotensine IV.....	43
2.1.6. L'Aldostérone	44
2.2. LE SRAA ET LA GROSSESSE	49
3. LES MUSCLES LISSES VASCULAIRES.....	51
3.1. LA STRUCTURE DES VAISSEAUX	51
3.2. LA STRUCTURE DES CELLULES DES MUSCLES LISSES VASCULAIRES	52
3.3. LA CONTRACTION	56
3.4. LA RELAXATION	57

4. LES CANAUX IONIQUES	58
4.1. LES CANAUX CALCIQUES	59
4.1.1. Les Canaux Calciques Dépendants du Voltage	59
4.1.1.1. <i>La Structure</i>	60
4.1.1.2. <i>La Régulation</i>	61
4.1.1.3. <i>Les Bloqueurs</i>	63
4.1.2. Les Canaux Calciques Indépendants du Voltage	65
4.2. LES CANAUX POTASSIQUES.....	66
4.2.1. Les Canaux Potassiques Activés par le Voltage (K_v)	66
4.2.2. Les Canaux à Rectification Rentrante (K_{IR}).....	68
4.2.3. Les Canaux Potassiques Activés par le Calcium (BK_{Ca})	68
4.2.3.1. <i>La Structure</i>	68
4.2.3.2. <i>La Régulation</i>	70
4.2.3.3. <i>Les Activateurs/Bloqueurs</i>	71
4.2.4. Les Canaux Sensibles à l'ATP (K_{ATP}).....	73
4.2.4.1. <i>La Structure</i>	73
4.2.4.2. <i>La Régulation</i>	74
4.2.4.3. <i>Les Activateurs/Bloqueurs</i>	75
4.3. LA POMPE À SODIUM (NA⁺/K⁺-ATPASE)	77
4.3.1.1. <i>La Structure</i>	77
4.3.1.2. <i>Le Mécanisme catalytique</i>	80
4.3.1.3. <i>La Régulation</i>	81
4.3.1.4. <i>Les Stéroïdes Cardiotoniques</i>	83
5. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	87
CHAPITRE II : Les Minéralocorticoïdes Participent À La Diminution De Réactivité Vasculaire Associée À La Gestation Chez La Rate	89

CHAPITRE III: Les Modifications De L'activité De La Na⁺/K⁺-Atpase Dans L'aorte Des Rates Gestantes Influencent La Fonction Des Canaux Potassiques	96
CHAPITRE IV : Le Canrénoate Active Le Système Rénine Angiotensine Aldostérone Mais Ne Modifie Pas La Pression Artérielle Des Rates Gestantes.....	127
CHAPITRE V : DISCUSSION	149
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	164
BIBLIOGRAPHIE.....	171

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

- Figure I-1.** Changements hémodynamiques systémiques durant la grossesse humaine.
- Figure I-2.** Schéma de la stéroïdogénèse chez l'humain.
- Figure I-3.** Synthèse des estrogènes dans le placenta humain.
- Figure I-4.** Représentation du Système Rénine Angiotensine et des actions engendrées par ses récepteurs.
- Figure I-5.** Signalisation de l'aldostérone par les MR dans les cellules des muscles lisses vasculaires.
- Figure I-6.** Structure des artères, des veines et des capillaires.
- Figure I-7.** Structure d'un myocyte vasculaire basée sur la micrographie électronique.
- Figure I-8.** Structure moléculaire d'un canal calcique dépendant du voltage (VDCC).
- Figure I-9.** Topologie transmembranaire proposée pour les sous-unités formant les pores des canaux potassiques dans les muscles lisses
- Figure I-10.** Structure des sous-unités α (a) et β (b) des canaux potassiques activés par le calcium (BK_{Ca}).
- Figure I-11.** Structures des sous-unités Kir6 (à gauche) et SUR (à droite) qui composent les Canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}).
- Figure I-12.** Structure des différentes sous-unités de la Na^+/K^+ -ATPase.
- Figure I-13.** Mécanisme catalytique de la Na^+/K^+ -ATPase.

CHAPITRE II

- Figure II-1.** Maximum responses (E_{max}) to phenylephrine (PhE) (A) and to KCl (B) in the absence of channel modulator (control) aortas of each group.

Figure II-2. Differences in Emax of PhE responses between aortas used as controls (first row of upper section of Table 1) and those incubated with NS-1619 (30 $\mu\text{mol/l}$) (A), cromakalim (1 $\mu\text{mol/l}$) (B), or nifedipine (0.1 $\mu\text{mol/l}$) (C).

Figure II-3. Differences in Emax of KCl responses between aortas used as controls (first row of lower section of Table 1) and those incubated with NS-1619 (30 $\mu\text{mol/l}$) (A), cromakalim (1 $\mu\text{mol/l}$) (B), or nifedipine (0.1 $\mu\text{mol/l}$) (C).

CHAPITRE III

Figure III-1. Potassium-induced relaxation of endothelium-denuded aortic rings following contraction by PhE in absence (circles) or presence of ouabain (0.03 mM; squares) from untreated (closed symbols) and canrenoate-treated (opened symbols) rats at day 14 (A), 17 (B), 19 (C) and 22(D) of gestation.

Figure III-2. Potassium-induced relaxation of endothelium-denuded aortic rings following contraction by PhE in absence (circles) or presence of ouabain (0.03 mM; squares) from untreated (closed symbols) and PST 2238-treated (opened symbols) rats at day 22 of gestation.

Figure III-3. Expression of the $\alpha 1$ (A) and $\alpha 2$ (B) subunits of the Na^+/K^+ -ATPase in the aortas of pregnant rats at different stages of pregnancy and treated or not with canrenoate.

Figure III-4. Expression of the $\alpha 1$ (A) and $\alpha 2$ (B) subunits of the Na^+/K^+ -ATPase in the aortas of untreated pregnant rats at day 22 and of PST 2238 pregnant rats at the same gestational age.

Figure III-5. Concentration-response curves to tetraethylammonium (TEA) of endothelium-denuded aortic rings of pregnant rats at day 14 (A), 17 (B), 19 (C) and 22(D) of gestation from untreated animals (closed symbols) and canrenoate-treated one (open symbols).

Figure III-6. Expression of the calcium-activated potassium channel (BK_{Ca}) α subunit in the aortas of pregnant rats at different stages of pregnancy and treated or not with canrenoate.

CHAPITRE IV

Figure IV-1. Concentration de canrénone mesurée par HPLC dans le sérum des rates traitées au canrénoate de potassium (20 mg/kg·jr (N= 10) et 60 mg/kg·jr (N=14)) au 22^e jour de gestation.

Figure IV-2. Effets du traitement au canrénoate de potassium (20 mg/kg·jr et 60 mg/kg·jr) sur la pression artérielle moyenne, systolique et diastolique obtenue par télémétrie chez des rates gestantes.

Figure IV-3. Effets du traitement au canrénoate de potassium (20 mg/kg·jr et 60 mg/kg·jr) sur le rythme cardiaque (A), la pression du pouls (B) et l'activité de l'animal (C).

CHAPITRE V

Figure V-1. Schématisation des effets de l'aldostérone sur les VSMC.

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II

Tableau 1. Maximum responses of aortic rings to PhE and KCl in absence (control) and presence of ion channels modulators (nifedipine, NS-1619, or cromakalim)

CHAPITRE III

Tableau 1. Estimated sensitivity* of aortic rings to the relaxing effect of KCl in absence (control) and presence of different concentrations of ouabain (0.01, 0.03 and 0.1 mM)

CHAPITRE IV

Tableau 1. Effets du traitement au canrénate de potassium sur le gain de poids et la consommation moyenne d'eau chez des rates gestantes des jours 15 à 22.

Tableau 2. Effets du traitement au canrénate de potassium sur les paramètres fœtaux chez des rates gestantes.

Tableau 3. Effets du traitement au canrénate de potassium sur le poids du cœur, des reins et de l'aorte chez des rates gestantes.

Tableau 4 Effets du traitement au canrénate de potassium sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

-A-

ABC	Cassette de liaison à l'ATP (<i>ATP binding cassette</i>)
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine (<i>angiotensin-converting enzyme</i>)
ACTH	Hormone adrénocorticotropique (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPA	Aminopectidase A
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMPM	Aminopectidase M
Ang 1-7	Angiotensine 1-7
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
Ang III (Ang 2-8)	Angiotensine III
Ang IV (Ang 3-8)	Angiotensine IV
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Aogen	Angiotensinogène
AR	Récepteurs des androgènes
ARA	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine
AT1R	Récepteurs de l'angiotensine type 1
AT2R	Récepteurs de l'angiotensine type 2
AT4R/IRAP	Récepteurs pour l'Ang IV (<i>insulin-regulated aminopeptidase receptor</i>)
ATP	Adénosine triphosphate

-B-

BK_{Ca}	Canaux potassiques activés par le calcium
BTZ	Benzothiazépines

-C-

CAGE	Enzyme de génération de l'Ang II sensible à la chymostatine (<i>chymostatin-sensitive Ang-II-generating enzyme</i>)
Cav	Cavéoline
CBG	Globulines de liaison des corticostéroïdes (<i>corticosteroid-binding globulin</i>)
CCC	Canaux cationiques constitutivement actifs (<i>constitutively active cation channels</i>)
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine (<i>calcitonin gene-related peptide</i>)
CPI-17	Protéine inhibitrice des phosphatases activées par PKC (<i>PKC-activated protein phosphatase inhibitor</i>)

CRH	Hormone de relâche de la corticotropine (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
CTS	Stéroïdes cardiotoniques (<i>cardiotonic steroids</i>)
CYP11B2	Aldostérone synthase
CYP17	17 α -hydroxylase/17,20-lyase
CYP21	21-hydroxylase

-D-

DAD	Détecteur UV à barrette de diodes (<i>diode array detector</i>)
DC	Débit cardiaque
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEA-S	Déhydroépiandrostérone sulfate
DHP	Dihydropyridines
DLF	Facteurs semblables à la digitale (<i>digitalis-like factors</i>)
DOC	11-déoxycorticostérone

-E-

EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermale (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ER	Récepteurs des œstrogènes
ERK1/2	Protéines kinases dépendantes d'un signal extracellulaire 1/2 (<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>)

-G-

GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPR30	Récepteur orphelin 30 (<i>G protein receptor 30</i>)
GPRC	Récepteurs couplés aux protéines G (<i>G-protein-coupled receptor</i>)
GR	Récepteurs des glucocorticoïdes

-H-

hCG	Hormone chorionique gonadotrophique
HHS	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
hPL	Hormone lactogène placentaire
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HVA	Canaux calciques activés par un fort voltage (<i>high-voltage-activated</i>)

-I-

IC₅₀	Concentration requise pour induire 50% de l'inhibition
INSL	Peptide semblable à l'insuline (<i>insulin-like peptide</i>)
IRCM	Institut de Recherches Cliniques de Montréal

-K-

K_{ATP}	Canaux potassiques sensibles à l'ATP
K_{IR}	Canaux à rectification rentrante
K_v	Canaux potassiques activés par le voltage

-L-

LDL	Lipoprotéines de faible densité (<i>low-density lipoprotein</i>)
LH	Hormone lutéinisante
LVA	Canaux calciques activés par un faible voltage (<i>low-voltage-activated</i>)

-M-

M6P	Mannose-6-phosphate
MAPK	Protéine kinase activée par un mitogène (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Mas	Récepteurs de l'Angiotensine 1-7
MBG	Marinobufagénine
MLCK	Kinase des chaînes légères de myosine (<i>myosin light chain kinase</i>)
MLCP	Phosphatase des chaînes légères de myosine (<i>myosin light chain phosphatase</i>)
MR	Récepteurs des minéralocorticoïdes

-N-

NADH	Nicotinamide adénide dinucléotide phosphate
NBF	Repli pour la liaison des nucléotides (<i>nucleotide binding fold</i>)
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Synthase de monoxyde d'azote

-P-

P450_{scc}	Chaîne latérale du cytochrome P450 (<i>side chain cleavage</i>)
PAA	Phénylalkylamines
Pa_{CO2}	Dioxyde de carbone artériel
PA_{O2}	Oxygène alvéolaire
PAM	Pression artérielle moyenne
PhE	Phényléphrine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C

PMCA	Ca ⁺² -ATPase de la membrane plasmique (<i>plasma membrane Ca⁺²-ATPase</i>)
PR	Récepteurs de la progestérone
PRA	Activité rénine plasmatique
PST 2238	17β-[3β-furyl]-5β-androstan-3β, 14β, 17α-triol-hydrate; rostafuroxin
PWV	Vélocité des ondes de pouls (<i>pulse wave velocity</i>)

-R-

RCK	Domaine contrôlant la conductance au K ⁺ (<i>regulator of conductance for K⁺</i>)
ROC	Canaux calciques dépendants d'un ligand (<i>receptor-operated channels</i>)
ROK	Protéine kinase associée à la protéine RhoA (<i>RhoA associated kinase</i>)
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RPR	Récepteurs de la rénine/prorénine (<i>renin/prorenin receptor</i>)
RS	Réticulum sarcoplasmique
RVS	Résistance vasculaire systémique
RXFP	Récepteurs de la famille peptidique relaxine (<i>relaxin family peptide</i>)
RYR	Récepteurs de ryanodine (<i>ryanodine receptors</i>)

-S-

SAC	Canaux activés par l'étirement (<i>stretch-activated channels</i>)
SERCA	Pompe Ca ⁺² -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique
SHR	Rat spontanément hypertendu
SNS	Système nerveux sympathique
SOC	Canaux opérés par les réserves de calcium (<i>store-operated channels</i>)
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
sRPR	Récepteurs de la rénine/prorénine solubles
StAR	Protéine de régulation aiguë de la stéroïdogénèse (<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>)
STOC	Courants transitoires sortants spontanés (<i>spontaneous transient outward currents</i>)
STREX	Variant alternatif de BK _{Ca} (<i>stress axis-regulated exon</i>)
STS	Sulfatases de stéroïdes (<i>steroid sulfatase</i>)
SUR	Protéine régulatrice de type récepteur sulphonyluré

-T-

TEA	Tétraéthylammonium
TMD	Domaine transmembranaire
TRPC	<i>Transient receptor potential-canonical</i>
trRPR	Récepteurs de la rénine/prorénine tronqués

-V-

V-ATPase	Pompe à protons dépendante de l'ATP
VDCC	Canaux calciques dépendants du voltage (<i>voltage-dependant calcium channels</i>)
VIP	Polypeptide intestinal vasoactif (<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>)
VSMC	Cellule des muscles lisses vasculaires (<i>vascular smooth muscle cell</i>)

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Jean St-Louis qui a cru en ma capacité de réaliser des études supérieures et qui m'a donné une place au sein de son laboratoire. Il a été un bon mentor et m'a épaulé durant ma formation. Il m'a aidé à cheminer à travers ce projet parfois parsemé d'embûches et m'a fait bénéficier de ses connaissances et de ses conseils.

Je désire également remercier la Dre Michèle Brochu pour les nombreuses discussions tant au sujet de la science que de la vie en générale. En plus, de me faire bénéficier de ses conseils scientifiques, elle m'a transmis sa passion pour les jeunes en me faisant participer au projet SEUR.

Je suis également reconnaissante aux membres du jury, les Drs Guy Rousseau, Jolanta Gutkowska et Richard Larivière, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Je veux souligner la participation des Drs Yves Théoret et Gaétan Thibault ainsi que leur équipe pour le soutien technique et les connaissances qu'ils m'ont transmises. Grâce à leur collaboration, j'ai pu compléter et enrichir mes travaux de doctorat.

Je tiens à émettre un remerciement spécial à ma collègue Véronique avec qui j'ai collaboré sur ce projet. Sans son soutien et sa collaboration, je n'aurais pas pu effectuer tout ce travail. Les nombreuses heures passées en sa compagnie, les longues discussions, les échanges d'idées ainsi que les hauts et les bas traversés ensemble m'ont permis de passer à travers mon doctorat avec plus d'aisance.

Je ne saurais oublier tous mes autres collègues de laboratoire : Benoit, Pierre-André, Pascale, Leslie, Rébecca, Karine, Marie-Eve, Mathieu, Sarah et Cindy. Merci d'avoir agrémenté mes journées, d'avoir partagé des fous rires et des moments de complicité, de m'avoir remonté le moral et de m'avoir encouragé les jours où ça allait moins bien. Je n'oublierai pas nos nombreuses conversations autour de la machine à café et je suis contente de retirer de nombreuses amitiés de mon passage au doctorat.

Je tiens également à remercier tous les membres de ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études.

Finalement, je tiens à faire une mention spéciale à ma mère, Patricia, et à ma tante Linda, deux femmes exceptionnelles qui m'inspirent au quotidien. Elles m'ont apporté un soutien

inconditionnel et m'ont fourni les encouragements nécessaires pour que je m'épanouisse et que je complète mon parcours universitaire. Grâce à elles, je suis devenue une personne accomplie et je les en remercie grandement.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. LA GROSSESSE

Depuis toujours, la capacité d'enfanter des femmes est responsable de la perpétuation de l'espèce. Cette période de quelques 280 jours, de la fécondation à l'accouchement, est une condition physiologique qui permet le développement et la maturation du fœtus. Pour y arriver, le corps de la femme subit de nombreux changements anatomiques, physiologiques, métaboliques et biochimiques. Ces derniers débutent dès la fécondation et se poursuivent tout au long de la grossesse en réponse à des stimuli hormonaux ou à des signaux provenant de l'unité fœto-placentaire. Afin d'assurer le bon déroulement de la grossesse, plusieurs systèmes et organes maternels doivent synchroniser leur adaptation. Toutefois, les mécanismes permettant la mise en place et le retrait, en *post-partum*, de ces phénomènes sont mal connus. Malheureusement, c'est lorsqu'on fait face à des pathologies liées à la grossesse qu'on prend conscience que plusieurs mécanismes concernant la physiologie normale sont méconnus.

1.1 LES CHANGEMENTS HÉMODYNAMIQUES

Le système cardiovasculaire de la femme enceinte doit répondre aux demandes de la mère et du fœtus et pour ce faire, il subit d'importants changements. Une des adaptations les plus citées est sûrement l'importante augmentation de volume sanguin (Fig. I-1). Celui-ci commence à augmenter à la 6^e semaine pour atteindre un plateau vers la 32^e semaine avec une augmentation totale de 40 à 50% (33; 47; 74; 110; 155; 179; 306; 313). L'accroissement de volémie est provoqué en partie par une stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et, également, par une diminution de la résistance périphérique précoce durant la grossesse (47; 74). Les connaissances actuelles ne nous permettent pas d'affirmer lequel de ces deux phénomènes est à l'origine de l'autre, mais montrent que la grossesse est une condition de rétention d'eau et d'électrolytes, particulièrement de NaCl (33; 74; 177).

Il existe, en plus de l'augmentation plasmatique, une élévation de la masse érythrocytaire (Fig. I-1) de 20 à 30% durant la deuxième moitié de la grossesse (74; 155; 306; 313). Cette dernière résulte de l'action de l'hormone chorionique somato-mammotrophique, de la prolactine et de la progestérone qui stimulent la synthèse d'érythropoïétine (177). L'augmentation du volume

érythrocytaire étant plus lente et plus tardive que celle du plasma, il en résulte un état d'anémie physiologique de la grossesse (74; 110; 180; 306; 313). Cette anémie par dilution est caractérisée par une diminution de l'hématocrite (47; 306; 313) et elle s'accompagne de modifications du système respiratoire pour assurer les besoins en oxygène de la mère et du fœtus. On observe donc des modifications anatomiques pulmonaires qui entraînent une augmentation du volume courant et de la ventilation minute sans que le rythme respiratoire ne soit modifié. Ces changements, entraînant une hyperventilation maternelle, donnent lieu à une augmentation de l'oxygène alvéolaire (PA_{O_2}) et une diminution du dioxyde de carbone artériel (Pa_{CO_2}). Cette chute de Pa_{CO_2} est essentielle puisqu'elle facilite le transfert du dioxyde de carbone du sang fœtal vers le sang maternel et donc de l'oxygène vers le fœtus. Toutefois, la faible Pa_{CO_2} maternelle induit une alcalose respiratoire qui sera en partie compensée par une plus grande excrétion rénale de bicarbonate pour maintenir le pH entre 7.4 et 7.45. Le synchronisme entre ces systèmes est donc essentiel pour subvenir aux besoins en oxygène du fœtus, du placenta et des organes maternels (49; 110; 313).

L'augmentation de volémie induit aussi des modifications anatomiques cardiovasculaires. La majorité du volume sanguin augmenté se répartit dans le système veineux ou capacitif. Il est suggéré que les changements des niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes (sexuelles et surrénaliennes) en combinaison avec les modifications de productions de prostaglandines vasodilatatrices, du peptide natriurétique auriculaire (ANP), de monoxyde d'azote (NO) et d'aldostérone affectent l'extensibilité veineuse et le tonus artériel (155). L'augmentation de la capacité veineuse se manifeste par la création de plexus veineux, par la dilatation des gros troncs veineux et par l'accroissement des cavités cardiaques (74; 120). L'élargissement du ventricule gauche est observé à partir du premier trimestre et s'accroît jusqu'au terme. Il est accompagné d'un épaississement de la paroi du ventricule, qui se définit comme une hypertrophie modérée du myocarde, semblable à celle retrouvée lors de l'entraînement physique. Cette hypertrophie est réversible après la grossesse (110). De plus, il s'installe une dilatation des oreillettes droite et gauche (74; 110) qui s'accompagnerait d'une augmentation de la surface des valves aortique, pulmonaire et mitrale (130; 253). Ces changements sont réversibles après la grossesse. Le but de ces modifications est de favoriser le remplissage cardiaque sans entraîner d'augmentation de la sécrétion des facteurs natriurétiques auriculaires, de permettre le maintien de la fonction ventriculaire gauche tout en augmentant le volume d'éjection et de minimiser les variations du retour veineux afin d'assurer un débit utéroplacentaire suffisant à la croissance de l'unité fœto-placentaire dès le début de la grossesse (74; 110; 120; 123).

On observe aussi durant la gestation une augmentation de débit cardiaque (Fig. I-1), qui s'élève d'environ 50%. Cette hausse est détectable à partir de la 5^e semaine de gestation jusqu'à la 24^e semaine pour se maintenir en plateau jusqu'au terme où le débit moyen est de plus de 6 L/min (74; 110; 123; 130; 313). Le débit cardiaque dépend de la fréquence cardiaque (nombre de battements par minute) et du volume d'éjection systolique (le volume de sang éjecté dans la circulation systémique par battement). L'augmentation de fréquence cardiaque débute vers la 5^e semaine de grossesse et se poursuit jusqu'au 3^e trimestre. Elle est toutefois modérée, soit de 15 à 20 battements par minute au repos, et ne permet pas de justifier à elle seule l'augmentation de débit cardiaque. La majeure partie de l'accroissement du débit cardiaque maternel revient donc à la variation du volume d'éjection systolique du ventricule gauche qui augmente, à partir de la 8^e semaine de grossesse, d'environ 30 %. Cette augmentation est en partie due à l'accroissement de volémie et aux modifications anatomiques mentionnées précédemment ainsi qu'au maintien du retour veineux et à la baisse de résistance vasculaire en début de grossesse (Fig. I-1) (74; 110; 130).

L'augmentation de débit sanguin, qui croît avec l'âge gestationnel, est majoritairement dirigée vers l'utérus et le placenta, la poitrine, les reins et la peau. Pour ces derniers, l'augmentation du flot favorise surtout l'élimination : de chaleur pour la peau et de déchets métaboliques par les reins (155). L'augmentation de flot plasmatique rénal (~70%) est accompagnée d'un accroissement de la filtration glomérulaire (~50%) associée à une diminution de la résistance vasculaire rénale en début de grossesse (273; 306). L'afflux à la poitrine, quant à lui, s'amorce au début de la grossesse pour atteindre deux à trois fois les niveaux de flot sanguin d'avant la gestation près du terme. Finalement, chez la femme non gravide, le flot sanguin utérin est d'environ 100 mL/min, soit environ 2 % du débit cardiaque, et va s'intensifier jusqu'à atteindre 17% du débit cardiaque en fin de grossesse (110; 155). Le flot sanguin utérin est primordial pour les échanges nutritifs et gazeux avec le fœtus. C'est pourquoi, près du terme, la majorité de la circulation utérine est dédiée au placenta.

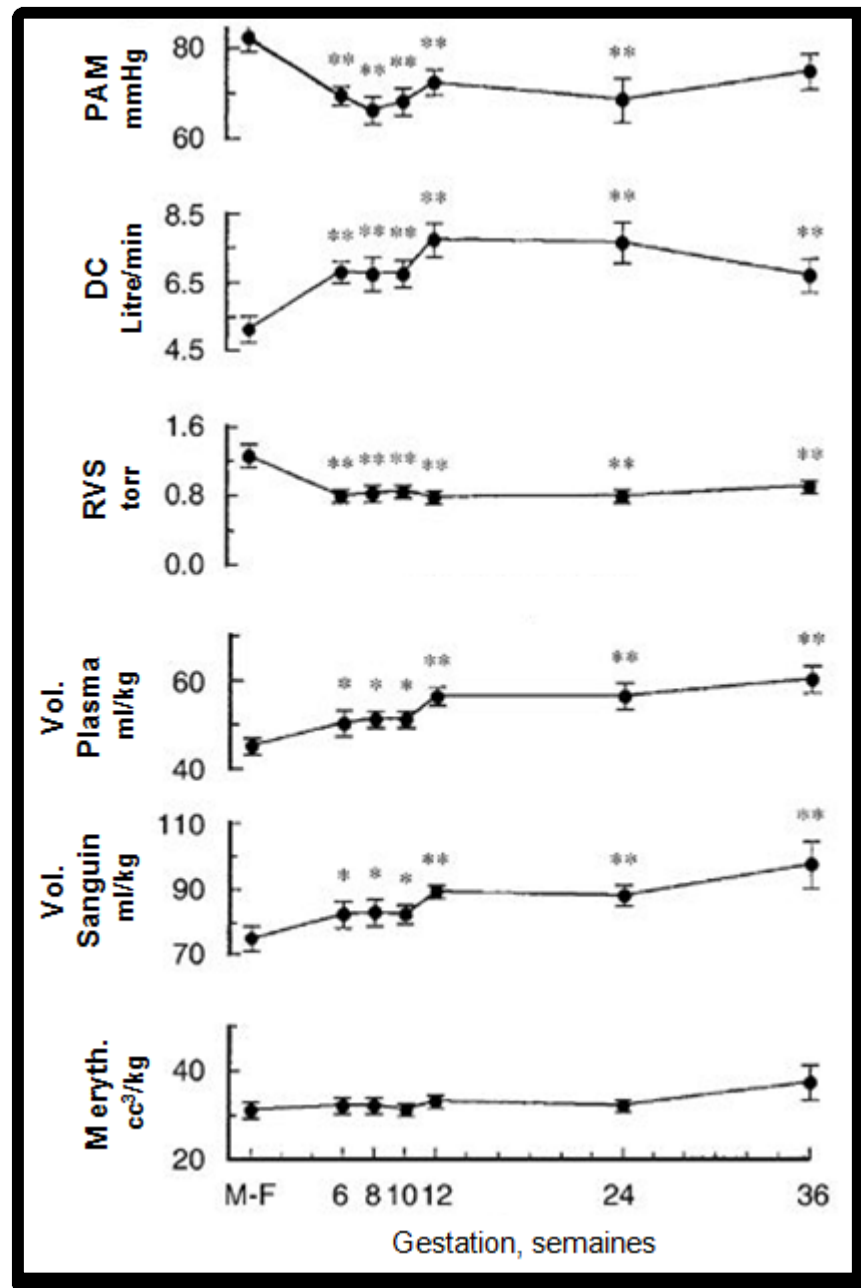


Figure I-1 : Changements hémodynamiques systémiques durant la grossesse humaine. Dix femmes ont été étudiées à la phase mi-folliculaire (M-F) du cycle menstruelle et à la 6^e, 8^e, 10^e, 12^e, 24^e et 36^e semaine de grossesse. La pression artérielle moyenne (PAM) et la résistance vasculaire systémique (RVS) diminue tandis que le débit cardiaque (DC) augmente ainsi que le volume plasmatique et le volume sanguin. Ces modifications sont significatives à partir de la 6^e semaine de grossesse. La masse érythrocytaire n'est pas modifiée significativement malgré une légère augmentation en fin de grossesse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. (Modifiée et traduite de Chapman et al. (47))

Malgré cette augmentation du débit cardiaque et du volume circulant, on observe une diminution de la pression artérielle (Fig. I-1). Cette chute de pression, plus importante pour la diastolique que de la systolique, débute entre la 8^e et 12^e semaine et atteint son point le plus bas au 2^e trimestre. Elle remonte ensuite vers la 32-34^e semaine et jusqu'à la parturition. Après la grossesse, la pression revient graduellement aux valeurs qu'elle avait avant celle-ci. La pression artérielle étant la résultante du débit cardiaque (qui est augmenté durant la grossesse) et de la résistance vasculaire périphérique, sa diminution résulte donc de la baisse de résistance (47; 74; 110; 123; 181; 208; 264).

La résistance vasculaire systémique (RVS) peut se qualifier, de façon simple, comme la résistance que le sang rencontre lorsqu'il quitte le cœur et qui est dépendante de l'état de vasoconstriction ou vasodilatation des vaisseaux (le tonus vasculaire) (313). Durant la grossesse, on note une diminution de la RVS dès la 6^e semaine (Fig. I-1) (273) et elle s'accompagne d'une résistance à l'effet presseur de plusieurs agents vasoconstricteurs (235-237; 292). Ce sont Dieckman et Michel qui furent les premiers à observer ce phénomène en injectant à des femmes enceintes des extraits post-hypophysaires contenant de la vasopressine (293). Comme les expérimentations sur les femmes enceintes sont limitées, plusieurs modèles animaux servent à étudier les mécanismes impliqués dans cette diminution de réactivité vasculaire. Celle-ci est entre autre présente chez le rat (226; 292), le babouin (233), le lapin (145) et la brebis (318). La réduction de réactivité vasculaire *in vivo* et *in vitro* aux agents presseurs, tel que l'angiotensine II (Ang II), la vasopressine et la phényléphrine (PhE), est rapportée depuis longtemps dans la littérature (237; 255; 292; 294). Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette baisse de réactivité vasculaire restent encore peu connus. Plusieurs hypothèses sont cependant mentionnées : une implication des hormones d'origine ovarienne et placentaire ainsi que du SRAA (14; 47; 255; 292), une augmentation de la libération des prostaglandines et du NO (237; 255; 292) et une hyperpolarisation des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) (37; 200; 258).

Plusieurs études, tant chez l'humain que chez l'animal, ont démontré que cette atténuation de RVS se localisait dans les artères de résistance (mésentériques, carotides, et rénales) et qu'elle est attribuée à une diminution de tonus vasomoteur et au remodelage des vaisseaux (52; 66; 191; 196; 237). Toutefois, l'augmentation de la compliance (capacité du vaisseau à augmenter son volume lorsque la pression sanguine augmente) et du diamètre de l'aorte indique que la structure et la fonction des artères de conductance sont également modifiées (78; 119; 123; 146; 235; 287; 290). Des études histologiques sur l'aorte maternelle du

lapin (67) et de l'humain (183) durant la gestation ont clairement démontré des changements structuraux importants tels qu'une rupture des lamelles élastiques, une diminution des protéoglycans ainsi qu'une hypertrophie et une hyperplasie des muscles lisses vasculaires. Cette réorganisation de la structure vasculaire peut influencer les mécanismes de vasoconstriction et vasorelaxation qui contrôlent la compliance et le diamètre de l'aorte (146). Une diminution de la RVS et une vasodilatation généralisée vont donc affecter la rigidité artérielle (moins de compliance). La grossesse normale est accompagnée d'une diminution de la rigidité artérielle au premier trimestre, qui peut se mesurer par la vélocité des ondes de pouls (PWV; *pulse wave velocity*), et elle restera basse jusqu'au terme (78; 146; 235). Il a également été démontré que la prééclampsie était associée avec une plus grande rigidité artérielle (252; 310). De plus, Elvan-Taspinar et al. (80) ont démontré que la PWV était associée plus étroitement avec le poids à la naissance que la pression artérielle et ils suggèrent que la rigidité artérielle reflèterait mieux l'adaptation vasculaire de la mère que la pression artérielle.

1.2 LES CHANGEMENTS HÉMODYNAMIQUES CHEZ LE RAT

Tel que mentionné précédemment, les études chez les femmes enceintes ne sont pas toujours réalisables compte tenu de la fragilité du fœtus en développement. L'utilisation de modèles animaux permet donc d'approfondir nos connaissances. Plusieurs caractéristiques techniques nous incitent à choisir le rat pour nos études, notamment sa petite taille et sa reproductibilité, la facilité à se procurer des spécimens ainsi que la courte durée de gestation (23 jours). Pour étudier les changements hémodynamiques de la grossesse, la rate est un très bon modèle puisqu'on y observe les mêmes changements que chez la femme, mais à des périodes différentes.

En effet, chez la rate, on note une augmentation de la volémie dès le 6^e jour de gestation, qui atteindra 40% avant la mise à bas (12; 259). On note également une diminution de la masse érythrocytaire et de l'hématocrite dès le 7^e jour et elle s'accroîtra jusqu'à la fin de la gestation (127). De plus, le débit cardiaque et le volume d'éjection augmentent à partir du 8^e jour de grossesse et ils sont accompagnés d'une augmentation de la fréquence cardiaque (285; 286). Comme chez l'humain, ces augmentations sont paradoxalement associées à une diminution de la pression artérielle. Celle-ci ne change pas jusqu'aux environs du 18^e jour de gestation puis elle

descend jusqu'au terme et remonte en *post-partum* (20; 293). Finalement, tel que mentionné précédemment, on observe chez la rate gravide une diminution de la résistance vasculaire périphérique, ainsi qu'une diminution de la réactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs (52; 66; 190; 196; 293). Cependant, nous observons un effet inverse pour ce qui est de la réactivité vasculaire des artères utérines (66; 295). De plus, tout comme chez la femme enceinte, on observe chez la rate gestante des modifications dans les artères de conductance. Des changements de la compliance et de la réactivité vasculaire ainsi que la présence de remodelage vasculaire sont notés dans l'aorte de la rate dès le début de la grossesse (37; 84; 146; 235; 258; 287).

1.3 LES CHANGEMENTS HORMONAUX

1.3.1 *Les Hormones Peptidiques*

La femme subit plusieurs changements hormonaux et métaboliques durant la grossesse qui permettent l'établissement, le maintien et la conclusion de la grossesse. Ces changements résultent de l'orchestration de modifications maternelles, fœtales et placentaires. La production d'hormones par les trophoblastes uniquement, est plus grande en quantité et en diversité, que n'importe quel tissu endocrinien des mammifères (64). Une des premières modifications hormonales indiquant la mise en place de la grossesse est l'augmentation de l'hormone chorionique gonadotrophique (hCG). Elle est détectable dans le sang et l'urine maternel approximativement 8 à 10 jours après la fécondation (35) soit au moment de l'implantation du blastocyste (64). Les taux plasmatiques vont croître rapidement, doublant tous les 2 jours, jusqu'à l'obtention d'un maximum (~100 UI/ml) entre la 8^e et 10^e semaine puis redescendront jusqu'à la 16^e semaine pour se maintenir stables jusqu'au terme (35; 64; 303). Le principal rôle du hCG est le maintien du corps jaune et sa transformation en corps jaune de gestation qui sécrète les hormones nécessaires à la poursuite de la grossesse (principalement la progestérone) jusqu'à ce que le placenta prenne le relais (42; 64; 303). Toutefois, la présence du récepteur LH-hCG dans des tissus non gonadotropes suggère que ses fonctions dépasseraient le premier trimestre. De plus, la hCG serait impliquée dans le maintien de la grossesse en agissant sur la quiescence utérine et sur la diminution de la résistance vasculaire utérine (64; 163; 248; 308; 316). Finalement, on retrouve également de la hCG circulante chez le fœtus bien que son niveau ne représente que 3% de celui de la mère (64). Les rôles de la hCG fœtale sont toutefois peu connus. Elle agit comme hormone adrénocorticotrope en stimulant la production de déhydroépiandrostérone (DHEA) (1; 169; 277)

et elle stimule la synthèse de testostérone nécessaire à la masculinisation des tissus fœtaux (1; 64; 129; 194). De plus, l'expression du récepteur LH-hCG dans plusieurs tissus fœtaux non gonadotropes ouvre la voie à la détermination de nouvelles fonctions (1).

Une deuxième hormone polypeptidique caractéristique de la grossesse est l'hormone lactogène placentaire (hPL). Elle est détectable dans la circulation maternelle à partir de la 3^e semaine de grossesse. Sa concentration plasmatique étant liée à la masse du placenta, elle augmente jusqu'à la 34^e-36^e semaine de grossesse (35; 64). Elle est principalement impliquée dans les processus métaboliques. Elle agit comme un antagoniste de l'insuline, ce qui diminue l'utilisation maternelle de glucose et favorise sa disponibilité pour le fœtus, contribuant ainsi au phénomène de résistance à l'insuline, caractéristique de la grossesse (35; 42; 64; 303). En contrepartie, elle stimule la synthèse et la sécrétion d'insuline par le pancréas (59). Elle favorise également la lipolyse maternelle, ce qui augmente les niveaux circulants d'acides gras libres (35; 64). Finalement, des études *in vitro* sur des trophoblastes humains en culture ont démontré que la hPL inhibe la sécrétion de leptine (59). La leptine, initialement connue comme l'hormone dérivée des adipocytes, est aussi synthétisée par le placenta durant la grossesse. Son rôle durant la grossesse n'est pas complètement élucidé mais elle serait un marqueur de l'adiposité fœtale et elle aurait des fonctions métaboliques, immunes et angiogéniques chez la mère (59; 60; 121).

Une autre hormone qui attire de plus en plus d'attention est la relaxine. Elle a été découverte en 1926 par Frederick L. Hisaw (126) lorsqu'il a démontré qu'elle induisait une relaxation des ligaments pubiens. Ce n'est cependant que vers le milieu des années 70-80, que des études rigoureuses sur sa structure et sa fonction ont été possibles (282). La relaxine est une hormone peptidique de 6 kDa semblable à l'insuline (53; 64; 154; 282). Chez l'humain, cette famille peptidique compte maintenant 7 membres : relaxine-1, -2 et -3 ainsi que le peptide semblable à l'insuline (INSL; *insulin-like peptide*)-3, -4, -5 et -6 (154). La relaxine-2 chez l'humain et la relaxine-1 chez le rat, la souris et le porc sont les seules formes de relaxine connues qui sont sécrétées dans le sang (282). Ce sont elles qui correspondent à l'hormone identifiée par Hisaw (154) et qui ont servies à identifier la majorité des actions de la relaxine (282). Au début des années 2000, les récepteurs pour cette famille de peptides ont été identifiés. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR; *G-protein-coupled receptors*) (récepteurs de la famille peptidique relaxine (RXFP; *relaxin family peptide*)) qui comptent 4 membres pour l'instant. Ils sont présents dans les tissus du système reproducteur mais également dans le cerveau, les reins, le cœur et les poumons (154; 282). Les principales fonctions de la relaxine sont associées à la

grossesse. Elle est principalement sécrétée par le corps jaune (53; 64; 154; 282). Elle est également exprimée par la décidua et le placenta (27) ainsi que dans des tissus non reproducteurs tels que le cerveau, le cœur et les reins (65). Elle est détectable 8 jours après le pic de l'hormone lutéinisante (LH) du cycle œstral et, s'il y a fécondation, elle atteint un maximum entre la 10^e et la 14^e semaine de grossesse. Par la suite, elle diminue et se maintient stable, à une concentration d'environ 0.5 ng/ml, à partir de la 24^e semaine jusqu'au terme, imitant ainsi le profile de la hCG (53; 154; 232; 298). Sa principale fonction biologique semble être le remodelage de l'appareil reproducteur pour accommoder l'implantation, la croissance et la parturition (65; 228; 282). La relaxine est également impliquée dans les changements hémodynamiques de la grossesse en agissant sur plusieurs composantes. Elle affecte l'osmorégulation et les fonctions rénales de filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire, la vasodilatation systémique et la compliance artérielle (53; 71; 195; 282). Bien que la relaxine semble jouer un rôle important dans la grossesse, elle n'est pas essentielle à son bon déroulement chez l'humain. Des femmes enceintes suite à un don d'ovule ont pu se rendre à terme malgré une absence de relaxine circulante et en dépit d'une atténuation des changements rénaux et osmotiques en début de grossesse (53; 288). Toutefois, cette étude ne permet pas d'exclure l'implication d'autres hormones sécrétées par le corps jaune.

La synthèse de plusieurs autres hormones est également augmentée durant la grossesse. Entre autres, le placenta produit des analogues d'hormones hypophysaires et hypothalamiques ainsi que de multiples facteurs de croissance; par exemple, un variant de l'hormone de croissance, le neuropeptide Y, l'inhibine et l'activine. Ces hormones agissent autant de façon paracrine qu'endocrine. Bien que nous possédions certaines données, leurs effets physiologiques et leur régulation durant la grossesse ne sont pas complètement connus. Il est clair, par contre, que leurs actions contribuent au bon développement de l'unité foëto-placentaire et du foëtus (49; 64; 65; 72; 303).

1.3.2. *Les Hormones Stéroïdiennes*

L'augmentation des hormones stéroïdiennes durant la grossesse est capitale à son bon déroulement. Elles commencent à être sécrétées dès le début de la grossesse par le corps jaune. Ce dernier synthétise et sécrète de la progestérone, du 17-hydroxyprogestérone et de l'œstradiol (72; 303). Cette étape est indispensable pour l'établissement de la grossesse. Ceci a été démontré dans plusieurs études animales, mais également chez la femme où l'ablation du corps jaune en

début de grossesse provoque un avortement. Ceci peut toutefois être évité si de la progestérone exogène est administrée (5; 23; 48; 63). Ces études ont permis de démontrer le rôle essentiel de la progestérone dans l'initiation de la grossesse. Toutefois, entre la 8^e et la 10^e semaine de grossesse, la production de la progestérone par le corps jaune n'est plus essentielle puisque le placenta prend la relève de la production (64; 203; 303).

La synthèse de progestérone (Fig. I-2) commence par la conversion du cholestérol en prégnénolone comme dans les autres glandes où se produit de la stéroïdogénèse (surrénales et gonades). Toutefois, comme le placenta produit peu de cholestérol *de novo*, il utilise surtout le cholestérol maternel (principalement les lipoprotéines de faible densité (LDL; *low-density lipoprotein*)). Celui-ci est converti en prégnénolone, dans la mitochondrie, par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cytochrome P450 (P450_{sc} (*side chain cleavage*); CYP11A1) (35; 64; 203; 319). Dans les autres tissus, l'apport du cholestérol à la mitochondrie s'effectue par la protéine de régulation aigüe de la stéroïdogénèse (StAR; *steroidogenic acute regulatory protein*) et cette étape est la principale étape limitante de la synthèse de progestérone. Cependant, StAR n'est pas présente dans le placenta humain (35; 203; 301). C'est plutôt son homologue, MLN64, qui semble occuper cette fonction mais les concentrations de cholestérol dans les cytotrophoblastes indiquent que cette étape n'est pas limitante dans le placenta (35; 203; 319). Le prégnénolone est par la suite converti en progestérone par l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) de type 1 (35; 64; 319) (plutôt que la 3 β -HSD de type 2 utilisée dans les surrénales et les gonades (203)). La progestérone produite est libérée immédiatement par diffusion et entre majoritairement dans la circulation maternelle (64; 303)

L'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes de stéroïdogénèse ainsi que l'expansion du placenta avec l'avancement de la grossesse sont probablement responsables de l'augmentation de progestérone qu'on observe jusqu'au terme (35), où le placenta en produit 250-300 mg par jour (35; 64; 303). Ses fonctions en début de grossesse sont bien étudiées mais elle agirait également sur l'utérus pour favoriser la quiescence utérine. Par ailleurs, elle aurait une action immunosuppressive, avec la hCG et le cortisol, au moment de l'implantation pour éviter le rejet du conceptus (35; 72; 303). De plus, la progestérone pourrait être impliquée dans la diminution de résistance vasculaire et dans la baisse de réactivité vasculaire aux agents presseurs qui sont associées à la grossesse (65; 72; 136). Finalement, les grandes concentrations de progestérone auraient un effet natriurétique en agissant comme antagoniste des récepteurs des minéralocorticoïdes (MR). Ceci serait compensé par l'augmentation d'aldostérone et les

mécanismes de protection du MR tel que la dégradation de la progestérone en métabolites inactifs (65; 244).

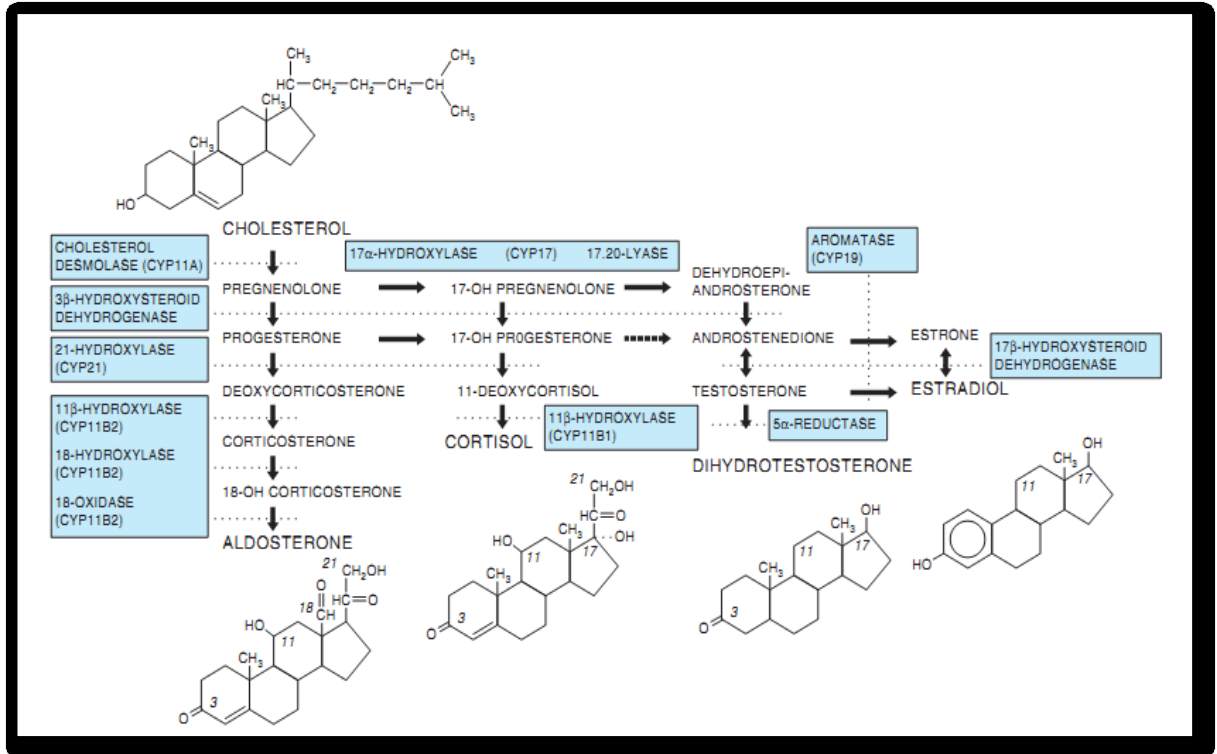


Figure I-2: Schéma de la stéroïdogenèse chez l'humain. (Tirée de Rosen et Cedars (254))

La synthèse des œstrogènes est également grandement augmentée durant la grossesse. On en retrouve quatre types : l'œstradiol, l'œstrone, l'œstriol et l'œstetrol. Chez la femme non gravide, l'œstradiol est principalement sécrétée par les ovaires (72). Tout comme la progestérone, elle est produite par le corps jaune après la conception puis le placenta prend le relais de la production entre la 8^e et la 10^e semaine de grossesse (72; 303). À terme, les taux de production d'œstradiol sont de 15 à 20 mg/24h alors qu'ils sont de 0.1 à 0.6 mg/24h à l'état non gravide (64). L'œstrone est produit à 50% par l'ovaire tandis que le reste provient d'une conversion périphérique. Son principal précurseur est l'androstènedione mais il peut aussi être dérivé de l'œstradiol ou du sulfate d'œstrone. On retrouve l'œstrone de façon prédominante durant la ménopause mais sa production est également augmentée durant la grossesse et elle suit le profil d'expression de l'œstradiol (254). Finalement, l'œstriol et l'œstetrol sont produits presque exclusivement par le placenta à partir de précurseurs fœtaux (Fig. I-3). Cela explique une détection

plus tardive dans le sérum maternel lié au développement des surrénales et du foie fœtal pour qu'ils produisent les précurseurs nécessaires à la stéroïdogénèse. À cause de cette caractéristique, ils ont déjà été utilisés comme indicateurs de la fonction placentaire et du bien-être fœtal mais la faible sensibilité et spécificité de ces tests ont causé l'arrêt de leur utilisation (64; 137; 229; 246; 254). L'augmentation du taux de production de l'œstriol passe de 0.02 à 0.1 mg/24h chez les non gravides à des valeurs de 50 à 150 mg/24h chez les femmes enceintes (64), ce qui en fait l'œstrogène le plus produit durant la grossesse même s'il est moins actif (64; 137; 246).

La synthèse des œstrogènes effectuée dans le placenta (Fig. I-3) diffère de celle effectuée dans les ovaires (Fig. I-2) car l'enzyme 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) qui permet la conversion des stéroïdes à 21 carbones (C) en stéroïdes à 19C est absente. Le cholestérol et la progestérone ne peuvent donc pas servir de précurseurs à la synthèse d'œstrogènes placentaires. Ce sont donc le déhydroépiandrostérone (DHEA) et le déhydroépiandrostérone sulfate (DHEA-S), des stéroïdes à 19C, qui sont produits par les glandes surrénales maternelles et fœtales qui sont utilisés par le placenta. Afin de convertir, le DHEA-S en œstradiol, le placenta doit exprimer quatre enzymes clé que l'on retrouve principalement dans les syncytiotrophoblastes. Premièrement, le placenta exprime de haut niveau de sulfatases de stéroïdes (STS; *steroid sulfatase*) qui transforment le DHEA-S en DHEA. Puis, la 3 β -HSD de type 1 convertit le DHEA en androstènedione. Ce dernier sera changé en œstrone via l'aromatase du cytochrome P450 (P450 aromatase; CYP19) et finalement, la 17 β -HSD de type 1 convertira l'œstrone en œstradiol. La synthèse d'œstriol et d'œstetrol se fait via les mêmes enzymes placentaires mais à partir des précurseurs 16 α -hydroxydéhydroépiandrostérone sulfate (16OH-DHEA-S) et 15 α ,16 α -dihydroxydéhydroépiandrostérone sulfate (15,16OH-DHEA-S) respectivement. Ces derniers proviennent de la transformation du DHEA-S, produit dans les surrénales fœtales, par des enzymes hydroxylases dans le foie fœtal (64; 229; 246). (Fig. I-3) Plus de 90% des œstrogènes synthétisés dans le placenta entre dans la circulation maternelle à cause de la placentation hémochorioendothéliale qui permet aux stéroïdes sécrétés par les syncytiotrophoblastes d'entrer directement du côté maternel. Cet arrangement, ainsi que le fait que la majorité des œstrogènes qui circulent du côté fœtal sont sous leur forme sulfatée (biologiquement inactive), permet à la mère de recevoir les quantités nécessaires d'œstrogènes pour le bon déroulement de la grossesse tout en protégeant le fœtus d'un excès d'œstrogènes. Le contrôle des concentrations d'œstrogènes et d'androgènes est important pour assurer, entre autres, une différenciation sexuelle adéquate du fœtus (64; 137; 229).

Du côté maternelle, l'augmentation des œstrogènes est essentielle pour orchestrer plusieurs modifications anatomiques, physiologiques, métaboliques et biochimiques. Ils sont impliqués dans les modifications anatomiques du système reproducteur (65) ainsi que dans l'augmentation du flot sanguin utérin (65; 72; 212; 256). Ils pourraient également jouer un rôle dans la parturition (246). De plus, l'œstradiol agirait dans le métabolisme du glucose, dans le pancréas, et participerait à l'état de résistance à l'insuline liée à la grossesse (65; 211). Finalement, les effets des œstrogènes sur les changements cardiovasculaires sont sûrement les plus étudiés. Ils seraient impliqués dans le remodelage cardiaque qui s'opère durant la grossesse et se résorbe en post- partum (79). Ils pourraient également intervenir dans la baisse de réactivité vasculaire et leur effet vasodilatateur résulterait d'une action autant sur les cellules endothéliales que sur les muscles lisses vasculaires (65; 275; 315; 348). De plus, les œstrogènes modulerait la pression artérielle et la fonction rénale durant la grossesse en agissant sur le SRAA. Ils augmentent l'expression d'angiotensinogène et la formation d'Ang II et de ses récepteurs, modulant ainsi leurs

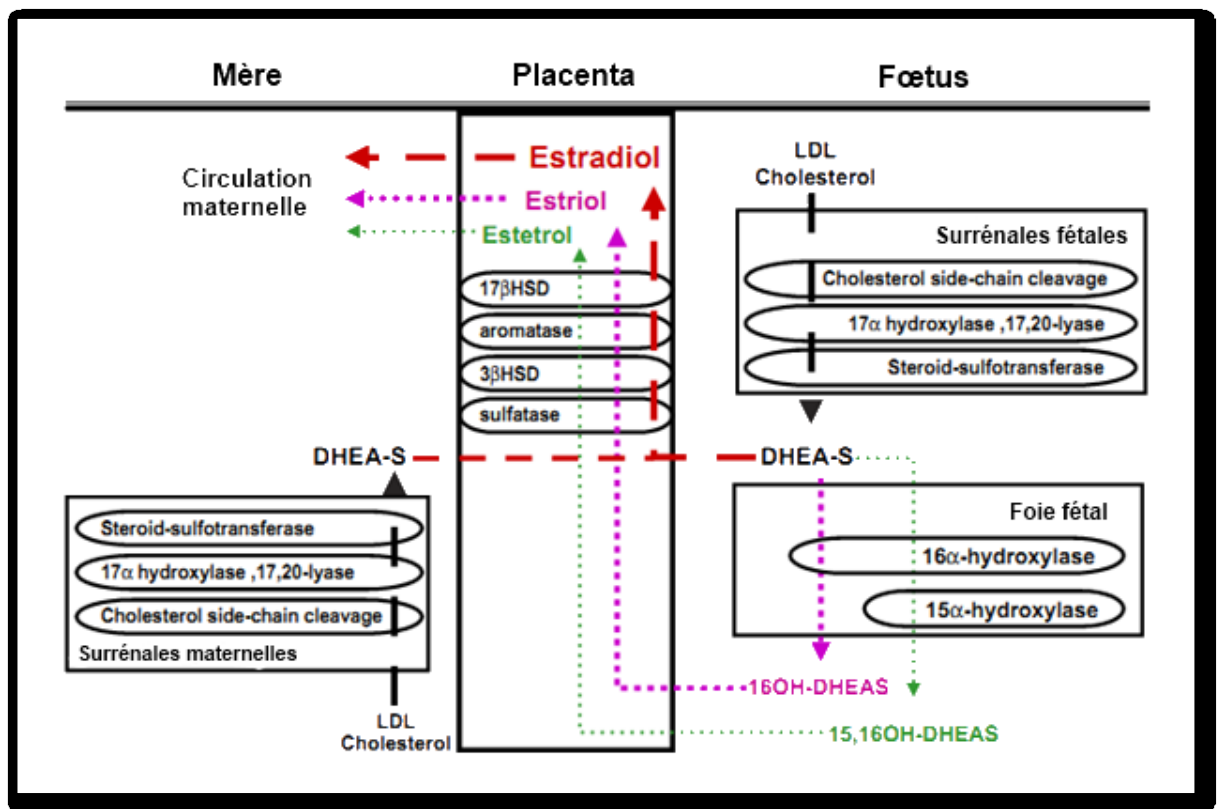


Figure I-3: Synthèse des œstrogènes dans le placenta humain. (Modifiée de Rayney et al. (171))

aux œstrogènes durant la grossesse mais plusieurs études sont encore nécessaires pour comprendre leur mode d'action complet dans cette condition.

Les glucocorticoïdes (cortisol) et les minéralocorticoïdes (aldostérone) sont des stéroïdes à 21C qui partagent la même structure que la progestérone mais qui diffèrent dans leurs actions biologiques à cause de l'ajout de groupements hydroxyle et cétone (Fig. I-2). Ils sont principalement synthétisés par les glandes surrénales (10; 72). Ces dernières ne subissent peu ou pas de modifications morphologiques durant la grossesse mais les taux circulants de cortisol et d'aldostérone sont augmentés (65; 246). Les niveaux sanguins de cortisol total sont augmentés de 3 à 8 fois durant la grossesse (246; 303). Cela est en grande partie due à l'élévation de la concentration des globulines de liaison des corticostéroïdes (CBG; *corticosteroid-binding globulin*), stimulée par les œstrogènes, qui entraînent une diminution du catabolisme du cortisol et le prolongement de sa demi-vie (65; 246; 303). On note également une augmentation de la synthèse surrénalienne qui se reflètera par une légère augmentation du cortisol libre, parallèle à celle du cortisol total (246). En général, la libération du cortisol est contrôlée par l'hormone de relâche de la corticotropine (CRH; *corticotropin-releasing hormone*) de l'hypothalamus et l'hormone adrénocorticotropique (ACTH; *adrenocorticotropic hormone*) de l'hypophyse et il se crée une boucle de rétrocontrôle négatif (49; 303). Par contre, durant la grossesse, cette rétroaction négative ne s'applique plus puisque l'unité foeto-placentaire produit du CRH. En fait, on observe plutôt un rétrocontrôle positif puisque le cortisol stimule la production de CRH placentaire et que ce dernier entraîne une augmentation du cortisol circulant (49; 124).

Dans les cellules, les effets du cortisol sont contrôlés par l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (11 β -HSD). Il en existe deux formes : la 11 β -HSD de type 1 (11 β -HSD1) qui peut agir de façon bidirectionnelle mais qui favorise la fonction d'oxydoréduction pour former du cortisol et la 11 β -HSD de type 2 (11 β -HSD2) qui agit unidirectionnellement pour convertir le cortisol en sa forme inactive, cortisone (157). Dans le placenta, les 2 isoformes sont présents mais leur localisation dans les syncytiotrophoblastes diffère de même que leur expression en fonction de l'âge gestationnel. Celle de la 11 β -HSD1 ne varie pas tandis que celle de la 11 β -HSD2 augmente (124; 231; 272). La 11 β -HSD2 prévient le passage placentaire du cortisol maternel vers le fœtus. Le contrôle de ce transfert en fonction du temps de gestation est primordial puisque les glucocorticoïdes entraînent la maturation des organes fœtaux pour la vie extra-utérine; mais ce faisant ils favorisent la différenciation au profit de la prolifération. Une augmentation précoce des concentrations de cortisol fœtal peut donc entraîner de la restriction de croissance intra-utérine

(44; 46; 93; 231). Les taux de cortisol fœtal sont donc augmentés seulement vers la fin de la grossesse (124; 246).

Pour accompagner l'augmentation de glucocorticoïdes, les concentrations de minéralocorticoïdes sont également élevées. L'augmentation d'aldostérone résulte d'une plus grande synthèse par les glandes surrénales maternelles (non gestante : 0.05-0.1 mg/24h vs gestante : 0.25-0.60 mg/24h (64)) et non pas d'une modification de son catabolisme. Cette augmentation est principalement liée à l'amplification du SRAA (65; 246; 303). Ces effets sont discutés dans la section suivante, mais il est important de noter que malgré l'importante augmentation d'aldostérone durant la grossesse, la femme ne manifeste pas les symptômes de l'hyperaldostéronisme (hyperkaliémie, hypernatrémie et hypertension) (246).

2. LE SYSTÈME RÉNINE ANGIOTENSINE ALDOSTÉRONNE

Le SRAA est reconnu principalement pour son rôle physiologique et pathophysiologique sur les systèmes rénal et cardiovasculaire où il est impliqué dans la régulation de la pression artérielle, du volume sanguin et de la balance des électrolytes. Depuis la découverte de la rénine en 1898 par Tigerstedt et al (309), les connaissances sur le SRAA n'ont cessées de croître et de nos jours, ce système est beaucoup plus complexe que l'on semblait le croire. En plus du système systémique classique, il existe un système rénine-angiotensine (SRA) tissulaire ou local qui est contrôlé de façon indépendante, mais qui peut interagir avec le SRA systémique. Également, des études démontrent la présence d'un SRA intracellulaire bien que ses fonctions ne soient pas complètement déterminées (97; 161; 167). La présence d'un SRA local a été démontrée entre autres dans les reins (17; 114; 230), le cœur (17; 230; 324), les vaisseaux sanguins (17; 230), le cerveau (17; 167; 230; 261), le pancréas (171; 230), le placenta (131; 220; 278), les gonades (131; 162; 230), ainsi que dans les tissus lymphatiques (230) et adipeux (109; 230). La découverte des composantes du SRA dans ces tissus ont permis de définir de nouvelles fonctions pour ces molécules qui agissent de façon autocrine, paracrine et endocrine.

Dans la voie classique du SRAA, la rénine est libérée dans la circulation par les cellules juxta-glomérulaires du rein. La rénine convertit l'angiotensinogène (Aogen), produite par le foie, en Angiotensine I (Ang I). Cette dernière est par la suite clivée en Angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE; *angiotensin-converting enzyme*) qui est exprimée

sur les cellules endothéliales vasculaires, particulièrement dans les poumons. Puis l'Ang II produit ses actions biologiques en se liant aux récepteurs de l'angiotensine type 1 ou type 2 (AT1R et AT2R). L'Ang II induit, entre autres, la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales et celle-ci produit ses effets par la liaison des récepteurs des minéralocorticoïdes. Dernièrement, il a été démontré que d'autres fragments de l'angiotensine avaient des potentiels biologiques. L'angiotensine III (Ang III; Ang 2-8) et l'angiotensine IV (Ang IV; Ang 3-8), produites par la dégradation de l'Ang II via les aminopeptidases A et N, respectivement, et l'angiotensine 1-7 (Ang 1-7) formée par un homologue de l'ACE, l'ACE2, à partir de l'Ang II font parties de ceux-là. De plus, la caractérisation de nouveaux récepteurs pour l'Ang IV (AT4R/IRAP; *insulin-regulated aminopeptidase receptor*), pour l'Ang 1-7 (Mas) et même pour la rénine/prorénine (RPR; *renin/prorenin receptor*) a consolidé l'existence de nouvelles fonctions du SRAA. Finalement, l'identification de voies alternatives de formation de l'Ang II démontre un contrôle indépendant du SRAA classique. Tous ces nouveaux éléments nous force à reconsidérer notre vision du SRAA classique et à prendre en compte un SRAA beaucoup plus complexe et multifactoriel (Fig. I-4) (97; 115; 162; 167; 230).

2.1.1. La Rénine La synthèse de la rénine, une enzyme protéolytique, dans les cellules juxtaglomérulaires du rein, implique une série d'étapes qui débutent par la traduction de l'ARNm en préprorénine. Ce peptide est ensuite clivé pour former la prorénine. Cette dernière sera soit directement sécrétée dans la circulation ou elle sera transformée en rénine dans les granules de sécrétion. La libération de la rénine dans la circulation sanguine se fait uniquement dans le rein en réponse à différents stimuli cellulaires qui incluent une stimulation par le système nerveux sympathique, la détection d'une hypotension artérielle rénale par les barorécepteurs, une stimulation des cellules de la macula densa par une diminution du sodium et du chlore dans les tubules distaux, une stimulation par différentes molécules (prostaglandines, adrénomédulline, dopamine, NO) ou une inhibition par l'Ang II, l'endothéline et la vasopressine (75; 156; 210; 219). Contrairement à la rénine, la prorénine peut être synthétisée et sécrétée par plusieurs tissus (156; 210) ce qui explique son taux circulant dix fois plus élevé (210). Autrefois considérée comme inactive, la découverte de récepteurs de la rénine/prorénine a permis d'approfondir son rôle. Deux types de récepteurs ont été caractérisés : le récepteur mannose-6-phosphate (M6P) et le RPR. Le premier est couplé aux protéines G et est impliqué dans le transport des protéines possédant des résidus M6P. Seules la prorénine et la rénine glycosillées s'y lient et cela entraîne leur internalisation et leur dégradation. Le RPR est un récepteur possédant un segment transmembranaire spécifique à la rénine et à la prorénine. Il existe trois formes de RPR : la protéine transmembranaire complète; la forme soluble (sRPR) trouvée dans le plasma et l'urine; et la forme tronquée (trRPR), composée du segment transmembranaire et du domaine cytoplasmique (218).

La liaison de la rénine/prorénine au RPR augmente l'activité catalytique de la rénine à la membrane cellulaire. Elle permet également l'activation de la prorénine, par changement conformationnel, ce qui entraîne une augmentation d'Ang II local et même systémique. La liaison au RPR entraîne également des effets cellulaires indépendants de la formation de l'Ang II, tel que l'activation de signalisations intracellulaires qui résultent en une augmentation de contractilité, d'hypertrophie, de fibrose ou d'apoptose (97; 210; 230). De plus, en 2010, Cruciat et al (62) ont démontré une fonction des RPR, indépendante de la rénine, dans la signalisation des Wnt. Les protéines Wnt sont des facteurs de croissance dont l'activité est essentielle pour le développement embryonnaire. Chez l'adulte, ils sont également impliqués dans la prolifération, la migration et la polarisation des cellules et une mauvaise signalisation favorise le développement de maladies dégénératives, incluant le cancer. Dans cette nouvelle fonction, le RPR sert d'adaptateur entre le complexe du récepteur Wnt et la V-ATPase (pompe à protons dépendante

de l'ATP) (218). Cette nouvelle avenue est très intéressante car le RPR pourrait devenir une cible thérapeutique pour les maladies dégénératives. Plusieurs études sont toutefois nécessaires pour la caractérisation complète de cette nouvelle fonction. Le trRPR est également associé à la V-ATPase. Il est essentiel pour la régulation de son activité qui consiste en l'acidification des compartiments intracellulaires et au transport des protons à travers les membranes plasmiques (218). Cette fonction du RPR est essentielle pour le bon fonctionnement, entre autres, du système nerveux central (218; 280), des reins (2; 218) et du cœur (151; 218). Finalement, le sRPR a récemment été détecté dans le plasma où il peut lier la rénine, et dans l'urine. Toutefois, son rôle n'est pas encore élucidé. On ne sait pas s'il peut augmenter l'activité de la rénine comme le RPR membranaire ou s'il agit comme un antagoniste circulant en liant la rénine (218). L'expression du RPR dans plusieurs tissus (rein, cœur, cerveau, VSMC, placenta, ...) pourrait permettre l'accumulation locale de rénine et de prorénine et ainsi permettre une activité tissu-spécifique du

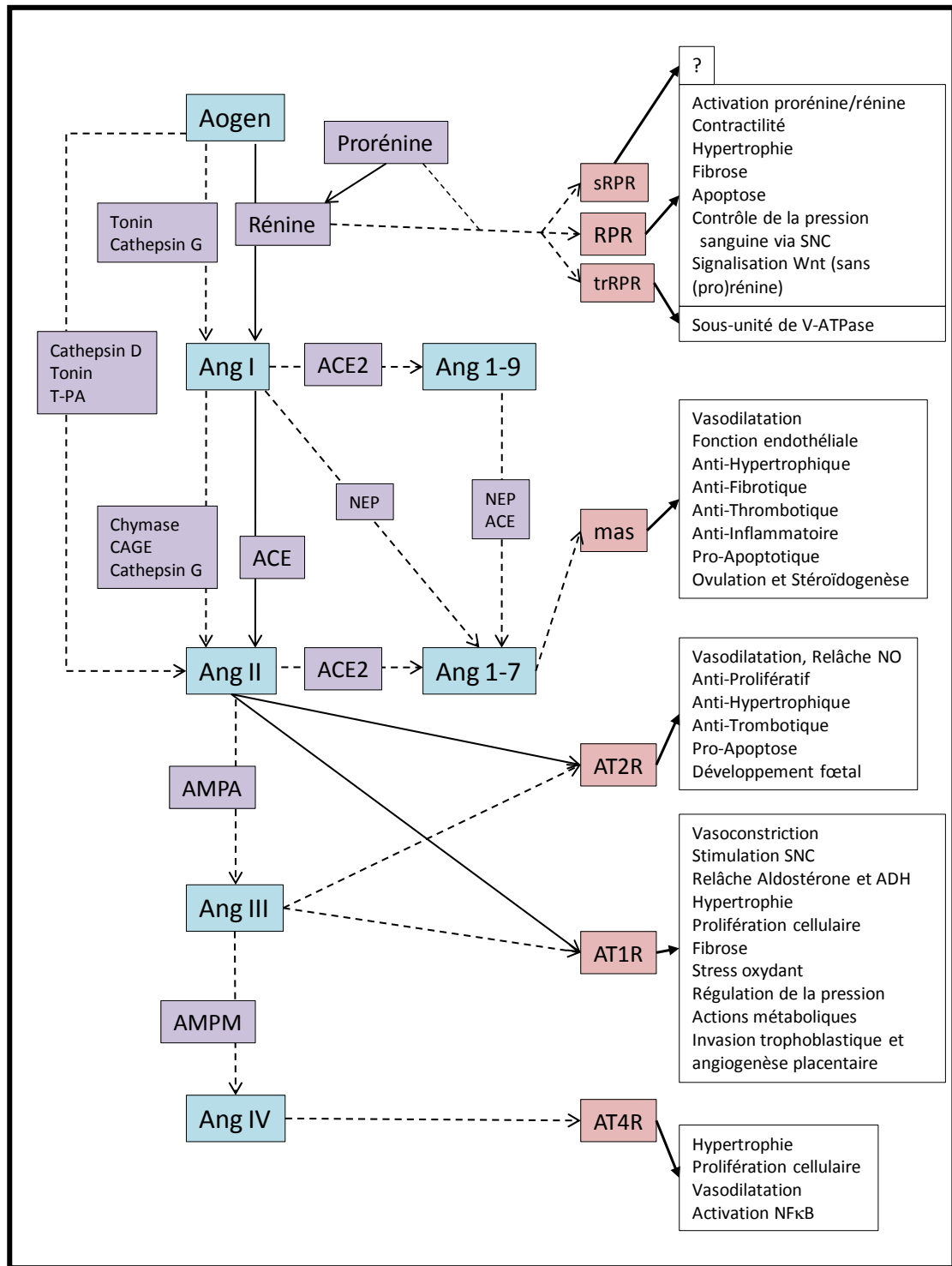


Figure I-4: Représentation du Système Rénine Angiotensine et des actions engendrées par ses récepteurs. Les flèches pleines (→) représentent le SRA classique et les flèches pointillées montrent les nouveaux concepts du SRA. En bleu : les peptides; en mauve : les enzymes et en rose : les récepteurs. (Inspirée de : 97; 131; 161; 162; 167; 198; 218; 230; 328)

SRA (210). L'activité rénine plasmatique étant considérée comme l'étape limitante du SRA (131; 210), beaucoup d'efforts sont consacrés au développement d'inhibiteurs de rénine pour bloquer le SRA et traiter les maladies cardiovasculaires et rénales. Pour l'instant, seul l'Aliskiren est utilisé cliniquement comme antihypertenseur et les premières études semblent très encourageantes (331). Toutefois, l'Aliskiren n'affecte pas la liaison ni l'activation des RPR par la rénine/prorénine (218).

2.1.2. Les Enzymes de Conversion ACE/ACE2

L'ACE est une dipeptidyl-carboxypeptidase qui clive des dipeptides de plusieurs substrats. En plus de la conversion de l'Ang I en Ang II, elle agit sur la bradykinine, les enképhalines et la substance P. L'ACE est présente dans plusieurs organes, particulièrement dans les cellules endothéliales, épithéliales et neuroépithéliales. On la retrouve en forme soluble ou liée à la membrane. Sa forme membranaire agit également comme récepteur et peut engendrer différentes cascades cellulaires suite à la liaison de substrats spécifiques. Les bloqueurs de l'ACE sont grandement utilisés, particulièrement dans le traitement de l'hypertension, pour inhiber la formation d'Ang II et bloquer ses effets biologiques. Toutefois, on ne peut négliger l'hypothèse que les effets des bloqueurs de l'ACE sont causés en partie par les autres peptides sur lesquels elle agit. Par exemple, l'augmentation des kinines qui résulte de l'inhibition de l'ACE pourrait favoriser l'effet hypotenseur observé (75; 161; 162). La conversion intracellulaire de l'Ang I en Ang II par des mécanismes indépendants de ACE a également été démontrée et requiert à des enzymes telles la cathepsin G, l'enzyme de génération de l'Ang II sensible à la chymostatine (CAGE; *chymostatin-sensitive Ang-II-generating enzyme*) et la chymase. Toutefois, le rôle physiologique de ces voies alternatives est encore nébuleux (167).

Identifiée en 2000 par Tipnis et al. (311), ACE2 est une carboxypeptidase qui possède 40% d'homologie avec ACE. Cette enzyme membranaire ne clive qu'un seul acide aminé contrairement à ACE. Elle est responsable de la conversion de l'Ang I en Ang 1-9 et de la conversion de l'Ang II en Ang 1-7 (97; 115; 162; 230). Sa fonction principale est la dégradation de l'Ang II bien qu'elle peut également hydrolyser l'apeline-13, la neurotensine-(1-11), la dynorphine A-(1-13), la β -casomorphine-(1-7) et la ghrelina (115; 329). Elle est abondamment exprimée dans les reins, le cœur, les VSMC, l'endothélium vasculaire, les testicules et le placenta, mais on la retrouve également dans les poumons, le foie, l'intestin et le cerveau (97; 115; 265; 323). La régulation de

son expression n'est toutefois pas complètement clarifiée. ACE2 n'est pas inhibée par les bloqueurs de l'ACE ni par les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA). Par contre, lorsqu'ils sont administrés, la présence de l'ACE2 augmente suggérant qu'elle contribue à leurs rôles cardio-protecteurs en hydrolysant le vasoconstricteur Ang II en vasodilatateur Ang 1-7 (97; 115).

2.1.3. *L'Angiotensine II*

L'Ang II est un octapeptide qui est reconnu comme le principal effecteur du SRAA. Cette hormone affecte potentiellement la fonction de tous les organes que ce soit de façon physiologique ou pathologique. Ses multiples effets sont contrôlés par sa liaison aux récepteurs AT1R et AT2R. Ces derniers sont des GPCR n'ayant seulement que 34% d'homologie, mais qui partagent une affinité semblable pour l'Ang II (131). On leur attribue généralement des fonctions opposées, mais leurs actions sont contrôlées par des voies complexes de signalisation. La majorité des effets physiologiques de l'Ang II sont attribués à l'activation des récepteurs AT1R. Ce dernier, principalement couplé aux protéines G_q/G_{11} , active plusieurs voies de signalisation (131; 162; 198). En plus des voies de signalisations classiques liées aux protéines G, AT1R interagit avec plusieurs tyrosine kinases et sérine/thréonine kinases (198). Une régulation précise de toutes les voies de signalisation activées est donc essentielle. Le temps de liaison, la localisation cellulaire des récepteurs de même que l'environnement tissulaire deviennent des facteurs importants du mécanisme d'action (198). L'Ang II contrôle principalement l'hémodynamie suite à sa liaison à AT1R. Elle entraîne de la vasoconstriction, la stimulation du système nerveux sympathique (SNS) et la sécrétion d'aldostérone et de vasopressine; qui contrôlent le débit sanguin et la rétention d'eau et de sels. Elle participe aussi à la croissance cellulaire et au remodelage cardiovasculaire en activant les voies de signalisation de la prolifération et de la migration cellulaires, de l'hypertrophie et de la fibrose. Finalement, l'Ang II a aussi des actions métaboliques incluant la modulation pro-inflammatoire, l'augmentation de la sécrétion d'insuline, l'apoptose des cellules β du pancréas, la diminution de la gluconéogenèse et l'augmentation des triglycérides plasmatiques (97; 131; 167; 219). L'introduction des ARA, qui sont spécifiques pour AT1R, a permis de déterminer plusieurs de ces fonctions. Ces bloqueurs sont aujourd'hui grandement utilisés pour prévenir et traiter l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (97; 219).

L'AT2R est couplé aux protéines G_i/G_o (162). Initialement reconnu pour ses effets opposant ceux d'AT1R, de nouvelles données indiquent qu'il peut induire une signalisation distincte. Les rôles reconnus d'AT2R comprennent l'inhibition de la croissance cellulaire, l'apoptose, la vasodilatation et la relâche de NO, la différenciation et la régénération du tissu neuronal ainsi que le développement tissulaire fœtal compte tenu de sa grande expression chez le fœtus; expression qui décline après la naissance (97; 131; 198; 230). De plus, AT2R agit comme antagoniste d'AT1R, indépendamment de sa liaison au ligand, en formant un hétérodimère avec AT1R et en interrompant sa signalisation (162; 198). Toutefois, le rôle d'AT2R dans les pathologies est encore incertain puisque plusieurs études ont produit des résultats contradictoires (198). Bien que les ARA augmentent les niveaux d'Ang II et causeraient vraisemblablement une plus grande stimulation d'AT2R, il n'y a pas d'évidence pour prouver la pertinence clinique d'une augmentation de l'activité d'AT2R (97). D'autres études sont donc nécessaires pour éclaircir son rôle dans les pathologies impliquant le SRA.

2.1.4. *L'Angiotensine 1-7*

On a longtemps cru que l'Ang 1-7 était dépourvue de fonctions biologiques. Toutefois, la caractérisation d'ACE2 et du récepteur mas ont grandement fait accélérer les connaissances. Mas, le récepteur de l'Ang 1-7, est un GPCR qui a initialement été décrit comme un facteur oncogène (90; 230; 266). L'Ang 1-7 s'oppose aux actions de l'Ang II. L'Ang 1-7 a des effets vasodilatateurs causé par la relâche de bradykinine, de prostaglandines et de NO. De plus, elle a des actions antiprolifératives, anti-fibrotiques et pro-apoptotiques et pourrait agir comme agent anti-inflammatoire (90; 97; 115; 162). Finalement, dans l'ovaire, l'Ang 1-7 serait impliquée dans le processus d'ovulation et dans la stéroïdogenèse (328).

2.1.5. *L'Angiotensine III et l'Angiotensine IV*

L'Ang III est synthétisée suite à la dégradation de l'Ang II par l'aminopeptidase A (AMPA). Elle agit également en se liant à AT1R et à AT2R. Ces fonctions sont donc similaires à celles de l'Ang II. Toutefois, comme sa dégradation métabolique est 5 fois plus rapide que celle de l'Ang II, cela confère à cette dernière le rôle de principal effecteur du SRA (97).

L'Ang IV est généré à partir de l'Ang III par l'aminopeptidase M (AMPM) (97). L'intérêt pour ses fonctions biologiques est récent et découle de la caractérisation d'un nouveau récepteur de l'angiotensine, le type 4 (AT4R). Faisant parti de la famille des récepteurs aminopeptidase contrôlés par l'insuline (IRAP; *insulin-regulated amino peptidase receptors*), il n'est pas un GPCR contrairement à AT1R et AT2R (45; 97; 230). AT4R est exprimé dans le cœur, les VSMC, les reins, le poumon, le colon, les glandes surrénales, la prostate et plusieurs régions du cerveau (45; 230). Les actions biologiques de l'Ang IV incluent la vasodilatation, l'hypertrophie, l'activation de NFκB qui entraîne l'expression de plusieurs protéines, la prolifération cellulaire et la régulation des fonctions cognitives, du métabolisme rénal et des dommages cardiovasculaires (97).

2.1.6. L'Aldostérone

L'aldostérone, le principal minéralocorticoïde, est synthétisé dans la zone glomérulée des glandes surrénales. Sa sécrétion est principalement contrôlée par l'Ang II et le taux de potassium, mais également par l'ACTH, le sodium et la dopamine (3; 75). Tout comme les autres hormones stéroïdiennes, l'aldostérone est produite à partir du cholestérol suite à une série de réactions enzymatiques opérées par des déhydrogénases et des membres de la famille des cytochromes P450 (Fig. I-2). Le principal substrat pour la formation d'aldostérone, la 11-déoxycorticostérone (DOC), est formée suite à la conversion de la progestérone par la 21-hydroxylase (CYP21). Par la suite, DOC est transformée en aldostérone par trois réactions successives catalysées par l'aldostérone synthase (CYP11B2); une 11β-hydroxylation, une 18-hydroxylation et une 18-méthoxydation qui engendreront respectivement la corticostérone, la 18-hydroxycorticostérone et finalement l'aldostérone (81; 182). Une fois en circulation, 50-70% de l'aldostérone se retrouve associé à des protéines plasmatiques contrairement à DOC et au cortisol qui sont presque totalement liés à ces protéines. Conséquemment, jusqu'à 90% de l'aldostérone libre peut être métabolisée en un passage hépatique, ce qui lui confère une demi-vie relativement courte de 20-35 minutes contrairement à celle du cortisol qui est de 80-120 minutes (3; 75).

L'aldostérone agit dans plusieurs tissus de façon génomique (voie classique) et/ou non-génomique (Fig. I-5). Ses actions sont principalement causées par sa liaison aux récepteurs des minéralocorticoïdes (MR). Ce dernier fait parti du groupe des récepteurs des hormones stéroïdiennes qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires et qui inclut les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR) et des androgènes (AR). Le

MR se démarque parmi ceux-ci puisqu'il est le seul qui peut lier différentes classes d'hormones stéroïdiennes : les minéralocorticoïdes (aldostérone, DOC), les glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone chez les rongeurs) et la progestérone (343). L'affinité du MR pour l'aldostérone et le cortisol est similaire et bien que le cortisol se retrouve en plus grande concentration dans la circulation, les tissus répondant à l'aldostérone exprime également la 11 β -HSD2 pour assurer la spécificité de la réponse (108; 343). De plus, le complexe MR:aldostérone semble être plus stable et avoir une meilleure capacité de transcription que le complexe MR:cortisol (108). La progestérone peut également se lier au MR et agir comme antagoniste. Il est suggéré qu'un mécanisme similaire à celui de la 11 β -HSD2 dégrade la progestérone en métabolites inactifs (244; 245). En plus de la protection du MR par différentes enzymes, la spécificité du récepteur est également conférée par sa structure et par sa liaison aux cofacteurs spécifiques qu'il recrute. En effet, le MR est constitué de trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison du ligand (330; 343). On a suggéré que différents ligands peuvent induire de subtils changements conformationnels dans les différents domaines, ce qui influencent les interactions du récepteur avec les protéines chaperonnes, les protéines corégulatrices, d'autres facteurs de transcription et l'ADN, lui conférant ainsi une plus grande spécificité (343).

Il est certain que la voie classique (génomique) d'action de l'aldostérone s'opère par les MR. Toutefois, la signalisation des réponses non-génomiques suscitent toujours des débats. Plusieurs données supportent l'idée que le MR classique est responsable autant des réponses génomiques que non-génomiques. Une petite fraction des MR serait présente à la membrane plasmique. Grossmann et al (112) ont constaté une colocalisation avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR; *epidermal growth factor receptor*) tandis que d'autres études montrent que le MR est associé à la protéine cavéoline-1 pour former un complexe de signalisation dans les cavéoles (159). Cela suggère une localisation appropriée pour initier une cascade de signalisation membranaire, mais une meilleure caractérisation est nécessaire pour justifier le rôle physiologique des MR à la membrane cellulaire (160). Par contre, Wehling (336) suggèrent qu'un récepteur membranaire de l'aldostérone, différent du MR, serait responsable des effets non-génomiques. Un tel récepteur n'a pas encore été caractérisé, mais une étude récente suggère que les effets rapides de l'aldostérone dans les VSMC et dans les cellules endothéliales sont dépendants d'un GPCR, GPR30 (récepteur orphelin 30; *G protein receptor 30*), également responsable des effets non-génomiques de l'œstrogène (111). Cette voie d'activation pourrait

devenir une nouvelle cible thérapeutique pour contrôler les effets non-génomiques de l'aldostérone.

La présence du MR a initialement été démontrée dans les tissus épithéliaux, tels que le rein et le colon, où il est impliqué dans la régulation de la réabsorption de sodium, de la sécrétion de potassium ainsi que de l'homéostasie de l'eau via le contrôle de transporteurs ioniques membranaires. Il est ainsi impliqué dans le contrôle du volume sanguin et de la pression artérielle (28; 330). Toutefois, le MR est aussi exprimé dans les tissus non épithéliaux tels que le cœur, la vasculature, le cerveau et les adipocytes, ouvrant la voie à de nouvelles fonctions biologiques (330). L'intérêt pour le MR dans le système cardiovasculaire découle de plusieurs études cliniques (RALES, EPHEBUS, TOPCAT et EMPHASIS) décrivant un effet bénéfique de ses bloqueurs dans le traitement des maladies cardiovasculaires (189). Une faible augmentation des taux d'aldostérone sérique chez des patients atteints d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque peut produire des modifications de la fonction vasculaire indépendantes des changements de pression artérielle, démontrant un rôle direct de l'aldostérone sur les vaisseaux (192). L'aldostérone peut agir sur les vaisseaux sanguins de façon génomique et non-génomique en affectant autant l'endothélium que les VSMC. Des études *in vitro* et *in vivo* chez des animaux et chez l'humain suggèrent que l'activation du MR stimule le stress oxydatif vasculaire et l'inflammation, la fibrose et le remodelage des vaisseaux ainsi que la réactivité vasculaire (36; 96; 192; 269).

Le mécanisme de contrôle rapide des MR sur la réactivité vasculaire restent limité, compte tenu des résultats contradictoires des études sur les vaisseaux *ex vivo* et *in vivo*. Bien que ces différences soient probablement dues à la conception de l'étude (lit vasculaire étudié, espèce, durée de l'exposition à l'aldostérone et concentrations), l'action sur l'endothélium et la synthèse de NO sont requises dans les réponses vasorelaxantes (170; 192). Lorsque l'aldostérone est administrée dans la lumière du vaisseau pour cibler l'endothélium, par opposition à l'administration dans la solution du bain qui cible les VSMC, une réponse vasodilatatrice est observée. Elle requiert alors la présence d'un endothélium fonctionnel, des MR et la génération de NO via les synthèses de monoxyde d'azote endothéliales (eNOS) (122). Le retrait de l'endothélium ou la co-incubation avec des inhibiteurs de NOS entraîne la perte de la vasodilatation et une augmentation de la contraction démontrant l'implication des MR endothéliaux dans la vasodilatation et des MR des VSMC dans la vasoconstriction (122; 270). L'aldostérone induit aussi une constriction des VSMC en modulant différentes voies de signalisation menant à la mobilisation du calcium intracellulaire et de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique, la phosphorylation de

plusieurs molécules de signalisation telles que la protéine kinase C (PKC), l'EGFR, les protéines kinases activées par un mitogène (MAPK; *mitogen-activated protein kinases*), les kinases dépendantes d'un signal extracellulaire 1/2 (ERK1/2; *extracellular signal-regulated kinases*) et le c-Src, ainsi que par l'augmentation de la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS; *reactive oxygen species*) (Fig. I-5) (36; 38; 39; 50; 158; 176; 184; 192; 201; 269). La régulation du tonus vasculaire par l'aldostérone est donc la résultante de la balance des effets sur l'endothélium et sur les VSMC.

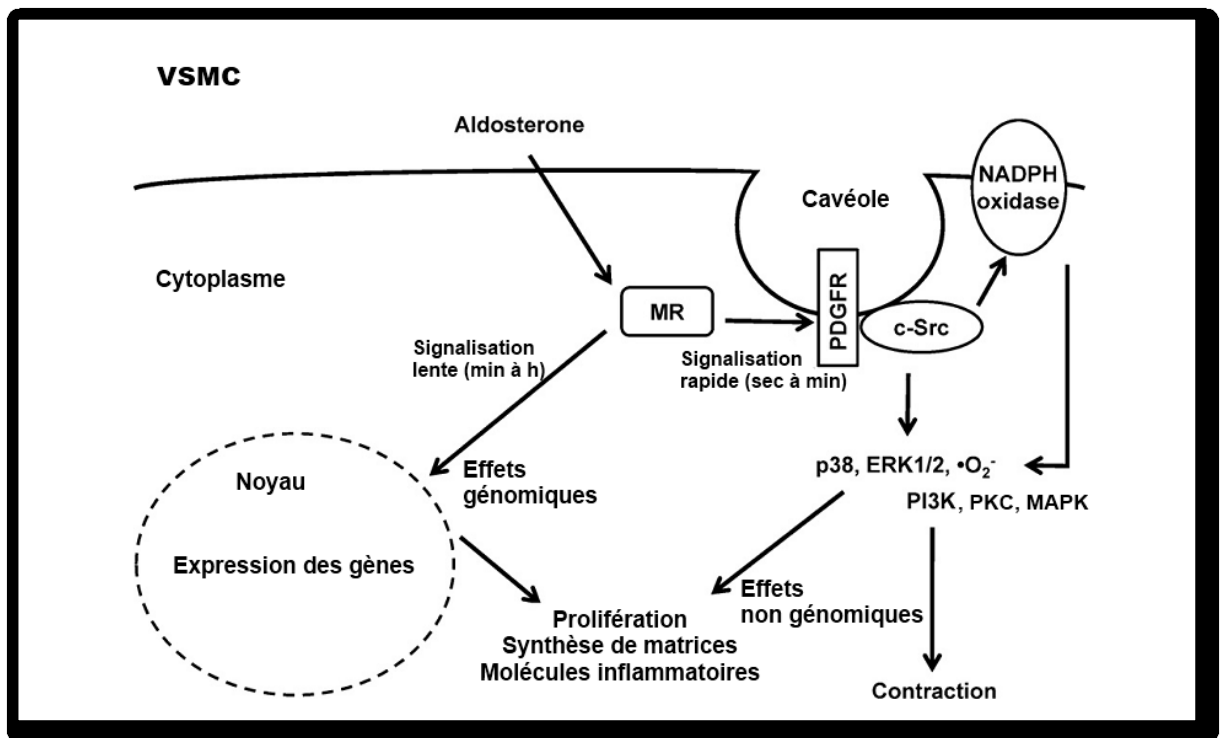


Figure I-5 : Signalisation de l'aldostérone par les MR dans les cellules des muscles lisses vasculaires. L'activation des MR par l'aldostérone stimule des voies de signalisation génomiques et non génomiques. (traduite de Rautureau et al. (249))

La majorité des connaissances acquises sur les fonctions du MR sont dues à l'utilisation d'antagonistes. Les antagonistes du MR sont divisés en deux catégories soit les composés stéroïdiens et les non stéroïdiens. Seule la première classe est approuvée pour l'utilisation en

clinique tandis que les composés non stéroïdiens sont présentement en développement. Le spironolactone fût le premier antagoniste à être commercialisé en 1960. C'est un puissant antagoniste compétitif du MR, mais il agit également sur les récepteurs des androgènes et sur ceux de la progestérone, conduisant à de la gynécomastie, de l'impotence et des irrégularités du cycle menstruel. Ces effets secondaires ont amené le développement d'antagonistes plus spécifiques. Ce n'est qu'en 2002 que l'éplérénone (9-11 α -epoxymexrenone) a été commercialisé aux États-Unis. Toutefois, malgré sa plus grande sélectivité, l'éplérénone a une faible affinité pour le MR *in vitro* (environ 40 fois moins puissant que le spironolactone) et il est moins efficace pour traiter l'hypertension. C'est pourquoi le spironolactone est toujours largement utilisé en clinique puisqu'aucun composé stéroïdien n'est plus sélectif tout en ayant une puissance équivalente ou supérieure (153).

Ces différences peuvent être dues à la pharmacocinétique des antagonistes. Le spironolactone est absorbé à 80-90% par la voie orale et a une demi-vie de 1.4 heure. Par la suite, il est rapidement métabolisé par le foie en plusieurs métabolites actifs dont les plus importants sont le 7 α -thiométhylspironolactone et le canrénone (ce dernier étant commercialisé sous sa propre formulation dans certains pays). Leur demi-vie respective est de 13.8 et 16.5 heures. Les conséquences de ce métabolisme sur la pharmacodynamie sont un début d'action très lent (jusqu'à plusieurs jours pour que les métabolites actifs atteignent des niveaux plasmatiques stables), mais leur longue demi-vie assure une bonne efficacité avec une seule dose par jour. En comparaison, l'éplérénone semble être plus efficace pour diminuer la pression artérielle lorsqu'il est administré 2 fois par jour. Sa biodisponibilité n'est pas connue. Toutefois, l'éplérénone est métabolisé par la voie CYP450 3A4, mais il ne génère aucun métabolite actif. Sa demi-vie est de 4-6h (153; 284). Dans la présente étude, nous avons choisi d'utiliser le canrénoate de potassium. Ce dernier est moins antiandrogénique que le spironolactone (76). Il est soluble en solution aqueuse et est presque entièrement absorbé par la voie gastro-intestinale, en plus d'éviter le premier passage hépatique. Tout comme le spironolactone, il agit comme antagoniste du MR et est également métabolisé en canrénone (141; 260).

La demande pour des antagonistes du MR qui possèdent la puissance et l'efficacité du spironolactone et la spécificité de l'éplérénone a lancé la course pour la troisième génération d'antagonistes. Plusieurs composés non stéroïdiens ont été identifiés et brevetés. Étonnamment, la démonstration que des composés appartenant à la classe des dihydropyridines (nifédipine, nimodipine ou amlodipine), molécules reconnues comme antagonistes des canaux calciques de

type L, peuvent agir comme antagonistes du MR a suscité un grand intérêt auprès des compagnies pharmaceutiques. L'optimisation de ces composés pour favoriser leur fonction d'antagoniste du MR sans activité sur les canaux calciques a engendré le développement de nouvelles molécules dont certaines sont présentement à l'étude. Finalement, un intérêt est porté sur une quatrième génération d'antagonistes qui agissent sur le MR de façon tissu-spécifique en favorisant l'activation des MR rénaux et en inhibant les effets néfastes des MR cardiaques. Ces antagonistes agissent directement sur le récepteur ou indirectement en modifiant ses cofacteurs. Les études futures nous permettront de déterminer si une telle inhibition du MR sera possible (153).

2.2. LE SRAA ET LA GROSSESSE

Le SRAA subit plusieurs changements dès les premières semaines de grossesse et on l'associe aux modifications hémodynamiques décrites précédemment. Rapidement, les niveaux de rénine augmentent suite à sa sécrétion par les ovaires et la décidua (128; 278). Puisque la production d'Angiotensinogène par le foie est également augmentée, on note une plus grande activité rénine plasmatique (PRA) dès la 6^e semaine de grossesse. Cela entraîne une augmentation des niveaux sériques d'Ang II même si l'ACE systémique est diminuée (47; 131; 199). Bien que l'Ang II soit augmentée, les femmes normotendues sont réfractaires à son effet vasopresseur (131; 237; 278). Une des explications possibles est la présence de progestérone et de prostacyclines qui peuvent diminuer la sensibilité à l'Ang II (98; 131; 278). L'inhibition des AT1R monomériques par les ROS peut également affecter la réponse à l'Ang II (131). De plus, on note que l'expression d'AT2R vasculaire est augmentée durant la grossesse ce qui favorise l'hétérodimérisation AT1R/AT2R et l'inhibition de la signalisation d'AT1R (297; 327). On note également que l'activité de ACE2 dans les reins est augmentée et que les concentrations d'Ang 1-7 sont élevées à partir de la 6^e semaine et qu'elles croissent jusqu'au terme, ce qui peut contrecarrer les effets locaux de l'Ang II (32; 138). Finalement, l'augmentation d'Ang II entraîne une production massive d'aldostérone dans la zone glomérulée du cortex surrénalien (131; 237; 303). Les taux d'aldostérone sont augmentés dès la 6^e semaine de grossesse et ils s'élèvent davantage durant le 3^e trimestre (47). On note toutefois une dissociation entre les niveaux de PRA et d'aldostérone bien qu'ils répondent tous les deux à une suppression ou une stimulation du SRA. Cela pourrait s'expliquer par une hypersensibilité des surrénales aux changements de PRA, via l'Ang II, ou par une stimulation de la synthèse d'aldostérone par des facteurs indépendants du SRA tels que les œstrogènes, l'ACTH ou les

facteurs semblables à la digitale (DLF; *digitalis-like factors*) (22). L'augmentation d'aldostérone est importante puisqu'elle est responsable de l'expansion du volume sanguin (81) ainsi que du développement du placenta (103). Ces actions sont finement contrôlées malgré les concentrations élevées de progestérone qui agit comme antagoniste du MR. Quinkler et al. (245) ont évalué le pouvoir antagoniste de la progestérone *in vivo* à des concentrations similaires à celles obtenues durant le troisième trimestre de grossesse. Étonnamment, le ratio sodium/potassium urinaire n'est que faiblement augmenté malgré le fait que les concentrations plasmatiques de progestérone sont 1000 fois plus élevées que celles de l'aldostérone. La progestérone est métabolisée par la P450c17 et elle est transformée en DOC (un agoniste plus faible du MR) en dehors des surrénales. L'activité de la 11 β -HSD2 est inhibée, augmentant les niveaux de cortisol qui s'opposent à l'effet anti-MR de la progestérone. Cela démontre que durant la grossesse, les taux élevés d'aldostérone sont responsables des effets minéralocorticoïdes observés au niveau rénal.

En plus du SRA systémique, la grossesse est associée à l'activation d'un SRA utéroplacentaire. Il y a deux SRA dans le placenta, le premier dans les tissus fœto-placentaires et le deuxième dans les tissus placentaires maternels (décidua). Tous les éléments du SRA sont présents dans les tissus placentaires fœtaux (131; 188; 278). De plus, de grandes quantités d'AMPA sont produites dans les tissus fœto-placentaires et elles peuvent dégrader l'Ang II produite localement et ainsi agir comme une barrière à l'Ang II entre les circulations maternelle et fœtale (278). Le SRA du côté fœtal est impliqué dans la régulation de la circulation afin que le flot sanguin soit adéquat pour l'oxygénation et la nutrition des tissus fœtaux (131). Toutefois, ses fonctions ne sont pas complètement définies. Toutes les composantes sont également présentes du côté maternel, plus particulièrement dans la décidua (278). La présence d'un SRA dans la décidua est impliquée dans le remodelage des artères spiralées (205). De plus, l'importante expression d'AT1R dans les trophoblastes a permis de démontrer une implication du SRA dans le phénomène d'invasion trophoblastique (131). Finalement, de récentes données démontrent que le SRA utéroplacentaire est impliqué dans la parturition (188).

Toutes les études, autant chez la femme que chez l'animal, indiquent que le SRAA subit des changements spécifiques et nécessaires au bon déroulement de la grossesse. Toutefois, la majorité des études ne portent pas sur la grossesse normale mais sur les cas pathologiques tel que la prééclampsie. Cette pathologie est une cause majeure de morbidité et mortalité chez la mère et l'enfant. Elle est caractérisée par de l'hypertension et de la protéinurie, de même que par une

mauvaise perfusion utéroplacentaire (82; 131). Plusieurs mécanismes pathophysiologiques ont été impliqués dans le développement de la prééclampsie incluant la dysfonction endothéliale (68), les phénomènes inflammatoires (104), le stress oxydant (186) et le SRAA (20; 81; 82; 220; 278). En effet, chez les femmes souffrant de prééclampsie, le SRAA est moins activé que chez les femmes normotendues (82; 278; 279). De plus, on observe un renversement de la perte de réactivité vasculaire à l'Ang II (279). Finalement, en 1999, Wallukat et al. (332) ont démontré la présence d'un auto-anticorps qui stimule AT1R dans les cas de prééclampsie. Il est maintenant clair que la prééclampsie est une pathologie avec une composante vasculaire primordiale qui implique des interactions avec différents types cellulaires tels que les trophoblastes, les cellules endothéliales et les VSMC (131). Toutefois, comme la prééclampsie est une pathologie spécifique à l'humain, plusieurs modèles animaux ont été développés pour évaluer l'impact vasculaire de cette pathologie (150; 234) et par le fait même expliquer les réponses à la grossesse normale.

3. LES MUSCLES LISSES VASCULAIRES

3.1. LA STRUCTURE DES VAISSEAUX

Le système vasculaire est un circuit fermé mais dynamique qui achemine le sang du cœur jusqu'aux organes puis qui le ramène à celui-ci. Les artères sont les vaisseaux les plus actifs pour contrôler l'hémodynamie. Elles sont composées de 3 couches : la tunique interne, la tunique moyenne et la tunique externe (Fig. I-6). La tunique interne ou intima est formée de l'endothélium, un épithélium simple pavimenteux qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux et du cœur, d'une membrane basale et d'une couche de tissu élastique nommée limitante élastique interne. La tunique moyenne, ou média, comprend principalement des myocytes et des fibres élastiques pour former le muscle lisse. Finalement, la tunique externe est composée principalement de fibres élastiques et de fibres de collagène qui protègent les vaisseaux et leur donnent une certaine rigidité. Les 3 couches sont présentes dans toutes les artères, mais leur proportion varie selon leur localisation et de leur fonction (artères de conductance ou de résistance). L'aorte est un gros tronc artériel appartenant aux vaisseaux de conductance. Elle possède donc un grand diamètre et une grande élasticité puisque l'on retrouve des fibres élastiques dans les trois tuniques, mais surtout dans la tunique moyenne. Les tissus élastiques des

vaisseaux sanguins sont composés de fibres d'élastine entourées de plusieurs autres protéines, comme la fibrilline qui est essentielle à leur stabilité. L'élasticité de l'aorte lui permet de compenser les grandes fluctuations de pression lors de la systole et la diastole et donne lieu à un écoulement continu du sang dans le réseau artériel. En comparaison, les artères de résistance ont une plus grande proportion de cellules musculaires lisses et moins de fibres élastiques. Elles agissent comme régulateurs du flot vers les capillaires et les variations de leur diamètre peuvent avoir un effet notable sur la pression artérielle (172; 187; 314).

Le système veineux est responsable du retour du sang des tissus vers le cœur. Comme les veines sont plus nombreuses et que leur lumière est plus grande que celle des artères, elles contiennent environ deux tiers du volume sanguin. On les nomme donc vaisseaux de capacitance. Elles possèdent les mêmes trois couches que les artères mais dans des proportions différentes (Fig. I-6). Les tuniques interne et moyenne sont beaucoup plus minces tandis que la tunique externe est plus épaisse, renfermant plus de fibres collagènes et élastiques. Ces différences n'empêchent toutefois pas un contrôle actif du volume qui est bien assuré par les mécanismes de vasodilatation et de vasoconstriction. De plus, de nombreuses veines possèdent des valvules veineuses qui sont de minces replis de la tunique interne qui réduisent la circulation rétrograde du sang et favorisent le retour veineux au cœur. Ce dernier est dépendant du gradient de pression entre les veinules (~16 mm Hg) et le ventricule droit (0 mm Hg), mais aussi des contractions musculaires des membres inférieurs et du changement de pression dans le thorax et l'abdomen durant la respiration (172; 187; 314).

3.2. LA STRUCTURE DES CELLULES DES MUSCLES LISSES VASCULAIRES

Les cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) de la media sont les unités responsables du maintien du tonus vasculaire ainsi que de la vasoconstriction et de la vasodilatation. La structure des VSMC (Fig. I-7) diffère de celle des autres muscles (cardiaque et squelettique) en plusieurs points. Quatre structures sont particulièrement importantes pour la contraction de la cellule : les unités contractiles, les réserves de calcium, les cavéoles et les jonctions intercellulaires. Le sarcomère (unité contractile) est composé de filaments d'actine et de myosine, mais contrairement à la contraction cardiaque où les filaments d'actine sont activés, dans les

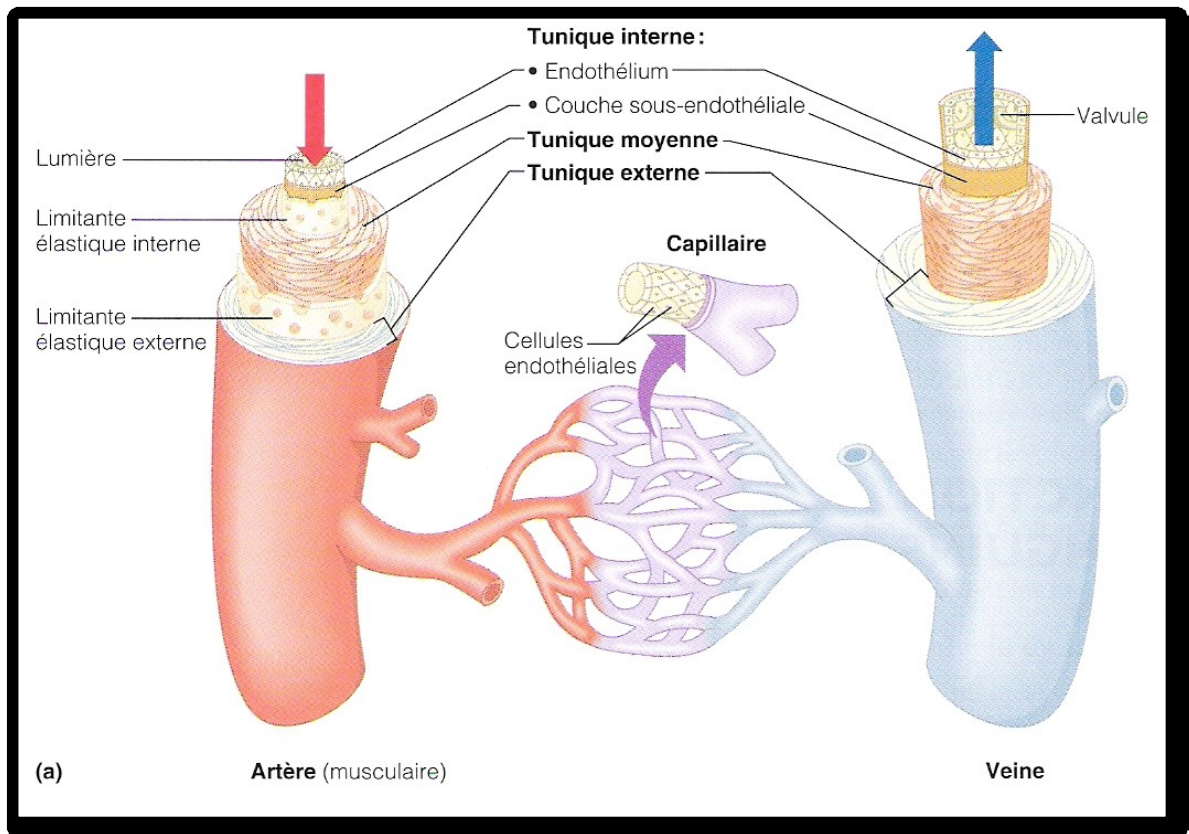


Figure I-6: Structure des artères, des veines et des capillaires. Les parois des artères et des veines sont composées de trois tuniques (interne, moyenne et externe). Les capillaires, qui forment un réseau intermédiaire entre les artères et les veines pour assurer l'apport de nutriments et d'oxygène à toutes les cellules, ne sont composés que d'un endothélium et d'une lame basale. (Tirée de Marieb, (187))

VSMC ce sont les filaments de myosine qui sont activés. En effet, la myosine participe à la contraction uniquement lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK; *myosin light chain kinase*) suite à une augmentation des concentrations de calcium cytosolique. De plus, la force de la contraction est influencée non seulement par la concentration de calcium, mais également par la sensibilité au calcium. On retrouve donc différentes protéines régulatrices associées au sarcomère (tropomyosin, caldesmon et calponin). Cela influence la vitesse de contraction qui débute plus lentement mais qui dure plus longtemps dans les VSMC que dans les autres muscles. D'autre part, on note également que l'ampleur du raccourcissement est plus grande, car les filaments des sarcomères sont plus longs. Ils sont également regroupés en bandes denses sur la surface interne de la cellule ou en corps denses

dans le cytoplasme contrairement à leur aspect strié dans les autres muscles. Un troisième type de filaments, les filaments intermédiaires, est donc présent et agit comme cytosquelette en reliant toutes les zones denses. Ces filaments, composés des protéines desmine et vimentine, permettent à la cellule de se contracter en une seule unité (172; 314).

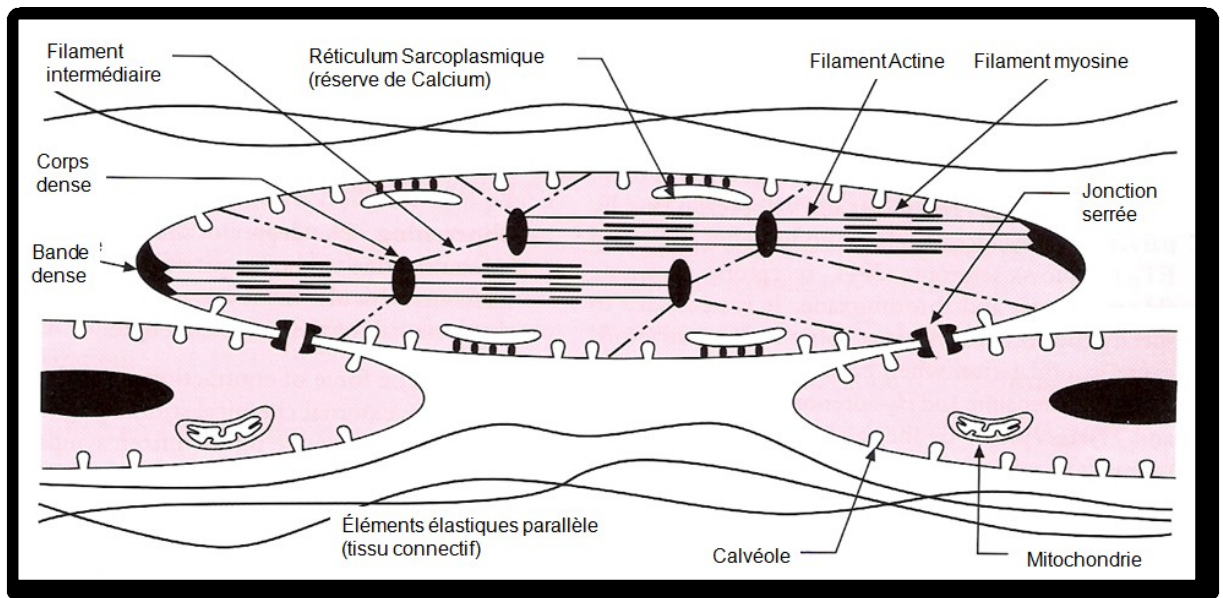


Figure I-7: Structure d'un myocyte vasculaire basée sur la micrographie électronique. Les unités contractiles (filaments d'actine, de myosine et les filaments intermédiaires), les réserves de calcium et les jonctions intercellulaires sont les éléments importants pour la contraction de la cellule. (Traduite de Levick (172))

Les réserves de calcium des VSMC se trouvent dans le réticulum sarcoplasmique (RS). Il ne représente que 1 à 5% du volume cellulaire. Les études de microscopie par électrons ont localisé le RS autant en périphérie de la cellule, près des cavéoles, qu'à l'intérieur de la cellule, près du noyau et des mitochondries. C'est dans la dernière décennie que les rôles du RS dans les muscles lisses ont été élucidés. Parmi les fonctions qui leur sont attribuées, on note : 1) leur contribution à l'homéostasie du calcium en maintenant de faibles concentrations calciques au repos par l'activation des Ca^{+2} -ATPases du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (SERCA; SR/ER Ca^{+2} -ATPase), 2) la restauration de la concentration de calcium intracellulaire et la relaxation suite à une stimulation via l'activation des SERCA, 3) l'augmentation de la contraction par la relâche de

calcium suite à une stimulation par un agoniste, 4) la modification du potentiel membranaire en activant des canaux ioniques sensibles au calcium, 5) leur participation pour une extrusion efficace de calcium à la membrane plasmique, 6) leur contribution à la présence de micro-domaines de signalisation autour de la membrane plasmique et de différents organelles, et 7) leur contribution au développement, au vieillissement et au bon fonctionnement des muscles lisses. Malgré leurs rôles importants, les réserves de calcium sont plutôt petites et les VSMC dépendent également de l'entrée de calcium extracellulaire pour la vasoconstriction (172; 339).

Les cavéoles sont des structures souvent localisées à proximité des RS. Ce sont de petites invaginations de la membrane plasmique qui peuvent augmenter sa surface jusqu'à 75%. Elles sont impliquées dans la régulation de la contractilité de la cellule et dans l'homéostasie du calcium. Les protéines cavéoline-1, -2 et -3 qui sont les principales composantes structurelles des cavéoles. Elles servent d'ancrage pour plusieurs protéines de signalisation telles que la protéine RhoA, la kinase associée à RhoA (ROK; *RhoA associated kinase*) et la PKC- α . Ces protéines sont impliquées dans la sensibilisation au calcium des filaments de myosine des VSMC suite à la liaison d'un agoniste à son récepteur, ce qui favorise la contraction. De plus, plusieurs canaux ioniques (Ca^{+2} -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase, BK_{Ca} , échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, etc.) sont regroupés dans les cavéoles pour favoriser leur localisation à proximité des canaux du RS et pour permettre une réponse plus efficace aux augmentations importantes mais localisées de calcium (« Ca^{+2} spark ») et aux courants transitoires sortants spontanés (STOC; *spontaneous transient outward currents*). On peut donc considérer les cavéoles comme des structures spécialisées de la membrane plasmique impliquées dans l'intégration des signaux contractiles extracellulaires et dans la signalisation des effecteurs intracellulaires (118; 302).

Finalement, pour avoir une uniformité et un synchronisme de contraction entre les VSMC, il existe des jonctions communicantes. Ces jonctions serrées, formées par des protéines connexine, permettent le passage des courants ioniques qui transmettent les changements de potentiel membranaire d'une cellule à l'autre. Cette propagation est toutefois décroissante et se diffuse sur environ 1 mm de l'axe longitudinal du vaisseau. Les petites artères possèdent également des jonctions myoendothéliales pour la transmission de signaux régulateurs et hyperpolarisants des cellules endothéliales aux cellules vasculaires (172).

3.3. LA CONTRACTION

Les vaisseaux sanguins sont caractérisés par une contraction partielle et continue de leurs cellules musculaires que l'on nomme tonus de base. La vasoconstriction est donc une augmentation du tonus de base qui se reflète par la diminution de la lumière du vaisseau sanguin suite à la contraction des VSMC localisées dans la tunique moyenne de sa paroi. Elle permet la régulation du flot sanguin local, mais également le contrôle de la pression artérielle globale. La contraction peut être augmentée par des hormones circulantes (adrénaline, Ang II, vasopressine, etc.), des substances paracrines (endothéline, sérotonine, thromboxane, etc.) ou via la stimulation du système nerveux sympathique qui entraîne la relâche de noradrénaline dans la tunique externe de la paroi vasculaire. Tous ces mécanismes visent à augmenter la concentration de calcium intracellulaire et induire la contraction. La concentration de calcium dans le cytoplasme est contrôlée par la balance de 4 procédés : l'entrée de calcium extracellulaire par les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC; *voltage-dependent calcium channel*) et les canaux calciques dépendants d'un ligand (ROC; *receptor-operated channels*); la relâche de calcium des RS; l'extrusion du calcium à la membrane plasmatique; et la recapture du calcium dans le RS par les pompes Ca^{+2} -ATPase (172).

Lors de la liaison d'un agoniste contractile à son récepteur, la VSMC se contracte en deux phases. Durant la phase initiale on observe une augmentation rapide de la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium se lie à la calmoduline, une protéine régulatrice semblable à la troponine. Le complexe Ca^{+2} -calmoduline active la MLCK qui, elle, phosphoryle la chaîne légère de la myosine. Celles-ci se lient par la suite aux filaments d'actine pour engendrer la contraction de la cellule. Cette contraction est également dépendante de l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie. Dans la deuxième phase de la contraction, la phase soutenue, la concentration de calcium chute, mais demeure au dessus des niveaux de base. Ce sont des mécanismes de sensibilisation au calcium qui prennent la relève. La principale responsable de cette sensibilisation est la kinase associée à la protéine Rho-A (ROK) qui inhibe la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP; *myosin light chain phosphatase*). Cette enzyme entraîne la dissociation de l'actine et de la myosine en déphosphorylant cette dernière. La PKC- α , est également impliquée dans la sensibilisation puisqu'elle active la protéine CPI-17 (*PKC-activated protein phosphatase inhibitor*), qui inactive aussi la MLCP. Finalement, d'autres protéines kinases induisent une phosphorylation de la caldesmone, ce qui réduit ses effets inhibiteurs sur la liaison de l'actine et de la myosine. La

contraction vasculaire est donc régie par les changements de calcium intracellulaire et les changements de sensibilité au calcium (118; 172; 302).

Comme il a été mentionné précédemment, les vaisseaux sanguins maintiennent une contraction constante, c'est-à-dire un tonus de base. Pour être efficace énergétiquement, cette contraction s'effectue sans demander un apport énergétique trop important. En effet, les VSMC sont capables de maintenir une contraction en utilisant que le 1/300^e de l'énergie nécessaire pour une contraction similaire par les muscles striés. Ceci est possible car le cycle de liaison/détachement de la myosine à l'actine se fait beaucoup plus lentement dans les VSMC et la durée de liaison est conséquemment beaucoup plus longue. Ceci crée un état « verrouillé » où la contraction est maintenue avec peu de consommation d'ATP et permet aux VSMC d'éviter la fatigue (172).

3.4. LA RELAXATION

La vasodilatation est la capacité des vaisseaux sanguins d'agrandir leur lumière en diminuant leur tonus de base. Ce phénomène permet d'augmenter le flot sanguin suite à une diminution de la résistance d'un vaisseau. Lorsqu'elle est systémique, la vasodilatation favorise une diminution de la pression artérielle, mais elle peut aussi être d'ordre local et favoriser l'apport sanguin dans un tissu. La relaxation peut être produite par deux voies différentes qui convergent vers la diminution du calcium intracellulaire et la diminution de l'activité des MLCK. La première voie est une vasodilatation induite par une hyperpolarisation qui est causée par l'ouverture des canaux potassiques. Celle-ci entraîne une diminution de la probabilité d'ouverture des VDCC et donc une diminution du calcium intracellulaire et une relaxation. On observe ce phénomène, entre autres, durant l'hypoxie ou durant l'exercice (172).

La deuxième voie est la vasodilatation induite par les nucléotides cycliques (AMPC et GMPc). Ces derniers sont les principaux seconds messagers d'agents vasodilatateurs. L'AMPC est synthétisée à partir de l'ATP intracellulaire lorsqu'un facteur externe (neurotransmetteurs, hormones, drogues,...) se lie à un GPCR couplé à l'adénylate cyclase. La GMPc est, quant à elle, synthétisée par deux types de guanylate cyclases : une guanylyl cyclase membranaire qui peut être activée par les peptides natriurétiques (ANP, BNP, CNP) et une guanylyl cyclase soluble qui est activée par le NO. L'AMPC et la GMPc activent par la suite les protéines kinases A et G (PKA, PKG)

qui phosphorylent les cibles effectrices. Pour l'instant, trois voies sont reconnues pour leurs implications dans la réponse vasodilatatrice des nucléotides cycliques : 1) la diminution des concentrations de calcium intracellulaire par l'activation de la recapture de calcium par le RS, l'augmentation de l'efflux de calcium, l'inhibition de la relâche de calcium des RS ou l'inhibition de l'entrée de calcium extracellulaire; 2) l'hyperpolarisation de la VSMC par l'activation des canaux potassiques; 3) la phosphorylation de la MLCK, ce qui l'inhibe et réduit la sensibilité au calcium, ou l'augmentation de l'activité de la MLCP qui déphosphoryle la myosine. Toutefois, la contribution de chaque voie varie selon le lit vasculaire, l'espèce et le stimulus étudiés et elle est affectée par la compartimentalisation des nucléotides cycliques ainsi que par celle des différentes protéines effectrices. Il est fort probable, par contre, que la réponse dilatatrice est la résultante de l'implication de plusieurs de ces voies (204).

4. LES CANAUX IONIQUES

On retrouve plusieurs canaux et transporteurs ioniques à la membrane plasmique, ainsi qu'à la membrane du réticulum sarcoplasmique des VSMC. Il existe une diversité de populations et de proportions des canaux ioniques qui varient entre les différents types de vaisseaux. Un des facteurs primordiaux dans la régulation de l'ouverture des canaux ioniques est le potentiel de membrane. Celui-ci se situe aux alentours de -50 mV à -60 mV dans les vaisseaux artériels pressurisés. Il est principalement maintenu par l'efflux constant de potassium, mais également par l'efflux de chlore et l'influx de calcium. La balance électrochimique est également conservée par les pompes Na^+/K^+ -ATPase qui gardent la concentration intracellulaire de potassium élevée. Cette polarisation (-50 mV à -60 mV) des VSMC contribue entre autres au tonus de base des vaisseaux sanguins. Une cellule qui possède un potentiel de -50 à -60 mV, comparativement à -90 mV pour les cardiomyocytes, augmente la probabilité d'ouverture des VDCC, puisque certains s'activent entre -60 et -70 mV, et cette petite entrée de calcium tient l'appareil contractile activé pour induire le tonus de base. On constate que le contrôle du potentiel de membrane, dépend de plusieurs canaux ioniques, pompes, échangeurs et co-transporteurs (172). Nous allons donc en étudier quelques-uns plus en détail.

4.1. LES CANAUX CALCIQUES

Le calcium est l'une des molécules de signalisation les plus importantes dans la physiologie. Sa concentration est strictement contrôlée par des mécanismes dynamiques, localisés et temporels. Au repos, la concentration intracellulaire est très basse (~100 nM), mais elle augmente rapidement lors d'une stimulation. Le faible niveau basal est maintenu par l'extrusion du calcium cytosolique via les Ca⁺²-ATPases du RS ou de la membrane plasmique et par les échangeurs Na⁺/Ca⁺². D'autre part, l'entrée de calcium dans la cellule se fait de façon passive par les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC; *voltage-dependent calcium channel*), les canaux dépendants d'un ligand (ROC; *receptor-operated channels*), les canaux opérés par les réserves de calcium (SOC; *store-operated channels*), les canaux cationiques constitutivement actifs (CCC; *constitutively active cation channels*) et les canaux activés par l'étirement (SAC; *stretch-activated channels*) (34; 144; 307).

4.1.1. Les Canaux Calciques Dépendants du Voltage

Les VDCC étaient initialement classés selon leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. On retrouve donc les canaux calciques qui sont activés par un faible voltage (LVA; *low-voltage-activated*) et ceux activés par un fort voltage (HVA; *high-voltage-activated*). Le seuil d'activation des LVA est de -60 à -70 mV (342) et ils incluent les canaux de type T nommé ainsi à cause de leur conductance de faible amplitude et de leur inactivation rapide (T pour « *tiny and transient* ») (164). Les canaux HVA sont activés à un seuil de -40 à -10 mV (342). Ils englobent les canaux de types L, N, P/Q et R. Les canaux de type L portent leur nom à cause de la conductance de large amplitude et de leur cinétique d'inactivation lente (L pour « *large and long-lasting* »). Ils sont largement exprimés dans les muscles lisses, cardiaques et squelettiques ainsi que dans les neurones. Ils sont aussi reconnus pour leur sensibilité aux dihydropyridines, aux phénylalkylamines et aux benzothiazépines, tandis que les autres HVA y sont insensibles. Les canaux de type N, initialement découvert dans les neurones (N pour « *neuronal* » ou « *Neither L nor T* »), se distinguent par leur dépendance au voltage et leur vitesse d'inactivation intermédiaire (plus négative et plus rapide que le type L mais plus positive et plus lente que le type T). Ils ont par la suite été divisés en plusieurs groupes selon leur sensibilité aux toxines d'escargots et

d'araignées. Le type N est sensible au peptide ω -conotoxin GVIA, tandis que les types P (initialement découvert dans les neurones de Purkinje) et Q sont inhibés par la toxine ω -agatoxin IVA, mais avec une affinité différente. Finalement, les canaux résistant aux toxines sont nommés type R (R pour résistant) (43; 164; 299). Avec le clonage du gène des sous-types de canaux calciques, une nouvelle nomenclature est utilisée. Ils sont également identifiés en fonction de la sous-unité $\alpha 1$ qui les compose. Les canaux de type L appartiennent donc à la classe $Ca_v1.x$ qui contient 4 membres (1 à 4). Les canaux de type N appartiennent au groupe des $Ca_v2.x$ incluant 3 membres (1 à 3) et finalement les canaux de type T sont encodés par les gènes $Ca_v3.x$ qui sont également 3 membres (1 à 3) (43; 164; 307).

4.1.1.1. La Structure

Les différents types de VDCC ont une structure moléculaire similaire et ce sont les différents isoformes des sous-unités qui les différencient. Ce sont des complexes protéiques formés de 5 sous-unités nommées $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ et γ (Fig. I-8A). Les canaux HVA sont composés des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ et dans certains tissus de γ , tandis que les canaux de type T semblent uniquement constitué de $\alpha 1$ (34; 299). À ce jour, 10 gènes, et autant d'isoformes, encodant la sous-unité $\alpha 1$ ont été identifiés (Ca_v). Cette sous-unité est une protéine transmembranaire de 190 à 250 kDa qui forme le pore du canal. Elle est formée de 4 domaines homologues reliés par des boucles cytoplasmiques. Chaque domaine est composé de 6 segments transmembranaires (S1-S6) et d'une boucle formant le pore entre S5 et S6 (Fig. I-8B). La région du pore est responsable de la sélectivité du canal pour les ions calcium. Le segment S4 est, quant à lui, composé d'acides aminés chargés positivement qui permettent de contrôler l'ouverture du canal de façon dépendante du voltage. Finalement, la sous-unité $\alpha 1$ contient des sites d'interactions avec les sous-unités auxiliaires, les activateurs et les bloqueurs des VDCC (34; 43; 164; 299; 342). La sous-unité β est une protéine intracellulaire de 54 kDa (Fig. I-8A). Elle est encodée par 4 gènes et chaque isoforme possède de multiples variants provenant de l'épissage alternatif. La sous-unité β joue un rôle crucial dans la translocation du canal à la membrane plasmique. Elle influence également la dépendance au voltage et la cinétique d'activation et d'inactivation du canal. Finalement, elle affecte la modulation du canal par sa liaison à d'autres protéines et molécules de signalisation et influence les interactions avec les inhibiteurs pharmacologiques (34; 164). Les sous-unités $\alpha 2$ et δ sont encodés par le même gène. Ils forment une protéine abondamment glycosylée qui est clivée de façon post-transcriptionnelle pour former les protéines $\alpha 2$ et δ liées par des ponts disulfures. Il

existe 4 sous-unités $\alpha\delta$ qui possèdent toutes des variants résultant de l'épissage alternatif (34; 164). On croyait initialement que la sous-unité δ était transmembranaire, mais il semblerait qu'elle est attachée à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol et qu'elle maintient ainsi la sous-unité $\alpha 2$ en place du côté extracellulaire (Fig. I-8A) (34). Les sous-unités $\alpha\delta$ peuvent modifier les propriétés biophysiques des VDCC mais leur rôle principal est d'augmenter le courant de calcium en favorisant la translocation du canal à la membrane. Elles pourraient également influencer la liaison des bloqueurs de VDCC (34; 164). En dernier lieu, il existe 8 gènes différents pour la sous-unité γ qui encodent tous des protéines à 4 segments transmembranaires avec des domaines N- et C-terminaux intracellulaires. Il a été démontré que les sous-unités γ ont différents effets sur l'activité des VDCC, mais l'effet le plus constant est une petite réduction du courant. Toutefois, les sous-unités γ ne sont pas uniquement responsables de la régulation des VDCC, elles possèdent plusieurs fonctions biologiques (34; 164).

4.1.1.2. La Régulation

Dans les VSMC on retrouve principalement des canaux calciques de type L et de type T (61; 144). Les VDCC de type L sont majoritairement responsables de l'entrée de calcium pour la contraction vasculaire. Le rôle des canaux de type T est plus ambigu. Ils ne contribueraient pas de façon significative à la vasoconstriction artérielle, à l'exception de la microcirculation rénale. Par contre, ils pourraient contribuer au phénomène d'oscillations calciques dans certaines artères et veines et agir comme « pacemaker ». On leur attribue toutefois un rôle dans la prolifération normale et pathologique des VSMC (61). On remarque également des différences dans la régulation des deux types de canaux. Les VDCC de type T sont activés et inactivés uniquement par le voltage, tandis que l'activité du type L est influencée par le voltage et les concentrations de

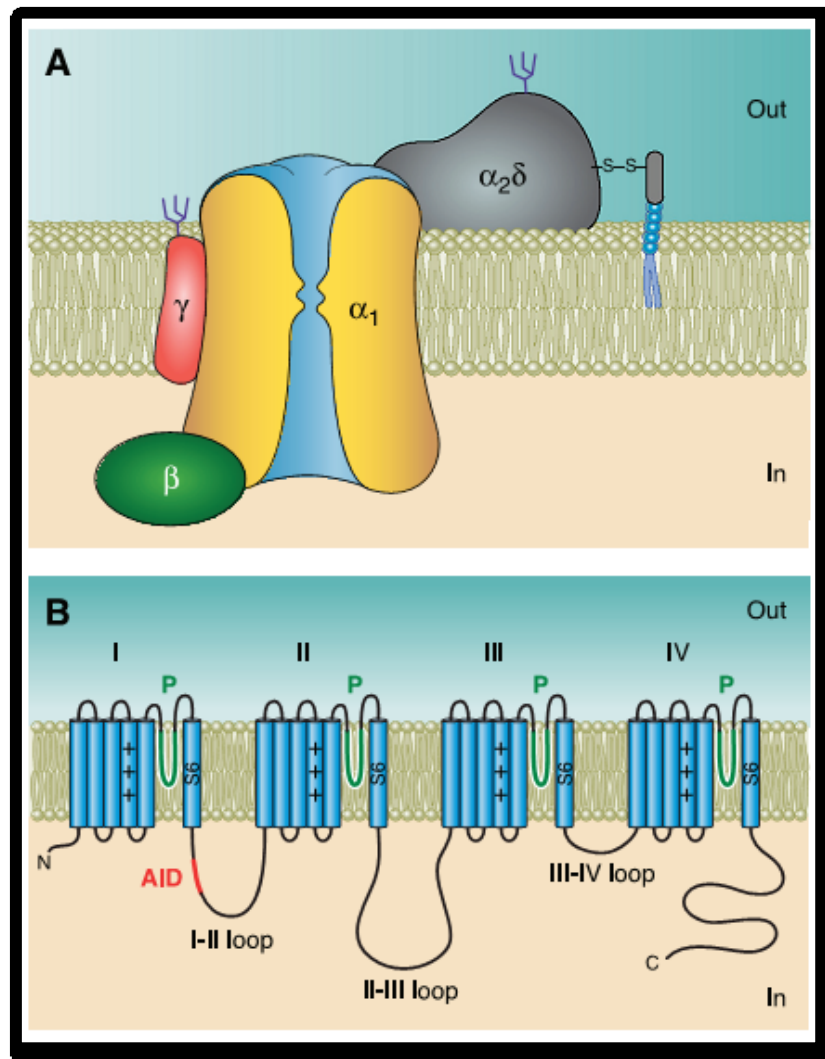


Figure I-8: Structure moléculaire d'un canal calcique dépendant du voltage (VDCC). A : Représentation des différentes sous-unités du canal, B : Représentation schématique des segments transmembranaires de la sous-unité α . (Adaptée de Bureai (34))

calcium intracellulaire (43; 164; 299). On retrouve les VDCC sous trois conformations : soit fermés, ouverts ou inactifs. L'état fermé est prédominant dans les cellules polarisées et implique que le canal est disposé à l'ouverture. Lorsque la cellule est dépolarisée, le canal passe à l'état ouvert pour laisser entrer le calcium puis, après une dépolarisation prolongée, celui-ci passe à l'état inactif. L'état inactif implique que le canal ne laisse plus passer de calcium, mais également qu'il ne peut pas être activé par une autre dépolarisation. Cela prévient le déséquilibre du gradient de calcium et assure la précision spatiale et temporelle des signaux calciques en réponse à la dépolarisation membranaire. C'est aussi un mécanisme important pour prévenir l'accumulation cytotoxique de calcium intracellulaire (299). L'inactivation des VDCC de type L se fait en deux

temps : une inactivation rapide dépendante du calcium et une plus lente dépendante du voltage (164). Cette inactivation s'opère suite à des changements conformationnels similaires à ceux observés dans les autres types de canaux ioniques (sodium et potassium). Stotz et al. (299) proposent qu'en réponse à une dépolarisation, les segments S6 subissent un changement conformationnel permettant à la boucle qui lie les domaines I-II de s'amarrer à la base des S6, occluant ainsi le canal. Ce changement est toutefois contrôlé par plusieurs mécanismes, incluant la liaison aux protéines régulatrices et particulièrement celle de la sous-unité β qui se lie à la boucle de liaison des domaines I-II et qui retarderait l'inactivation (299). De plus, la phosphorylation de domaines intracellulaires ou la liaison par des molécules de signalisation, telles que le complexe calcium-calmoduline qui lit le domaine C-terminal, influence l'activité des VDCC (43; 164; 299). Finalement, certains bloqueurs des VDCC ont plus d'affinité pour les canaux en état inactif (299). Nous allons donc les décrire de façon plus approfondie dans la prochaine section.

4.1.1.3. Les Bloqueurs

Une percée dans le traitement des maladies cardiovasculaire fût la découverte des antagonistes des VDCC. C'est Fleckenstein, Godfraind et leurs collègues, en 1960, qui ont introduit le concept que certaines drogues pouvaient altérer la contraction des muscles cardiaques et lisses en bloquant l'entrée de calcium (148). Les principaux antagonistes des VDCC sont des bloqueurs de canaux organiques divisés en trois classes : les dihydropyridines (DHP) tels que la nifédipine, les phénylalkylamines (PAA) tels que le vérapamil et les benzothiazépines (BTZ) tels que le diltiazem. Tous les bloqueurs de VDCC se lient à la sous-unité α_1 du canal. Les PAA s'associent au S6 du domaine IV, tandis que les BTZ reconnaissent un site de liaison sur la boucle cytoplasmique entre les domaines III et IV, et finalement, les DHP s'attachent aux segments transmembranaires S6 des domaines III et IV. Bien que les trois bloqueurs lient des sites différents, ils peuvent toutefois être joints allostériquement et leur liaison est stéréospécifique et réversible (148). De plus, il est suggéré que la co-expression des sous-unités β , $\alpha_2\delta$ et γ est requise pour une liaison de haute affinité des DHP sur le canal (164). Les trois types d'antagonistes ont des effets fonctionnels différents. Par exemple, les DHP sont des vasodilatateurs plus puissants que les PAA et les BTZ. De plus, leur sélectivité pour les VDCC vasculaires varie (250). Cette caractéristique a poussé le développement d'antagonistes des VDCC de 2^e et 3^e génération. En effet, lorsque les antagonistes sont donnés en clinique, leur action sur le cœur peut avoir des conséquences néfastes en plus d'observer un effet hypotenseur bénéfique sur les vaisseaux (250; 271). Les nouvelles générations

ont donc une plus grande durée d'action et une plus grande sélectivité pour les VDCC exprimés dans les vaisseaux (271). De plus, on rapporte que certains composés de la 3^e génération pourrait inhiber les canaux de type T en plus des type L (250). Ceci permettrait de mieux caractériser les canaux de type T puisqu'il n'existe aucun bloqueur spécifique pour ceux-ci. Le mibéfradil, un dérivé tétralol, est souvent utilisé pour caractériser les canaux de type T, mais il a été démontré qu'il pouvait agir sur d'autres VDCC (61), ce qui rend l'étude de ce dernier difficile et explique les résultats parfois ambigus que l'on observe dans la littérature. Les DHP, tels que la nifédipine, restent toutefois de bons agents pharmacologiques contre l'hypertension et lorsqu'ils sont administrés *in vivo*, ils diminuent la résistance et la pression artérielle, améliore la contractilité et la fonction ventriculaire, et n'amène que de faibles augmentations du débit et du rythme cardiaque (148). Lorsque la nifédipine est utilisée *in vitro*, elle permet de caractériser l'activité des VDCC dans différents lits vasculaires (14; 215; 250; 257; 294). C'est le composé que nous avons choisi d'utiliser dans la présente étude sur l'aorte et nous nous sommes basés sur des études réalisées précédemment dans le laboratoire pour déterminer les concentrations à utiliser (14; 257).

Dans le domaine obstétrical, la nifédipine est utilisée pour prévenir l'accouchement prématuré ou pour traiter l'hypertension gestationnelle (56; 227; 317; 334), bien que son usage chez la femme enceinte ne soit pas légalement reconnu dans plusieurs pays (317). Le manque de données adéquates sur les effets fœtaux laisse un doute quant à l'innocuité de ce médicament durant la grossesse. Des effets tératogènes ont été démontrés chez les animaux, mais aucun cas de malformation n'a été rapporté chez l'humain (317; 334). Pour certaines pathologies, le ratio risques/bénéfices est donc favorable pour l'utilisation de la nifédipine durant la grossesse (227; 334). Chez des femmes gravides normotensives, où la résistance vasculaire est déjà diminuée, la nifédipine induit une diminution de la résistance vasculaire totale qui est toutefois masquée par la pression artérielle qui reste constante en raison d'une augmentation du rythme cardiaque et du volume d'éjection. La femme enceinte semble donc avoir une réserve lui permettant de contrôler le flot sanguin lors d'une plus grande diminution de la résistance vasculaire. Par contre, bien que la nifédipine traverse le placenta, aucune modification dans la circulation fœto-placentaire n'est observée. Cela indique que lors d'une grossesse normotensive avec une placentation adéquate, la résistance de la circulation utéroplacentaire est diminuée au point où la nifédipine ne peut la réduire davantage malgré qu'elle diminue la résistance systémique (56). La sélectivité des inhibiteurs pour les différents VDCC et les différents lits artériels est donc importante et influence la réponse aux antagonistes dans des conditions physiologiques et pathologiques spécifiques.

4.1.2. Les Canaux Calciques Indépendants du Voltage

Comme mentionné précédemment, la régulation des concentrations intracellulaires de calcium est essentielle pour les mécanismes de contraction des VSMC. Bien que les VDCC soient en grande partie responsables de l'entrée du calcium extracellulaire, plusieurs autres canaux sont impliqués dans le contrôle du calcium. On retrouve les ROC qui sont activés par des vasoconstricteurs tels la noradrénaline (6; 166; 193; 307; 341), les SOC qui sont activés par la déplétion des réserves internes de calcium (6; 193; 307; 339; 341), les CCC qui contribuent au potentiel membranaire de repos et à l'influx basal de calcium (6; 307), et les SAC qui contribuent à la vasoconstriction myogénique (6; 307; 333).

L'étude de ces canaux dans les VSMC est difficile compte tenu du grand nombre de courants ioniques et du manque d'agents pharmacologiques spécifiques pour les caractériser (204). Ces canaux sont formés de protéines de la famille TRPC (*transient receptor potential-canonical*), protéines à 6 domaines transmembranaires avec un pore entre les domaines 5 et 6, et dont les domaines N- et C-terminaux sont du côté cytoplasmique (6; 326). À ce jour, sept membres dans cette famille ont été identifiés (TRPC1 à TRPC7), mais le rôle précis de chacun d'entre eux n'est pas encore complètement déterminé et il est un sujet de débat dans la littérature (6; 193; 326).

Finalement, la pompe Ca^{+2} -ATPase est également essentielle au contrôle du calcium intracellulaire puisqu'elle le retire du cytosol en le relâchant du côté extracellulaire (via les PMCA; *plasma membrane Ca⁺²-ATPase*) ou vers l'intérieur des organelles qui composent les réserves intracellulaires (via les SERCA). Les PMCA utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour la sortie d'un Ca^{+2} et l'entrée de 2 H^+ contre le gradient électrochimique de la membrane plasmique. Il existe plusieurs isoformes encodés par des gènes distincts qui peuvent subir de l'épissage alternatif, PMCA1b étant l'isoforme le plus exprimé dans les VSMC. Le domaine C-terminal des PMCA contient des sites de liaison à la calmoduline ainsi que des sites de phosphorylations pour des protéines kinases telles que PKA, PKC et PKG. Ces protéines sont donc très importantes dans la régulation de la pompe. Toutefois, le manque d'inhibiteurs sélectifs pour les PMCA rend la détermination de sa contribution dans le retrait du calcium plus difficile. À l'opposé, les SERCA sont bien caractérisés grâce à des inhibiteurs comme la thapsigargin et l'acide cyclopiazonique. Les

SERCA transportent 2 Ca^{+2} pour chaque ATP hydrolysé. Ils sont encodés par 3 gènes en plus de variants de l'épissage alternatif. L'isoforme prédominant dans les muscles lisses est SERCA2. L'activité de ces protéines est contrôlée par des interactions avec des protéines auxiliaires, particulièrement le phospholamban, les concentrations de calcium ainsi que le pH (307; 339). C'est deux pompes essentielles pour le retrait du calcium cytoplasmique semblent fonctionner en série ou en parallèle avec l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ pour maintenir un contrôle précis des concentrations de calcium intracellulaire (307). Il est clair que la régulation des concentrations de calcium via les différents canaux et pompes est essentielle dans le contrôle de la contraction, de la relaxation vasculaire et de la signalisation entourant les échanges calciques dans les VSMC. Elle nécessite toutefois encore beaucoup d'éclaircissements.

4.2. LES CANAUX POTASSIQUES

Les myocytes vasculaires expriment environ 50 000 canaux K^+ parmi lesquels une fraction est ouverte à tout moment (172). Leur activité est donc primordiale dans le contrôle du potentiel de membrane. Les variations de potentiel membranaire sont responsables de l'ouverture et de la fermeture des canaux ioniques qui contrôle l'entrée de calcium extracellulaire et la relâche de calcium intracellulaire, par conséquent la force contractile des cellules musculaires lisses. L'activité des canaux K^+ est donc directement liée au tonus contractile des cellules et donc à la régulation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle (133; 296). Les cellules des muscles lisses vasculaires expriment quatre types de canaux potassiques que nous allons voir plus en détails.

4.2.1. Les Canaux Potassiques Activés par le Voltage (Kv)

Les Kv font partie de la grande famille des canaux qui dépendent du voltage. Ils sont composés de tétramère de sous-unités α qui forment un pore. Chacune des sous-unités α comprend six segments transmembranaires (S1-S6) avec un segment S4 sensible au voltage et des domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques (Fig. I-9) (152; 296). Jusqu'à présent, plus de 30 gènes encodant des membres de la famille Kv ont été identifiées et leur expression varie en fonction du tissu où ils sont exprimés (152). De plus, les sous-unités α sont jumelées à des sous-unités β pour

former un canal fonctionnel et bien contrôlé. En effet, la sous-unité β influence les propriétés biophysiques du canal ainsi que son transport intracellulaire à la membrane (296; 307). Les Kv sont stimulés par la dépolarisation de la membrane à un potentiel seuil d'environ -30 mV pour une activation optimale (132). Ils sont inhibés par une dépolarisation soutenue, mais sont classés en deux groupes selon leur vitesse d'inactivation : les canaux « delayed rectifier » qui sont inactivés très lentement et ne montrent pas d'inactivation pendant 250 ms de dépolarisation, produisant un courant sortant de K^+ soutenu; et les courants de type A qui sont inactivés rapidement, en moins de 100 ms, ce qui occasionne des courants transitoires (296; 307). Les Kv participent à la régulation du potentiel de repos et au maintien du tonus vasculaire en limitant la dépolarisation et l'entrée de calcium (152; 307). Ils sont aussi impliqués dans la réponse aux vasoconstricteurs et aux vasodilatateurs : les vasodilatateurs qui agissent via la voie de signalisation de l'AMPc, ouvrent ces canaux (132; 204), tandis que les vasoconstricteurs les ferment par des mécanismes qui impliquent une augmentation du calcium intracellulaire (58; 132) et la PKC (4; 132). Ces canaux peuvent également être inhibés par des agents pharmacologiques tels le 4-aminopyridine, le correolide et l'agitotoxin-2 (132; 133; 152).

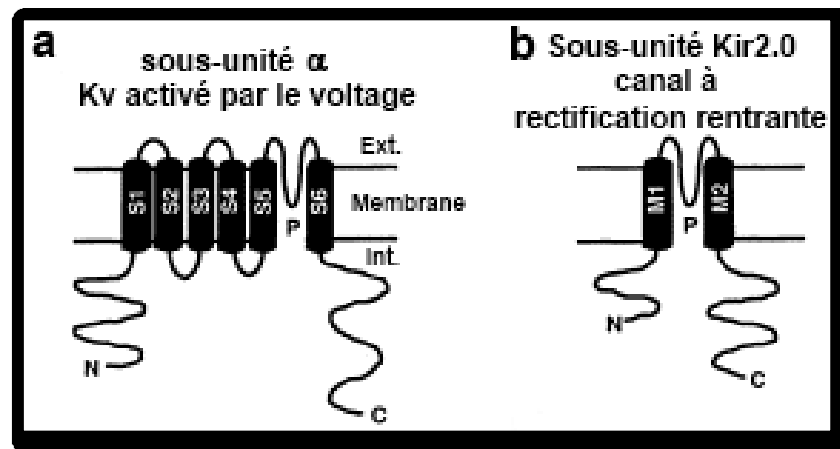


Figure I-9 : Topologie transmembranaire proposée pour les sous-unités formant les pores des canaux potassiques dans les muscles lisses. a) Canaux activés par le voltage (Kv), b) Canaux à rectification entrante (K_{IR}). (Traduite et Adaptée de Standen et Quayle (296))

4.2.2. Les Canaux à Rectification Rentrante (K_{IR})

Les canaux K_{IR} conduisent les courants potassiques vers l'intérieur de la cellule beaucoup plus facilement que vers l'extérieur puisqu'ils sont activés par une hyperpolarisation plutôt qu'une dépolarisation (204). De plus, les courants sortants sont seulement de l'ordre de quelques picoampères, possiblement à cause de l'effet inhibiteur des ions Mg^{+2} intracellulaires et des polyamines intracellulaires qui agissent comme bloqueurs des courants sortants (152; 296). Les K_{IR} sont des tétramères et leurs sous-unités ne possèdent que deux segments transmembranaires (S5 et S6) (Fig. I-9). Ceux-ci sont encodés par les gènes de la famille Kir et l'isoforme exprimé dans les muscles lisses est le K_{IR} 2.1 (152; 296; 307). La présence de courants entrants n'a toutefois été décrite que dans les muscles lisses des artères et artérioles. La densité des K_{IR} diminue avec l'augmentation de la grosseur des vaisseaux jusqu'à être absents des gros vaisseaux de conductance (296; 307). La détermination de la fonction exacte des K_{IR} dans les VSMC est toujours incomplète, mais ils contribuent à maintenir le potentiel membranaire de repos et leur activation lors d'une augmentation des concentrations extracellulaires de potassium (jusqu'à 15mM) entraîne une vasodilatation. En effet, une augmentation modérée de K^+ extracellulaire (comme celle qui se produit durant une hypoxie, une ischémie ou une hypoglycémie) cause une hyperpolarisation et une vasodilatation (152; 307). Les K_{IR} , comme d'autres canaux potassiques, peuvent être modulés par différents vasodilatateurs (adénosine, bradykinine, NO, ...) et la voie de signalisation AMPc/PKA a été impliquée dans la vasodilatation induite par K_{IR} (204). Les courants K_{IR} peuvent également être bloqués par l'ion Ba^{+2} de façon voltage-dépendante et de manière spécifique à des concentrations en dessous de 50 μM . Finalement, le Cs^+ , qui agit du côté extracellulaire, inhibe également les K_{IR} (152).

4.2.3. Les Canaux Potassiques Activés par le Calcium (BK_{Ca})

4.2.3.1. La Structure

Les canaux potassiques prédominants dans les cellules des muscles lisses vasculaires sont ceux de large conductance (Big), BK_{Ca} , qui ont une conductance d'environ 200 à 250 pS (133; 152; 307). Un canal BK_{Ca} fonctionnel (Fig. I-10) est composé d'un tétramère de sous-unités α qui forment le pore du canal. La sous-unité α est encodée par un seul gène (Slo1), mais il existe

plusieurs variants d'épissage alternatif qui possèdent différentes propriétés. La protéine est composée de 7 segments transmembranaires (S0-S6) et d'une boucle entre les segments S5 et S6 qui forme le pore et assure un filtre de sélectivité pour les ions K^+ . Les segments S1-S4 sont regroupés pour former une unité sensible au voltage. De plus, le segment S0 et le domaine N-terminal extracellulaire sont essentiels pour la liaison de la sous-unité β . Finalement, le domaine C-terminal confère la sensibilité au calcium grâce aux deux domaines qui contrôlent la conductance au K^+ (RCK; *regulator of conductance for K^+*). De plus, le domaine RCK-2 contient un domaine « Ca^{2+} bowl » important pour la sensibilité au calcium du canal. Lorsque le tétramère de sous-unités α est formé, il se crée un octamère avec les domaines RCK qui forment un anneau intracellulaire (*gating ring*). Lorsque le Ca^{2+} s'y lie, il déclenche l'ouverture du canal par un mécanisme de couplage allostérique (125; 152; 168; 340).

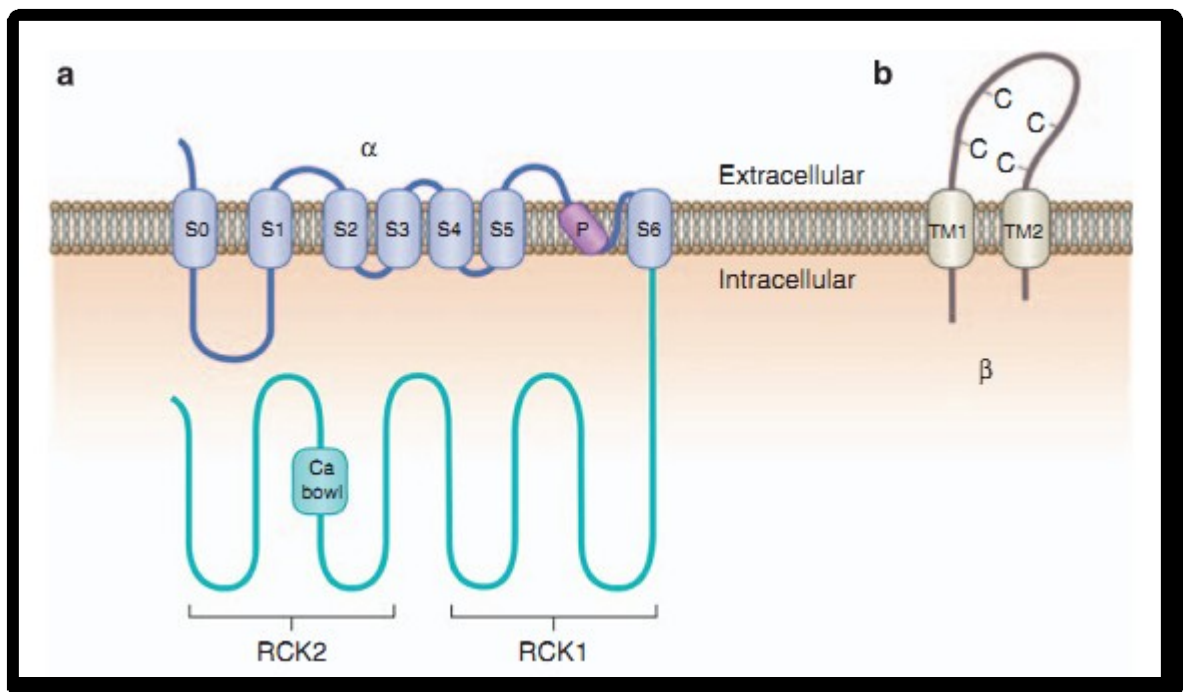


Figure I-10: Structure des sous-unités α (a) et β (b) des canaux potassiques activés par le calcium (BK_{Ca}). (Tirée de Wu et Marx (340))

Le canal BK_{Ca} s'associe à la sous-unité régulatrice β dans un ratio 1 :1 avec la sous-unité α . Il existe 4 isoformes β , encodés par 4 gènes, et ils sont exprimés dans des tissus spécifiques où ils ont leur propre effet régulateur sur le canal. Dans les VSMC, on retrouve principalement la sous-unité β 1. Cette protéine est constituée de 2 segments transmembranaires avec des domaines N- et C-terminaux intracellulaires et une longue boucle extracellulaire (Fig. I-10). Cette dernière confère une résistance variable aux bloqueurs du canal tandis que les domaines intracellulaires attribuent une variété d'effets électrophysiologiques. Les principales fonctions de β 1 sont d'augmenter la sensibilité au calcium du canal pour en stimuler l'ouverture et de favoriser le transport à la membrane des sous-unités α (125; 133; 152; 307; 340).

4.2.3.2. La Régulation

Les canaux BK_{Ca} sont activés par la dépolarisation de la membrane et par l'augmentation de calcium intracellulaire (125; 133; 168; 172; 307; 340). Ils modulent la contraction des VSMC en agissant comme mécanisme de rétrocontrôle négatif sur le potentiel membranaire. En effet, ils jouent un rôle important dans la régulation du tonus myogène et le contrôle des vasoconstrictions induites par des agents constricteurs et par la pression d'étirement. Lors d'une dépolarisation, le calcium entre par l'ouverture des VDCC et par la relâche des RS et provoque une contraction. Cette entrée de calcium active également les BK_{Ca}, ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane et entraîne la fermeture des VDCC (125; 168; 307; 340). De plus, la localisation des BK_{Ca} influence également sa réponse. En effet, le rapprochement entre les RS et les cavéoles dans les VSMC facilite l'ouverture des BK_{Ca} puisque ceux-ci s'y localisent grâce aux deux domaines de liaison pour la cavéoline des sous-unités α (125; 339). La libération de calcium des RS par les récepteurs de ryanodine (RyR; *ryanodine receptor*) à proximité des membranes plasmiques où se situent les canaux, se fait rapidement et génère une augmentation de calcium importante, mais localisée (« Ca⁺² sparks »). Dans les VSMC, ces « Ca⁺² sparks » entraînent l'activation des BK_{Ca} qui résulte en un efflux de K⁺ nommé courants sortants transitoires et spontanés (STOC; *spontaneous transient outward currents*). Par ce mécanisme, les BK_{Ca} agissent comme un bloqueur endogène des VDCC en hyperpolarisant la cellule et en limitant la contraction (125; 168; 340).

La probabilité d'ouverture des BK_{Ca} peut également être affectée par une phosphorylation via diverses kinases, ce qui entraîne des modulations de leur sensibilité au voltage et au calcium. Dans la majorité des cas, PKA et PKG activent les BK_{Ca} en augmentant leur probabilité d'ouverture,

tandis que PKC et c-Src semblent les inhiber, bien que les données dans la littérature sont controversées (125; 168; 204; 307; 340). Ces canaux sont également modulés par plusieurs petites molécules telles que les stéroïdes, les acides gras, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate et les ROS. Dans le cas des hormones stéroïdiennes, une modulation par les voies génomiques et non-génomiques a été identifiée (125). Finalement, les composantes du SRAA influencent également l'activité et l'expression des BK_{Ca} dans les VSMC (340). Par exemple, chez des souris surexprimant de l'aldostérone synthase, une diminution de l'expression de BK_{Ca} dans les artères coronaires se traduit par une altération de la relaxation des anneaux vasculaires. De plus, sur des VSMC d'aorte de rats en culture, l'aldostérone induit une diminution de l'expression de BK_{Ca} qui est dépendante de la dose et qui est bloquée par le spironolactone (8). De son côté, l'Ang II a un effet complexe sur le BK_{Ca} en fonction du tissu où elle agit. Toutefois, au niveau des vaisseaux sanguins, l'Ang II induit une diminution de l'expression de la sous-unité β 1 (340).

4.2.3.3. Les Activateurs/Bloqueurs

Plusieurs agents pharmacologiques modulent l'activité des BK_{Ca}. Comme les BK_{Ca} jouent un rôle important dans plusieurs conditions pathophysiologiques, ce canal est considéré comme une cible prometteuse pour de nouveaux médicaments. Toutefois, après plus de 10 ans de recherche autant dans le milieu académique que le milieu industriel, aucun modulateurs des canaux BK_{Ca} n'a été approuvé pour un usage clinique (213). Les différents modulateurs sont néanmoins de bons outils pharmacologiques pour étudier les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des canaux BK_{Ca} dans plusieurs conditions physiologiques (105; 168).

Parmi les bloqueurs on retrouve des toxines de scorpions telles que la charybdotoxine et l'ibériotoxine et des composés d'ammonium quaternaire tels que le tétraéthylammonium (TEA) (105; 106; 152; 165; 168; 173). Ces molécules inhibent le canal en bloquant son pore du côté extracellulaire avec des valeurs de IC₅₀ (concentration requise pour induire 50% de l'inhibition) de ~10 nM, <10 nM et 200 μ M, respectivement (152). Cependant, seul l'ibériotoxine est spécifique pour les BK_{Ca}, tandis que la charybdotoxine et le TEA peuvent également bloquer d'autres canaux potassiques (105; 106; 152). Quatre résidus de la boucle extracellulaire de la sous-unité β 1, à proximité du vestibule externe de la sous-unité α , sont essentiels pour créer un site de liaison de haute affinité avec la charybdotoxine (117). La sensibilité aux toxines de scorpion dépend donc de l'isoforme de la sous-unité β qui est associée à la sous-unité α et qui peut être spécifique à un tissu

(105; 340). Des composés non peptidiques tels que les toxines fongiques paxilline, penitrem A, et paspalinine ainsi que d'autres alcaloïdes comme le tetrandrine peuvent également agir comme bloqueurs des BK_{Ca} (105; 168). Finalement, de nouveaux composés sont développés et ont un bon potentiel pour devenir des outils pharmacologiques qui permettront de déterminer les rôles physiologiques des multiples sous-types de BK_{Ca} dans différents tissus et organismes (105). Parmi ceux-ci, le BmP09, une toxine à longue chaîne purifiée du venin du scorpion asiatique *Buthus martensi Karsch*, qui bloque sélectivement les courants BK sans affecter la conductibilité de canal unique (344), et le Slotoxin, purifiée du venin du scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*, qui bloque la sous-unité α des BK_{Ca} des mammifères et qui distingue plus efficacement que l'ibériotoxine la sous-unité α des complexes $\alpha+\beta 1$ et $\alpha+\beta 4$ (99).

Des activateurs des canaux BK_{Ca} sont également disponibles. On retrouve une grande série de dérivés synthétiques des benzimidazolone tels que le NS004 et le NS-1619, des amines biaryles tels que les acides mefenamique et flufenamique, des biarylurées tels que le NS1609, des amines pyridyles et des modulateurs naturels comme la dihydrosoyasaponine-1 et les flavonoïdes (105; 152; 168). Le NS004 et le NS-1619, reconnus pour être les pionniers parmi les activateurs, sont sélectifs pour la sous-unité α . De plus, leur effet est accentué par les niveaux de calcium intracellulaire (105). Les effets spécifiques du NS-1619 sur les canaux BK_{Ca} sont observés pour la première fois dans des cellules des muscles lisses de l'aorte où il cause une hyperpolarisation de ces cellules (223). Il est également reconnu que plusieurs composés endogènes activent les BK_{Ca} de façon non sélective, i.e. que l'activation des canaux n'est pas leur principale fonction. Parmi ces substances, on retrouve plusieurs vasodilatateurs comme le NO, le monoxyde de carbone, le 17 β -œstradiol, la testostérone et les époxydes de l'acide arachidonique (105; 133; 152; 168). Plusieurs modes d'action expliquent les effets des activateurs des canaux BK_{Ca}. Ils modulent le site de liaison au calcium de la région C-terminale de la sous-unité α , ils renforcent la liaison entre les sous-unités α et β ou ils imitent l'interaction de la sous-unité β à son site de liaison sur la sous-unité α (105).

Dans la présente étude, le TEA et le NS-1619 sont utilisés pour caractériser l'activité des canaux potassiques dans les aortes de nos différents groupes d'animaux. Les concentrations utilisées sont basées sur des études réalisées préalablement dans le laboratoire, où elles parvenaient à modifier la réactivité vasculaire d'anneaux aortiques à des agents vasoconstricteurs tels que la phényléphrine et le KCl (14; 37).

4.2.4. Les Canaux Sensibles à l'ATP (K_{ATP})

4.2.4.1. La Structure

Les canaux K_{ATP} sont des hétéro-octamères composés de quatre sous-unités Kir 6 et de 4 sous-unités SUR (30; 92; 133; 152; 304; 307). Deux isoformes de Kir, appartenant à la famille des canaux à rectification rentrante, sont identifiés comme appartenant aux canaux K_{ATP} et sont encodés par deux gènes distincts, *KCNJ8* (Kir 6.1) et *KCNJ11* (Kir 6.2). De plus, on différencie ces deux canaux par leur conductance qui est d'environ 35 pS pour Kir 6.1 et d'environ 70 à 80 pS pour Kir 6.2. Ces sous-unités sont composées de deux domaines transmembranaires, avec une boucle les reliant qui forme le pore et qui confère la sélectivité pour les ions K^+ , ainsi que de domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques. Ces derniers se replient pour former un site de liaison à l'ATP, qui inhibe le canal, pour un total de quatre ATP par canal. Finalement, la région N-terminale contient une hélice qui se lie à la région cytoplasmique du pore et qui agit comme lien physique entre la liaison de l'ATP et la barrière du canal pour moduler son ouverture (Fig. I-11) (92; 304).

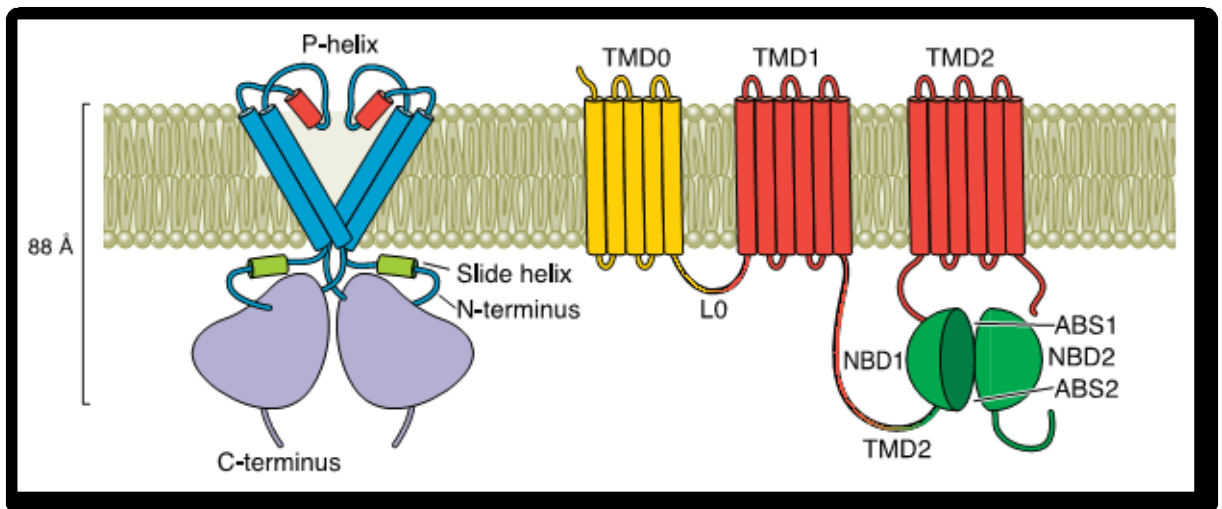


Figure I-11: Structures des sous-unités Kir6 (à gauche) et SUR (à droite) qui composent les Canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}). (Tirée de Flagg et al. (92))

Chaque sous-unité Kir est associée à une protéine régulatrice de type récepteur sulphonyluré (SUR). Cette protéine appartient à la famille de protéines membranaires qui possèdent une cassette de liaison à l'ATP (ABC; *ATP binding cassette*). Les membres formant les

K_{ATP} sont encodés par deux gènes, ABCC8 (SUR1) et ABCC9 (SUR2). De plus, de l'épissage alternatif dans l'exon 38 génère deux types de SUR2, soit SUR2A et SUR2B. Chaque sous-unité SUR est composée de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) à 6 segments qui, contrairement à ceux des autres protéines ABC, ne possèdent pas de fonction de transport à la membrane (Fig. I-11). On retrouve plutôt dans les domaines cytoplasmiques de Kir et SUR, un domaine de rétention au réticulum endoplasmique qui empêche leur translocation à la membrane si les deux sous-unités ne sont pas présentes. On retrouve également du côté N-terminal, un autre domaine transmembranaire (TMD0) avec une boucle de liaison cytoplasmique qui le lie à TMD1 (Fig. I-11). Ces deux régions semblent primordiales pour la liaison à la sous-unité Kir et sa régulation. Finalement, les protéines SUR possèdent de larges domaines cytoplasmiques qui ont des replis pour la liaison des nucléotides (NBF; *nucleotide binding fold*) (92; 304) (Fig. I-11). Ces domaines NBF permettent la liaison Mg^{+2} -nucléotides qui stimule l'activité du canal K_{ATP} . La présence de Mg^{+2} est essentielle pour l'activation, car en son absence, le canal est inhibé par les nucléotides. Toutefois, le mécanisme d'activation est encore incertain. En se basant sur les protéines ABC bactériennes, certains suggèrent une hydrolyse de l'ATP dépendante du Mg^{+2} sur des NBF qui procure un surplus d'énergie qui permet de surpasser l'effet inhibiteur de l'ATP sur Kir 6. Toutefois, cette hydrolyse peut être un épiphénomène et une simple préférence pour la liaison du Mg^{+2} -ADP sur le second NBF peut être l'activateur physiologique de ce canal (92; 350).

Finalement, les multiples isoformes de Kir 6 et SUR permettent de former des canaux ayant une spécificité en fonction des tissus où ils sont exprimés et des propriétés fonctionnelles distinctes. Il est accepté que Kir 6.2-SUR1 forment le canal dans les cellules β du pancréas, tandis que Kir 6.2-SUR2A forment le canal K_{ATP} cardiaque. Cependant, l'identification des sous-unités formant les canaux dans les VSMC est moins claire. Deux types de canaux K_{ATP} ont été clonés et identifiés dans ces tissus, soit Kir 6.1-SUR2B et Kir 6.2-SUR2B (304). L'isoforme Kir 6.1-SUR2B serait prédominant dans les VSMC bien que d'autres sous-types puissent être exprimés dans certains lits vasculaires (92; 133; 304; 307).

4.2.4.2. La Régulation

Les K_{ATP} sont d'importants senseurs métaboliques et ils font le lien entre le métabolisme cellulaire et l'excitabilité de la cellule. En conditions normales, ils sont impliqués dans le maintien du tonus de base des vaisseaux où ils sont partiellement activés (172; 307). Comme mentionné

précédemment, ces canaux sont inhibés par l'ATP intracellulaire, ce qui leur confère leur nom et sont activés par le Mg^{+2} -ADP (30; 92; 133; 152; 204; 304; 307). Toutefois, dans les muscles lisses vasculaires, les niveaux d'ATP (en mM) sont très bien contrôlés, diminuant seulement dans des conditions métaboliques sévères telles que l'hypoxie ou l'ischémie (172; 296). La liaison de l'ATP aux canaux peut donc être vue comme un médiateur de la probabilité d'ouverture des K_{ATP} , qui influence la réponse du canal aux vasoconstricteurs et vasodilatateurs selon le ratio ATP/ADP intracellulaire. D'autres facteurs intracellulaires influencent aussi l'ouverture des K_{ATP} comme les H^+ , le Ca^{+2} , le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) et les molécules d'acyl-CoA à longue chaîne (92; 133).

Les substances vasoactives modulent les courants K_{ATP} par l'activation des voies des protéines kinases sérine/thréonine, incluant la voie PKA dépendante de l'AMPC, la voie PKC dépendante des phospholipides et du Ca^{+2} , et la voie PKG dépendante de la GMPc. Les vasodilatateurs, parmi lesquels on compte le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP; *calcitonin gene-related peptide*), les agonistes des β -adrénorécepteurs, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP; *vasoactive intestinal polypeptide*), l'adénosine, le NO et les prostacyclines, augmentent l'activité de la PKA qui phosphoryle et active directement les canaux contenant la sous-unité SUR2B. Ces modifications augmentent la liaison du Mg^{+2} -ADP aux NBF et stimulent l'ouverture du canal. Au contraire, les vasoconstricteurs endogènes inhibent les courants K_{ATP} via la voie de signalisation du PKC. Parmi ceux-là on compte la sérotonine, l'Ang II, l'endothéline, la vasopressine et l'histamine. La liaison des vasoconstricteurs aux GPCR (G_i ou G_q), active la PKC- ϵ . Cette dernière phosphoryle le domaine C-terminal de Kir 6.1, ce qui entraîne une diminution de la probabilité d'ouverture du canal, mais également l'internalisation du canal K_{ATP} (30; 92; 133; 204; 307). Il est toutefois important de se rappeler que ces voies de signalisation influencent plusieurs types de canaux potassiques et qu'ultimement, la détermination du potentiel de membrane et de l'état contractile du vaisseau résulte de la sommation de toute leur activité.

4.2.4.3. Les Activateurs/Bloqueurs

Plusieurs agents pharmacologiques sont utilisés pour étudier les fonctions des canaux K_{ATP} . Dans les VSMC, ils sont inhibés par les agents sulphonylurés tels que le glibenclamide et le tolbutamide (30; 92; 133; 152; 204; 304; 307). Le glibenclamide est le plus utilisé dans les études avec des valeurs de IC_{50} entre 20 et 200 nM (152). Dans les études *in vitro*, il induit une

augmentation du tonus musculaire et une dépolarisation des VSMC tandis qu'*in vivo*, il augmente la résistance vasculaire et diminue le diamètre artériel (215; 243; 304). Son action inhibitrice des K_{ATP} résulte de sa liaison avec les différents isoformes de la sous-unité SUR. Elle est également dépendante des concentrations de nucléotides, par conséquent de l'état métabolique de la cellule (11; 92). Comme les K_{ATP} sont exprimés dans plusieurs tissus (pancréas, cœur, muscles lisses et neurones), la spécificité des agents sulphonylurés peut être un atout thérapeutique pour le traitement de différentes maladies (diabète de type 2, hypertension, ...) puisqu'elle permet de cibler les K_{ATP} spécifiques à un tissu sans induire d'effets indésirables dus à une réactivité croisée avec d'autres tissus (11). Le Ba^{+2} peut également agir comme inhibiteur des K_{ATP} ainsi que le TEA, bien qu'il soit moins efficace avec un IC_{50} de 7 mM (152), et ils sont principalement utilisés comme outils pharmacologiques.

Il existe également de nombreux activateurs des K_{ATP} permettant de les caractériser. Les activateurs des K_{ATP} sont classés selon différentes particularités chimiques incluant les benzopyranes (cromakalim), les cyanoguanidines (pinacidil), les thioformamides (aprikalim), les benzothiadiazines (diazoxide) et les nitrates pyridyles (nicorandile) (30; 92; 133; 152; 185; 204; 304; 307). Dernièrement, une deuxième génération d'activateurs des K_{ATP} ont été développés : les cyclobutenediones, les structures semblables aux dihydropyridines et les carbinols tertiaires (185). Tout comme les bloqueurs, les activateurs agissent sur les sous-unités SUR et possèdent une certaine spécificité pour les différents isoformes, ce qui en fait également de bonnes cibles thérapeutiques (92). Par exemple, la pinacidil et la cromakalim sont des activateurs de SUR2A et SUR2B mais pas de SUR1 (92; 242). Les activateurs semblent également agir sur différents domaines des SUR. Le diazoxide agit sur le TMD1 et le NBD1, tandis que la cromakalim et la pinacidil interagissent avec le TMD2 (16; 92; 185; 320). Toutefois, la présence de Mg^{+2} -ADP est nécessaire pour la liaison des activateurs et les nucléotides affectent l'efficacité des modulateurs de K_{ATP} par interactions allostériques (92; 185). De plus, la sous-unité Kir peut également moduler l'affinité des activateurs pour la sous-unité SUR (185). En se liant aux K_{ATP} , ces substances augmentent la conductance du potassium dans les VSMC et induisent une hyperpolarisation qui inhibe la contraction vasculaire (30; 92; 152; 185; 304). Dans notre étude, la cromakalim est utilisée pour caractériser l'activité des canaux K_{ATP} dans les aortes des différents groupes d'animaux. La concentration utilisée est basée sur des études réalisées préalablement dans le laboratoire qui ont montré qu'elle est efficace pour inhiber les contractions à la phényléphrine et au KCl en bloquant l'activité des K_{ATP} (14; 37).

La majorité des canaux potassiques ont un rôle primordial dans le contrôle du potentiel de membrane et la régulation du tonus vasculaire. Leurs expressions et fonctions sont essentielles à la contraction et à la relaxation vasculaire. Toutefois, comme la majorité des canaux potassiques font sortir le K^+ des cellules, un autre élément est nécessaire pour maintenir l'homéostasie du potassium. La Na^+/K^+ -ATPase est alors responsable de rétablir les concentrations intracellulaires de K^+ . Nous allons maintenant examiner plus en détail cette pompe électrogénique.

4.3. LA POMPE À SODIUM (Na^+/K^+ -ATPASE)

4.3.1.1. La Structure

La Na^+/K^+ -ATPase est une protéine membranaire complexe qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP pour transporter trois ions sodiques à l'extérieur et deux ions potassiques à l'intérieur de la cellule contre leur gradient de concentration. Par cette action, elle contribue au maintien du potentiel membranaire des cellules et participe à la régulation osmotique du volume cellulaire. De plus, le gradient électrochimique de Na^+ qu'elle crée devient la source d'activation de plusieurs systèmes de transport secondaires tels que les co-transporteurs glucose-sodium ou les échangeurs Na^+/Ca^{+2} et Na^+/H^+ . Finalement, la Na^+/K^+ -ATPase génère un gradient de Na^+ qui est essentiel pour la réabsorption de Na^+ et d'eau dans le rein et l'absorption de fluides des poumons et de l'intestin (175; 178; 268). En plus de ses fonctions de transporteur, on attribue maintenant une fonction de récepteur à la Na^+/K^+ -ATPase et un rôle dans la signalisation cellulaire. Les voies de signalisation activées sont associées, entre autres, à la croissance cellulaire, à la mobilité de la cellule et à plusieurs voies métaboliques (175).

La Na^+/K^+ -ATPase fait partie de la famille des ATPases de type P, des enzymes qui s'autophosphorylent par le phosphate gamma de la molécule d'ATP qu'ils hydrolysent (140; 178; 206; 268). On retrouve également dans cette famille la H^+ -ATPase, qui comme la Na^+/K^+ -ATPase, est composée de 2 sous-unités et la SERCA (206; 268). La Na^+/K^+ -ATPase est composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , dans un rapport stœchiométrique 1:1. La sous-unité α est une protéine d'environ 110 kDa qui est responsable de la fonction catalytique de la pompe. Chez l'humain, quatre isoformes ont été identifiées ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) (140; 175; 178; 206; 268). $\alpha 1$ est l'isoforme le plus répandu puisqu'il est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus. $\alpha 2$ est principalement exprimé dans les muscles squelettiques, cardiaques et vasculaires, mais également

dans le cerveau, les poumons et le tissu adipeux. $\alpha 3$ se retrouve dans les neurones, les cellules cardiaques et les ovaires, tandis que $\alpha 4$ est exprimé dans les testicules où il est responsable de la motilité du sperme (19; 175; 206). Dans les VSMC, on retrouve principalement $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Leur fonction et leur localisation dans la cellule semblent toutefois différentes. La sous-unité $\alpha 1$ est reconnue pour son contrôle de l'activité basale de la cellule tandis que $\alpha 2$ est associée plus particulièrement aux processus de contraction-relaxation (281). De plus, Medford et al. ont démontré que dans les muscles lisses vasculaires, il existe une forme tronquée d' $\alpha 1$, augmentant ainsi la diversité des isoformes et la complexité de la régulation du transport des ions par la Na^+/K^+ -ATPase (197).

La détermination récente de la structure de la Na^+/K^+ -ATPase par cristallographie à rayon X a permis d'éclaircir les interactions atomiques à l'intérieur de la pompe ainsi qu'avec les autres protéines (206; 207; 283). La sous-unité α est composée de 10 segments transmembranaires (M1-M10) (19; 140; 178; 206; 268). Le noyau du domaine de transport ionique est constitué des hélices M1-M6 qui contiennent les principaux sites de liaison des ions (Fig. I-12). Deux sites de liaison pour les ions K^+ se situent à l'intérieur de ce domaine et il est présumé qu'ils soient 2 des 3 sites de liaisons pour le Na^+ lorsqu'il y a changement de conformation. Le troisième site de liaison pour le Na^+ se trouve dans les hélices M7-M10. Ce segment influence donc l'affinité du canal pour le Na^+ et contribue à sa sélectivité (206). En plus du domaine transmembranaire, les domaines N- et C-terminaux se situent à l'intérieur de la cellule, conférant à la Na^+/K^+ -ATPase un large domaine cytoplasmique (140; 178; 206; 268). Ce dernier se subdivise en 3 domaines fonctionnels : le domaine de phosphorylation (P), le domaine de liaison aux nucléotides (N) et le domaine d'activation (A) (Fig. I-12). Durant le cycle catalytique, le domaine P interagit avec les domaines N et A entraînant, respectivement, l'autophosphorylation et la déphosphorylation de la pompe. Ces domaines cytoplasmiques sont liés aux hélices du domaine transmembranaire par des connexions directes ou des interactions structurelles et engendrent les changements de conformation du canal permettant le transport des ions (206).

Bien que la sous-unité α soit responsable de l'activité catalytique de la pompe, la présence de la sous-unité β est essentielle pour qu'elle soit active. Son rôle exact n'est pas complètement défini, mais elle est essentielle à l'insertion et la translocation de la pompe à la membrane. De plus, la sous-unité β est importante pour l'hydrolyse de l'ATP, le transport des ions et la liaison de certains inhibiteurs, comme l'ouabaine (19; 140; 178; 206; 268). Il existe trois isoformes de la

sous-unité β (β_1 , β_2 , β_3), ce qui augmente la variété des isoenzymes de la Na^+/K^+ -ATPase. Cela donne plusieurs protéines qui ont des propriétés cinétiques différentes et qui sont distribuées

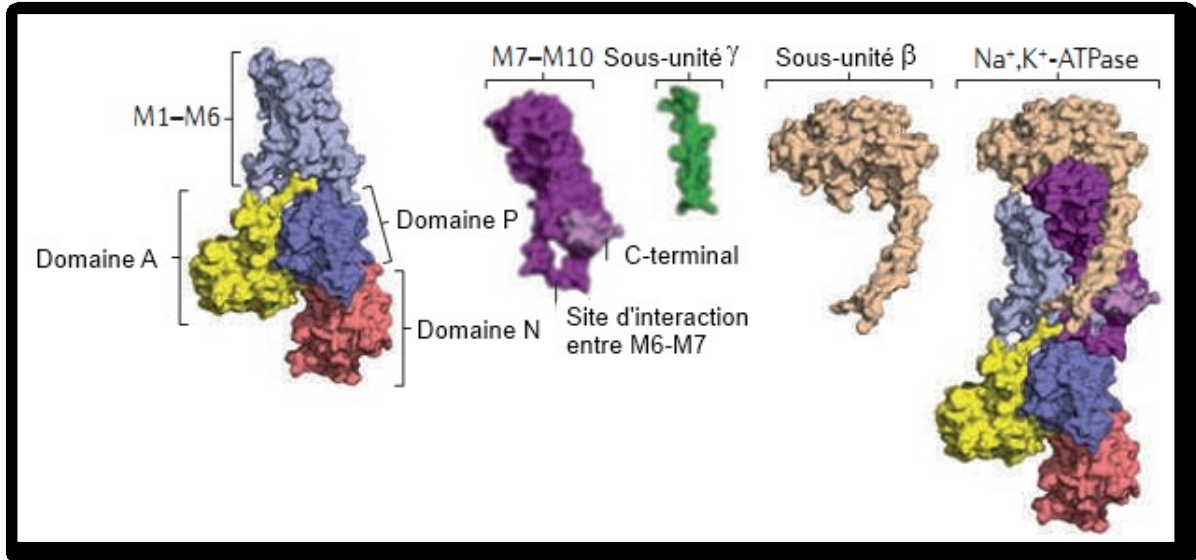


Figure I-12: Structure des différentes sous-unités de la Na^+/K^+ -ATPase. Le domaine transmembranaire de la sous-unité α est composé des hélices M1-M6 ainsi que des hélices M7-M10, ils sont responsables de la spécificité et du transport des ions. Sa région cytoplasmique comprend les domaines A, P et N. La structure complète de la Na^+/K^+ -ATPase (à la droite) est composée des sous-unités α , β et γ . (Traduite de Morth et al. (206))

selon différents patrons à travers les tissus ou même à l'intérieur d'un même tissu (178). β_1 est exprimée dans la majorité des tissus et compose la forme ubiquitaire $\alpha\beta_1$ de la pompe. β_2 est prédominante dans les tissus excitables (neurones et muscles), tandis que β_3 est exprimée dans les testicules, le cerveau et les glandes surrénales (206; 268). La sous-unité β est une protéine membranaire de type II, c'est-à-dire avec un seul segment transmembranaire, d'environ 35-55 kDa (Fig. I-12). Elle possède un petit segment N-terminal cytoplasmique et un large domaine extracellulaire (19; 140; 178; 206; 268). Dans cette partie on retrouve trois ponts disulfures, nécessaire à l'activité de l'enzyme, ainsi que trois sites de N-glycosylation, auxquels des chaînes de glucides sont attachées, mais qui peuvent être déglycosylés sans perte d'activité de la pompe (140). De plus, la structure cristallographiée de la pompe a démontré que le domaine extracellulaire de β interagit avec les boucles extracellulaires de la sous-unité α . Cette interaction,

ainsi que celle entre le segment transmembranaire β et le segment M5 de α , sont responsables des effets régulateurs de la sous-unité β sur l'activité de la pompe (206).

4.3.1.2. Le Mécanisme catalytique

La Na^+/K^+ -ATPase existe dans deux états conformationnels : E1 et E2. Chacun est caractérisé par les différences d'interactions avec le Na^+ , le K^+ , l'ATP et l'ouabaine. La figure I-13 montre les différentes étapes du mécanisme catalytique de la pompe. La première étape de la réaction est la liaison du Na^+ avec une grande affinité à la conformation E1. La liaison du Na^+ est requise pour qu'il y ait phosphorylation. Cela engendre un changement conformationnel qui crée un site de liaison pour le Mg^{+2} (nécessaire à cette étape) et qui permet l'autophosphorylation de l'Asp du domaine P à partir de l'ATP lié au domaine N. Les trois ions Na^+ se retrouvent séquestrés bien que l'enzyme demeure phosphorylée (E1P-ADP). Cela conduit à la conformation E2P et l'enzyme perd de l'affinité pour le Na^+ et en gagne pour le K^+ . Il y a donc libération des ions Na^+ du côté extracellulaire et liaison des ions K^+ à la pompe. La liaison du K^+ entraîne une déphosphorylation de la conformation E2P, orchestrée par le domaine A, qui induit la séquestration des ions K^+ et forme la conformation E2. La liaison d'un nouvel ATP intracellulaire entraîne la relâche de K^+ à l'intérieur de la cellule et le retour à la conformation E1ATP. Cela complète le cycle catalytique de la Na^+/K^+ -ATPase (140; 206; 268). On réfère souvent à ce modèle sous le nom du schéma Albers-Post. Il faut noter qu'il ne tient pas compte que la pompe pourrait exister sous la forme d'un diprotomère de sous-unités $(\alpha\beta)_2$ coopérantes et qu'elle contiendrait deux sites de liaison à l'ATP (268). La littérature est controversée sur l'état natif de la Na^+/K^+ -ATPase dans les membranes cellulaires et la situation se résume en disant qu'il existe deux camps. La plupart des études n'incluent pas l'idée d'interactions entre les monomères $\alpha\beta$ dans leur descriptif de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, tandis que d'autres suggèrent une oligodimérisation. Toutefois, l'importance de telles interactions sur la fonction de la pompe reste à prouver (140; 268). En attendant des preuves suffisantes pour pouvoir conclure sur l'état natif de la pompe et son impact sur son mécanisme catalytique, nous allons nous tourner vers les mécanismes qui contrôlent son activité.

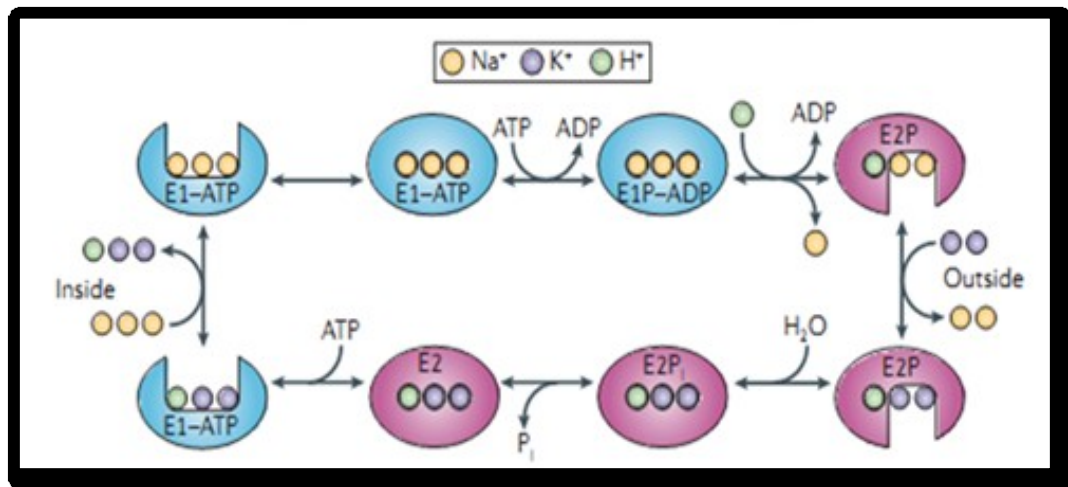


Figure I-13: Mécanisme catalytique de la Na⁺/K⁺-ATPase. (Tirée de Morth et al. (206))

4.3.1.3. La Régulation

La fonction de la Na⁺/K⁺-ATPase est essentielle à toutes les cellules et plusieurs mécanismes sont impliqués dans sa régulation. Le premier facteur qui contrôle son activité est la concentration de ses substrats, soit le Na⁺ et l'ATP intracellulaire et le K⁺ extracellulaire (305). L'activité de la pompe est également modulée par des interactions avec différentes protéines. En premier lieu, elle est contrôlée par sa sous-unité β, telle que mentionné précédemment, qui agit comme chaperonne pour assurer la maturation et l'insertion de la sous-unité α dans la membrane et qui influence les propriétés fonctionnelles de la pompe (101; 140; 178; 206; 268). En plus de ses fonctions liées à l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase, la sous-unité β serait impliquée dans la formation de jonctions serrées et dans l'établissement de la polarité des cellules. Elle assure également la localisation de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les cellules polarisées des épithéliums telle que son placement du côté basolatéral dans les cellules des tubules rénaux (101). La Na⁺/K⁺-ATPase interagit également avec les membres de la famille protéique FXYD, dont fait partie la sous-unité γ (Fig. I-12). Ce sont de petites protéines à un segment transmembranaire, caractérisées par une signature contenant le motif FXYD, deux glycines et une sérine (73; 101; 206; 239). Elles interagissent avec la sous-unité α via son segment transmembranaire M9 (206; 239). Ces protéines FXYD n'influencent pas l'expression de la Na⁺/K⁺-ATPase, mais modifient plutôt ses propriétés de transport d'une manière tissu et isoforme spécifique (19; 73; 101; 206). Chez les mammifères, cette famille comporte sept membres incluant FXYD1 (ou phospholemman), FXYD2

(ou sous-unité γ de la Na^+/K^+ -ATPase), FXYD3 (ou Mat-8 *mammary tumor marker*), FXYD4 (ou CHIF; *corticosteroid hormone induced factor*), FXYD5 (*related to ion channel RIC* ou dysadhérine), FXYD6 (ou phosphohippolin) et FXYD7 (73; 101). Bien que la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase ne soit pas leur unique fonction, ces protéines interagissent presque toutes avec la Na^+/K^+ -ATPase. Par leur interaction, ces protéines influencent l'activité de la pompe en modifiant son affinité pour le Na^+ , le K^+ ou l'ATP, ainsi qu'en changeant la vitesse maximale de transport de la Na^+/K^+ -ATPase (73; 101; 206; 239). De plus, les protéines FXYD protègent la Na^+/K^+ -ATPase contre une inactivation thermique ce qui stabiliserait la Na^+/K^+ -ATPase (101). Les changements d'affinité pour le sodium semblent toutefois être le mécanisme de régulation principal de cette famille de protéines (206). Finalement, la Na^+/K^+ -ATPase est également contrôlée par des interactions avec des protéines du cytosquelette des cellules. Les plus étudiées sont ankyrin et adducin. La principale conséquence de ces interactions avec le cytosquelette est le placement approprié de la Na^+/K^+ -ATPase dans les membranes des différents compartiments cellulaires. Toutefois, les protéines du cytosquelette peuvent également moduler l'activité de la pompe (9; 178; 305).

En plus de la régulation par les interactions des différentes protéines avec la Na^+/K^+ -ATPase, il existe un contrôle de l'expression et de l'activité de la pompe par plusieurs hormones circulantes. Cette régulation peut être à court ou long terme. La régulation à court terme implique soit des effets directs sur la cinétique de l'enzyme ou soit un contrôle sur la translocation des pompes entre la membrane plasmique et les réserves intracellulaires. À long terme, les mécanismes de régulation affectent la synthèse *de novo* de protéines et/ou la dégradation (305). Parmi les hormones qui affectent l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, on retrouve les catécholamines, les hormones peptidiques et les hormones stéroïdes. Parmi les hormones qui induisent une activation de la pompe, on retrouve l'aldostérone, l'Ang II, l'adrénaline et la noradrénaline ainsi que l'insuline. Parmi celles qui ont une activité inhibitrice, on note entre autres la dopamine, l'ANP et la parathormone (9; 305). Ces hormones contrôlent l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase via les voies de signalisation de leur récepteur qui modulent l'activité de groupes de protéines kinases, phospholipases et phosphatases. Bien que plusieurs études lient différentes voies de signalisation à la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase, les mécanismes moléculaires de phosphorylation qui soutiennent ces voies restent encore mal connus. Le seul site de phosphorylation bien caractérisé est la sérine 943, localisée dans la boucle entre M8 et M9, qui a été identifiée comme cible de phosphorylation pour la PKA (239; 305). Cette phosphorylation inhibe directement l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase dans plusieurs types cellulaires. De plus, la phosphorylation par PKA augmente le nombre de pompe présente à la surface de la membrane, mais probablement par un mécanisme

indépendant de l'AMPc (239; 305; 347). Les tyrosines dans la région C-terminale sont également impliquées dans la régulation par PKA, mais l'effet sur ces sites reste à être caractérisé (239). La régulation par PKC semble se faire par une phosphorylation de la région N-terminale bien qu'aucun site conservé entre les espèces n'ait été identifié (239). Cette phosphorylation inhibe l'activité de la pompe et provoque son internalisation (9; 347). Les effets de PKC paraissent toutefois spécifiques à l'espèce et au tissu étudiés et des études supplémentaires sont requises pour déterminer l'importance physiologique de cette phosphorylation chez l'humain. De plus, il faut déterminer si la phosphorylation de la sous-unité α est importante ou si les effets observés sont dus à la phosphorylation des sous-unités régulatrices (239). Finalement, une régulation effectuée par PKG et par les tyrosines kinases a également été observée, mais la signalisation exacte reste à être déterminée (19; 178; 305; 347). Beaucoup d'efforts devront être déployés pour clarifier les effets complets de la phosphorylation sur l'activité enzymatique de la Na^+/K^+ -ATPase et pour déterminer si les actions observées sont spécifiques à un isoforme, un tissu ou une espèce. De plus, il sera intéressant d'évaluer si les voies de signalisation activées lorsque la Na^+/K^+ -ATPase agit comme récepteur induisent un autocontrôle de la pompe.

4.3.1.4. Les Stéroïdes Cardiotoniques

La Na^+/K^+ -ATPase est la cible de plusieurs toxines produites par des plantes et des animaux, à cause de sa fonction importante dans la physiologie cellulaire et pour l'organisme entier. Son activité de pompe ionique est inhibée par une série de stéroïdes cardiotoniques (CTS; *cardiotonic steroid*) également nommés facteurs semblables à la digitale (DLF; *digitalis-like factor*) (19; 26; 175; 178; 217; 268; 305). Ces molécules sont utilisées depuis plus de 1500 ans comme diurétiques, traitement pour les arythmies et l'insuffisance cardiaque, émétiques, agents pour l'avortement et poisons. Récemment, de nouveaux rôles dans la thérapie pour le cancer et pour les troubles neurologiques et de comportements ont également été discutés (26). Les CTS sont classés en cardenolides, composés initialement identifiés dans les plantes dont les plus connus sont l'ouabaine et la digitale, et les bufadienolides, identifiés dans le venin de crapaud et dont fait partie la marinobufagénine (MBG). Ils possèdent une structure générale similaire, soit un noyau stéroïde avec un anneau lactone à 5 carbones pour les cardenolides, et à 6 carbones pour les bufadienolides, qui est considéré essentiel pour la fonction de ses substances (19; 26; 175; 178; 217). Ils se lient à la Na^+/K^+ -ATPase avec une forte affinité lorsque le canal est dans la conformation E2P sans K^+ (206; 268), dans la boucle extracellulaire M5-M6 (206). La structure

cristalline de la conformation avec les ions K^+ séquestrés a également révélé un site de liaison de faible affinité pour les CTS, localisé du côté extracellulaire dans une cavité entre M4, M5 et M6 (206). La sous-unité α est responsable de la sensibilité à l'ouabaïne de la Na^+/K^+ -ATPase. Le site de liaison aux CTS, communément appelé site de liaison à l'ouabaïne, est conservé parmi plusieurs organismes. Bien que la majorité des isoformes de plusieurs espèces soit sensibles à l'ouabaïne, il existe des exceptions. Entre autres, chez la souris et le rat, la sous-unité α_1 possède une faible affinité pour l'ouabaïne, tandis que les 3 autres isoformes γ sont sensibles. Par contre, chez l'humain, tous les isoformes sont sensibles à l'ouabaïne (26; 175; 217). De plus, la localisation spécifique de certains isoformes dans la cellule permet une régulation plus spécifique de la Na^+/K^+ -ATPase par les CTS. Par exemple, dans les VSMC, les pompes formées de sous-unités α_1 ont une distribution ubiquitaire dans la membrane plasmique, tandis que celles composées d' α_2 se retrouvent dans la partie de la membrane pourvue de cavéoles qui sont adjacentes au réticulum sarcoplasmique, où l'on retrouve également des échangeurs Na^+/Ca^{+2} , des ROC et des SOC. Les concentrations de Na^+ et de Ca^{+2} dans l'espace entre la membrane et le RS sont donc contrôlées différemment de celles dans l'ensemble du cytosol. Chez le rat, où α_1 est moins sensible à l'ouabaïne, une faible concentration (nM) inhibe uniquement α_2 . Chez l'humain, où les deux isoformes sont sensibles, une inhibition partielle de la pompe affecte les concentrations de Na^+ de façon plus importante dans l'espace entre le RS et la membrane que dans le cytosol global. En modifiant le gradient de Na^+ , le transport du Ca^{+2} par les autres canaux est influencé ainsi que les réserves calciques dans le RS. En changeant la régulation de l'homéostasie du calcium les mécanismes de vasoconstriction de la cellule sont alors favorisés (26).

Les études des mécanismes de l'hypertension et de l'expansion volumique ont permis de déterminer qu'il existe également des CTS endogènes qui contrôlent la Na^+/K^+ -ATPase (19; 26; 175; 178; 217; 268; 305). Le cortex surrénalien et l'hypothalamus sont considérés comme les sites de synthèse de ces hormones endogènes, bien que les enzymes impliquées ne sont pas encore identifiées (19; 26; 217). En plus d'inhiber la fonction de transporteur de la Na^+/K^+ -ATPase, ces substances agissent comme des agonistes lorsqu'ils sont en faible concentration, en utilisant la Na^+/K^+ -ATPase comme un récepteur. La liaison de l'ouabaïne sur la Na^+/K^+ -ATPase active des cascades de signalisation impliquant, entre autres, Src et le EGFR, la phospholipase C (PLC) et le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). De plus, la liaison de faibles concentrations d'ouabaïne induit l'endocytose de la pompe et la compartimentalisation de certaines molécules de signalisation de manière similaire au phénomène observé avec les récepteurs tyrosine kinase. Les voies de signalisation activées par les CTS sont, entre autres, impliquées dans l'homéostasie du calcium, la

croissance et la prolifération cellulaire ainsi que dans les mécanismes d'apoptose et d'adhésion cellulaire (19; 175; 217; 347). Il y a fort à parier que les deux voies d'action des CTS sur la Na^+/K^+ -ATPase, celle d'inhibition de la pompe ionique et celle d'activation de la signalisation cellulaire, agissent en parallèle et en synergie pour déterminer les effets physiologiques de la liaison des CTS. En plus de contrôler la Na^+/K^+ -ATPase dans les conditions physiologiques, les CTS sont impliqués dans plusieurs conditions pathologiques telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'ischémie et l'infarctus du myocarde, la prééclampsie, le diabète, les maladies comportementales et le cancer (19; 217).

Compte tenu de l'implication des CTS dans plusieurs pathologies, de nombreuses stratégies pharmacologiques sont développées pour bloquer leur action. Dans un premier temps, on pense bloquer le site de liaison de l'ouabaïne sur son récepteur. Pour ce faire, on peut utiliser des agonistes partiels, tels que le spironolactone et le canrénone, qui bloquent la liaison de l'ouabaïne et qui induisent un déplacement de la courbe d'inhibition par l'ouabaïne (19). On peut également utiliser des antagonistes du récepteur. Le rostafuroxin (PST 2238) est un composé stéroïdien qui a été synthétisé pour être un antagoniste de l'ouabaïne endogène. Il démontre des effets antihypertenseurs importants dans les formes d'hypertension dépendantes d'une augmentation du volume sanguin (augmentation des niveaux d'ouabaïne endogène ou polymorphisme des gènes encodant la protéine du cytosquelette adducin) autant dans les modèles animaux que dans cette population chez l'humain tel que le démontre la récente étude de phase II OASIS (88). Un autre exemple d'antagoniste est le resibufogenine, un antagoniste de la MBG. Les effets bénéfiques de ce composé ont été démontrés dans des modèles animaux de prééclampsie où il prévient les caractéristiques phénotypiques de ce syndrome (241). Les effets des CTS sont également bloqués par immunoneutralisation. L'administration de Digibind, une préparation commerciale contenant des fragments purifiés de Fab de l'anticorps antidigoxin qui réagit également avec d'autres CTS, à des modèles animaux d'hypertension prévient ou réduit l'hypertension (175). De plus, l'utilisation en clinique de Digibind chez des patientes atteintes de prééclampsie sévère diminue la pression artérielle et améliore la fonction rénale (19). Une autre alternative pharmacologique serait de modifier l'affinité de la Na^+/K^+ -ATPase pour les CTS en modifiant la phosphorylation de la pompe. De plus, les différents éléments des cascades signalétiques activées par la liaison des CTS pourraient devenir des cibles thérapeutiques attrayantes. Finalement, il serait intéressant d'agir sur la synthèse et la relâche des CTS endogènes, mais la compréhension de ces phénomènes doit être éclaircie avant de pouvoir les considérer comme cibles thérapeutiques (19).

Bien que d'énormes progrès ont été réalisés au cours des 20 dernières années dans la caractérisation de la Na^+/K^+ -ATPase dans sa structure, ses fonctions, sa régulation et des composés qui influencent son activité, plusieurs questions sont toujours sans réponse. Toutefois, l'importance de cette protéine ne peut être niée et plusieurs efforts sont déployés pour contrôler son implication dans diverses pathologies.

5. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Durant la gestation, il y a une augmentation du débit cardiaque, du volume plasmatique et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) (12; 47; 313). Paradoxalement, il existe également une diminution de la pression artérielle et de la résistance périphérique (47; 208), causée en partie par une baisse de la réactivité aux vasopresseurs durant la gestation (14; 37; 47; 258; 293). Dans les cas de prééclampsie (une cause majeure de morbidité et mortalité fœtales et maternelles), l'activation du SRAA, en particulier de l'aldostérone, est moindre que lors de la grossesse normale et les diminutions de pression artérielle et de résistance vasculaire sont absentes (208; 262). Ceci contribue à entretenir une confusion quant au rôle des minéralocorticoïdes dans la grossesse normale et pathologique.

Chez la femme, le SRAA est activé très tôt dans la grossesse, i.e. au moins dès la 6^e semaine avant même la baisse de la pression artérielle (47). Chez la rate, le SRAA s'active vers la fin de la 2^e semaine (sur 3) de gestation, soit quelques jours avant que chute la pression artérielle (31; 100). Dans des conditions autres que la grossesse, de telles augmentations du SRAA seraient associées à de l'hypertension. Ainsi, les changements observés du SRAA durant la grossesse apparaissent paradoxaux (292). Notre laboratoire a démontré qu'une augmentation de l'activité du SRAA, induite par une diète faible en sodium durant les 7 derniers jours de gestation, cause une augmentation des niveaux de PRA et d'aldostérone, alors que l'expansion du volume sanguin associée à la grossesse normale est fortement réduite. Fait important, la baisse de pression artérielle est maintenue à la fin de la gestation (259). À l'opposé, la suppression du SRAA à l'aide d'une diète élevée en sodium pendant la même période induit une réduction des niveaux de PRA et d'aldostérone chez les rates gestantes. De plus, la baisse de pression associée à la gestation est éliminée et la baisse de la réactivité aux vasopresseurs est renversée (14; 20). Toutefois, ces modèles animaux ne permettent pas de différencier l'implication des divers composés du SRAA sur les phénomènes observés.

L'aldostérone, comme effecteur du SRAA, est impliquée dans le contrôle du volume circulant et de l'équilibre électrolytique et, par conséquent, de la pression artérielle. La présence des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) dans les vaisseaux sanguins contribue au remodelage vasculaire et à la dysfonction endothéliale par des mécanismes associés à une augmentation du tonus vasculaire (36; 77; 192). Paradoxalement, l'importante augmentation d'aldostérone durant

la grossesse est accompagnée d'une baisse de la résistance vasculaire (47) suggérant que la grossesse induit un remaniement des réponses physiologiques normales à une hausse du SRAA.

En fin de grossesse chez la rate, la baisse de réactivité vasculaire à plusieurs agonistes (incluant la phényléphrine (PhE) et le KCl) est présente dans l'aorte thoracique. De plus, des modulations de l'activité des canaux ioniques sont impliquées dans cette baisse de réponse (14; 37; 258). Notre laboratoire a démontré que les canaux calciques dépendants du voltage et les canaux potassiques sont en partie responsables de ces faits (37; 258). Comme l'activité de ces canaux est en grande partie contrôlée par le potentiel de membrane, il est possible qu'elle soit modifiée par une hyperpolarisation de la membrane qui retarderait l'entrée de calcium et la contraction des muscles lisses vasculaires. La pompe Na^+/K^+ -ATPase, dont l'implication est majeure dans le contrôle des polarités de la membrane (178; 268), pourrait également être impliquée dans les modifications de réactivité vasculaire associées à la grossesse. Toutefois, l'impact de la hausse d'aldostérone sur l'activité des canaux ioniques des VSMC durant la grossesse n'est pas connu.

Nos travaux ont pour but de vérifier l'hypothèse que *l'augmentation des taux sériques d'aldostérone durant la grossesse est responsable des changements hémodynamiques observés et ces effets sont causés par l'activation des MR.*

Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs suivants ont été établis :

- Bloquer l'activation des MR en administrant un de leurs antagonistes, le canrénoate de potassium, à des rates gestantes durant les 7 derniers jours de gestation.
- Évaluer les effets du canrénoate sur la réactivité vasculaire d'anneaux aortiques dénudés d'endothélium de rates à différents temps de gestation.
- Déterminer, à l'aide de modulateurs pharmacologiques, les effets du traitement au canrénoate sur l'activité des canaux potassiques et calciques dans les VSMC.
- Caractériser, à l'aide d'outils pharmacologiques, l'activité et l'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase et des canaux potassiques dans l'aorte thoraciques des rates gestantes traitées au canrénoate.
- Évaluer si le traitement a une incidence sur le déroulement de la grossesse en mesurant des paramètres physiologiques et biochimiques de la mère et des fœtus.
- Évaluer les effets du traitement au canrénoate sur les modifications hémodynamiques de la grossesse par des méthodes de télémétrie.

CHAPITRE II : Les minéralocorticoïdes participent à la diminution de réactivité vasculaire associée à la gestation chez la rate

STATUT: Publié

Am J Physiol Heart Circ Physiol 302: H1195-H1201. 2012. (240)

Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats

M. Provencher,^{1,2} V. Houde,¹ M. Brochu,¹ and J. St-Louis^{1,2}

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine and Departments of Obstetrics-Gynecology and ²Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Submitted 13 June 2011; accepted in final form 19 December 2011

Provencher M, Houde V, Brochu M, St-Louis J. Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1195–H1201, 2012. First published December 23, 2011; doi:10.1152/ajpheart.00510.2011.—The renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system is markedly activated in pregnancy. We evaluated if mineralocorticoid receptors (MR), a major component of the RAA system, are involved in the reduced vascular reactivity associated with pregnancy. Canrenoate (MR antagonist; 20 mg·kg⁻¹·day⁻¹) was administered to nonpregnant (NP) rats for 7 days and to pregnant rats from day 15 to 22 of gestation. These were killed on day 17, 19, or 22 of gestation and, for NP rats, after 7 days treatment. Constrictor responses to phenylephrine (PhE) and KCl were measured in endothelium-denuded thoracic aortic rings under the influence of modulators of potassium (activators) and calcium (blocker) channels. Responses to the constrictors were blunted from days 17 to 22 of gestation. Although canrenoate increased responses to PhE and KCl, it did not reverse their blunted responses in gestation. NS-1619 and cromakalim (respectively, high-conductance calcium-activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channel activators) diminished responses to both PhE and KCl. Inhibition by NS-1619 on responses to both agonists was decreased under canrenoate treatment in NP, but the reduced influence of NS-1619 during gestation was reversed by the mineralocorticoid antagonist. Cromakalim reduced the response to PhE significantly in the pregnant groups; this effect was enhanced by canrenoate. Finally, nifedipine (calcium channel blocker) markedly reduced KCl responses but to a lesser extent at the end of pregnancy, an inhibiting effect that was increased with canrenoate treatment. These data demonstrate that treating rats with a MR antagonist increased vascular reactivity but that it differentially affected potassium and calcium channel activity in aortas of NP and pregnant animals. This suggests that aldosterone is one of the components involved in vascular adaptations to pregnancy.

potassium canrenoate; renin angiotensin aldosterone system; voltage-dependent calcium channels; ATP-sensitive potassium channels; high-conductance calcium-activated potassium channels

IN HUMANS, arterial blood pressure (BP) decreases early in pregnancy, reaching a nadir during the second trimester (10, 26), whereas in rats it is stable until day 17 of gestation to decline gradually until term (day 23) (4, 37). This BP reduction is consequent to reduced vascular peripheral resistance associated with decreased influence of vasoconstrictor stimuli (3, 9, 10, 34, 37). These changes occur despite increases in blood volume and cardiac output and activation of the renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system (2, 10, 39). In humans, by the sixth week of gestation, plasma renin activity (PRA) and aldosterone levels are already elevated and rise until term (10).

In pregnant rats, PRA is increased early in gestation while aldosterone levels raise from midpregnancy until term (7, 18). In conditions other than pregnancy, such increases of the RAA system are associated with hypertension. This renders paradoxical the role of heightened RAA system in pregnancy (36).

We have reported that increasing the activity of the RAA system by giving rats a low-sodium diet during the last 7 days of gestation resulted in elevated PRA and plasma aldosterone levels but reduced plasma volume expansion compared with normal pregnancy. Moreover, the end of gestation decrease in BP was maintained (35). In contrast, when the RAA system was depressed by a high-sodium diet, pregnant rats manifested reduced PRA and aldosterone levels while the diminution of BP usually linked with pregnancy was eliminated (4). In addition, high-sodium intake during gestation was associated with the reversal of gestational-related resistance to vasopressors (3).

It has been documented that the activity of high-conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) and ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) is increased in vascular smooth muscle (VSM) of normal pregnant animals (9, 22, 24). It is considered that opening of potassium channels leads to hyperpolarization of vascular smooth muscle cells (VSMC), which results in delayed opening of voltage-dependent calcium channels (VDCC) and consequently retards smooth muscle constriction (9). This is compatible with data demonstrating some impairment of calcium influx through VDCC in aortic rings of pregnant rats (34). Furthermore, pregnant rats on a high-sodium diet (decreased RAA system) display reduced K_{ATP} activity and increased BK_{Ca} and VDCC activities, affirming RAA system involvement in the ionic balance of VSMC (3).

Aldosterone plays a major role in electrolyte homeostasis in the kidneys and colon by controlling sodium reabsorption and potassium secretion (5, 43). Lately, studies have demonstrated the presence of mineralocorticoid receptors (MR) in nonepithelial tissues, including heart and blood vessels (42). Aldosterone was reported to contribute to vascular remodeling and endothelial dysfunction through several coupling mechanisms (8, 13, 23), all associated with heightened vascular tone. Paradoxically, the increase in aldosterone levels in pregnancy occurs together with decreased vascular resistance (10), indicating that gestation resets some of the physiological responses normally consequent to an enhanced RAA system.

This paradoxical presence of the RAA system makes us believe that MR are key factors in the control of vascular reactivity during pregnancy. We hypothesize that aldosterone acts on VSM through the modulation of ion channel activity. To confirm this, nonpregnant (NP) and term-pregnant rats were treated for 7 days with a MR antagonist,

Address for reprint requests and other correspondence: J. St-Louis, Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, 3175, chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, QC, Canada H3T 1C5.

potassium canrenoate. The objective was to characterize vascular reactivity of the aorta from these animals in the absence or presence of potassium and calcium channel modulators. To do so, we took profit of earlier work from this laboratory that has shown that the use of thoracic aorta is a convenient *in vitro* preparation to study the vascular blunted responses to vasoconstrictors (3, 9, 34).

MATERIALS AND METHODS

Animals. The experimental procedures were reviewed and approved by the local Animal Care Committee, accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, QC, Canada), weighing between 225 and 250 g, were studied. Pregnant rats were obtained as detailed previously (4). Age-matched NP females (selected randomly during the estrous cycle) were also investigated. The animals (6–10/group) were housed under conditions of controlled lighting (6:00 A.M. to 6:00 P.M.) and temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). They were fed a normal diet containing 0.23% NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet; Harlan Teklad, Montréal, QC, Canada). Pregnant and NP animals were randomly assigned to groups that were placed either on tap water or on potassium canrenoate (C) solution ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$; Sigma, St. Louis, MO). The beverage was given from *day 15* of gestation (parturition on *day 23*) until death or for 7 days in the NP groups. At the end of treatment, the two NP groups (untreated: NP; canrenoate treated: NPC) and the six pregnant (P) groups of rats at *days 17* (P17, PC17), *19* (P19, PC19), or *22* (P22, PC22) of gestation were killed by decapitation (9:00–9:30 A.M.), and their aorta were removed for *in vitro* assays.

Organ bath assays. Vascular reactivity was measured, as described previously (3, 9), in thoracic aortic rings of both untreated and canrenoate-treated NP and pregnant rats at *days 17* (P17), *19* (P19), and *22* (P22) of gestation. After death, the thoracic aorta was removed rapidly, immersed in cold Krebs-bicarbonate solution (KBS), cleaned of fat and extraneous tissues, and cut into four consecutive rings (2–3 mm). The endothelium of each ring was removed by gently rubbing the lumen with an 18-gauge needle to measure changes of myotropic responses at the level of the smooth muscle. Indeed, as the vascular endothelium influences reactivity of the underlying smooth muscle (via nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factor, etc.) by activating coupling mechanisms similar to the ones used by the agonists on smooth muscle (for instance, the ion channels herein studied), we chose to remove it to get a precise picture of the consequences on the VSM. The rings were mounted in individually jacketed tissue baths (15 ml; Radnotti Glass, Monrovia, CA), maintained at 37°C , and equilibrated for 1 h under 2.0 g passive tension with frequent washing and tension adjustment. The tissues were

bathed in KBS of the following composition (in mmol/l): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO_3 , 2.5 CaCl_2 , 1.18 KH_2PO_4 , 1.18 MgSO_4 , and 5.5 dextrose. NaCl and MgSO_4 were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada), KCl, KH_2PO_4 , and NaHCO_3 from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada), dextrose from J. T. Baker Chemicals (Phillipsburg, NJ), and CaCl_2 from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). The solution was bubbled with a mixture of 95% O_2 -5% CO_2 ; pH was 7.4. After 1 h equilibration, tissues were challenged with $1.0 \mu\text{mol/l}$ phenylephrine (PhE). At plateau response, carbachol (0.1 mmol/l) was added to confirm endothelium removal. Tension was measured by force displacement transducers and recorded on a computerized data-acquisition system (Dataq Instruments, Akron, OH).

After return to baseline (~ 60 min), cumulative concentration-response curves to PhE (10^{-9} to 10^{-4} mol/l) and KCl (2–100 mmol/l, as hypertonic solution) were obtained successively. The two curves were separated by frequent washings and charted 1 h after tension from the previous maneuver had returned to baseline. One of the rings from each animal served as control, whereas each of the other three was preincubated with a VDCC blocker (nifedipine, $0.1 \mu\text{mol/l}$), a BK_{Ca} channel activator (NS-1619, $30 \mu\text{mol/l}$), or a K_{ATP} channel activator (cromakalim, $1 \mu\text{mol/l}$) (all from Sigma Aldrich) added 10 min before initiating the curve. The concentrations of these agents were chosen on the basis of previous work (3, 9, 33). Each ring was exposed to the same ion channel modulator throughout the experiment. All experiments were performed under sodium lamps to prevent photo inactivation of nifedipine and NS-1619.

Data analysis. Concentration-response curves were analyzed by computer fitting to a four-parameter logistic equation (Prism 4.0; GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the maximum response (E_{max}) (Table 1). Sensitivity ($-\log$ of EC_{50} , the concentration producing 50% of E_{max}) was not analyzed since reduction of E_{max} was often very important and the EC_{50} is artificially decreased. The effect of the ion channel modulators was determined with a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test vs. the control aortic rings of a same group. Statistical significance was assumed when the difference reached the probability level of 5% ($P < 0.05$). The effects of both pregnancy and canrenoate treatment were evaluated on E_{max} by two-way ANOVA. To compare the inhibitory capacity of each modulator, we calculated the difference of E_{max} between the curve in the presence and absence of a modulator in each group. These delta values were used to build the bar graphs in Figs. 2 and 3. Once again, two-way ANOVA was used to evaluate the effects of pregnancy and canrenoate treatment on the inhibitory action of each modulator. ANOVA, when significant, was followed by the Bonferroni posttest. Statistical significance was assumed when the difference reached the probability level of 5% ($P < 0.05$). The results are expressed as mean values \pm SE with numbers in parentheses corresponding to the number of animals studied.

Table 1. Maximum responses of aortic rings to PhE and KCl in absence (control) and presence of ion channels modulators (nifedipine, NS-1619, or cromakalim)

	Nonpregnant		17 Days Pregnant		19 Days Pregnant		22 Days Pregnant	
	–	+	–	+	–	+	–	+
PhE								
Control	2.33 ± 0.12	2.64 ± 0.13	1.75 ± 0.06	2.00 ± 0.06	1.59 ± 0.04	1.82 ± 0.05	1.88 ± 0.07	2.19 ± 0.08
Nifedipine	2.24 ± 0.13	2.31 ± 0.10	$1.44 \pm 0.09^*$	$1.33 \pm 0.08^*$	$1.39 \pm 0.06^*$	$1.40 \pm 0.05^*$	2.03 ± 0.10	$1.65 \pm 0.10^*$
NS-1619	$1.73 \pm 0.14^*$	2.54 ± 0.12	$1.27 \pm 0.08^*$	$1.40 \pm 0.11^*$	$1.30 \pm 0.05^*$	$1.26 \pm 0.08^*$	1.64 ± 0.05	$1.31 \pm 0.10^*$
Cromakalim	2.16 ± 0.12	2.30 ± 0.11	$1.00 \pm 0.06^*$	$0.86 \pm 0.05^*$	$0.82 \pm 0.06^*$	$0.90 \pm 0.06^*$	$1.36 \pm 0.09^*$	$1.24 \pm 0.12^*$
KCl								
Control	1.84 ± 0.05	2.23 ± 0.06	1.41 ± 0.04	1.70 ± 0.04	1.25 ± 0.03	1.30 ± 0.03	1.42 ± 0.05	1.56 ± 0.05
Nifedipine	$0.52 \pm 0.08^*$	$0.63 \pm 0.08^*$	$0.30 \pm 0.06^*$	$0.32 \pm 0.06^*$	$0.27 \pm 0.03^*$	$0.15 \pm 0.04^*$	$0.46 \pm 0.06^*$	$0.34 \pm 0.06^*$
NS-1619	$1.07 \pm 0.07^*$	$1.85 \pm 0.08^*$	$0.79 \pm 0.06^*$	$0.93 \pm 0.06^*$	$0.80 \pm 0.03^*$	$0.63 \pm 0.04^*$	$1.01 \pm 0.06^*$	$0.84 \pm 0.05^*$
Cromakalim	$2.12 \pm 0.07^*$	2.34 ± 0.08	1.48 ± 0.06	$1.48 \pm 0.06^*$	$1.39 \pm 0.03^*$	1.36 ± 0.04	1.45 ± 0.06	1.49 ± 0.05

Values are means \pm SE in grams of tension. PhE, phenylephrine; –, absence; +, presence of canrenoate. * $P < 0.05$ vs. control aortas.

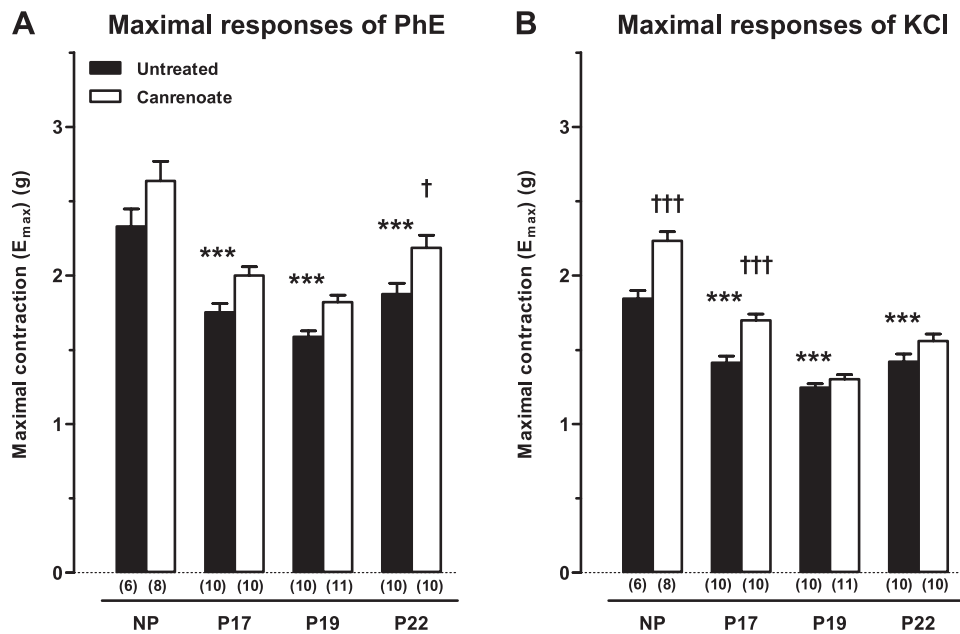


Fig. 1. Maximum responses (E_{max}) to phenylephrine (PhE) (A) and to KCl (B) in the absence of channel modulator (control) aortas of each group. Values are means ± SE. Nos. in parentheses represent the no. of rats tested. ***P < 0.001, effect of gestation (P) vs. nonpregnant (NP) untreated. †P < 0.05 and †††P < 0.001, effect of canrenoate vs. untreated group of same gestational time.

RESULTS

Effect of canrenoate on aortic responses to PhE and KCl. Figure 1 and Table 1 depict the results obtained with concentration-response curves to PhE and KCl. The two-way ANOVA analysis on the E_{max} shows significant impacts of both the time of gestation and canrenoate treatment on aortic responses to PhE (P < 0.001; Fig. 1A). Indeed, pregnancy induced reduction of E_{max} that was already evident at day 17 and persisted until term gestation (P < 0.001 vs. NP; Fig. 1A). Canrenoate, on the other hand, significantly increased responses to PhE in all groups (P < 0.001, 2-way ANOVA) although the Bonferroni test gave significance for P22 only (P < 0.05 vs. NP; Fig. 1A).

E_{max} to KCl was significantly decreased by gestation and significantly increased by canrenoate treatment (both P < 0.001, 2-way ANOVA; Fig. 1B). The reduced KCl responses of the aortas were already present at day 17 and persisted until term (P < 0.001 vs. NP; Fig. 1B). With the Bonferroni test, the increase of E_{max} by canrenoate was only significant for NPC and PC17 (both P < 0.001 vs. NP and P17, respectively; Fig. 2A). This is also shown in the first line of the two sections of Table 1 (control).

Effect of canrenoate on aortic responses to PhE, influence of ion channel modulators. The potassium channel activators NS-1619 and cromakalim attenuated aortic PhE responses (Table 1). In NP rats, this was only significantly observed in

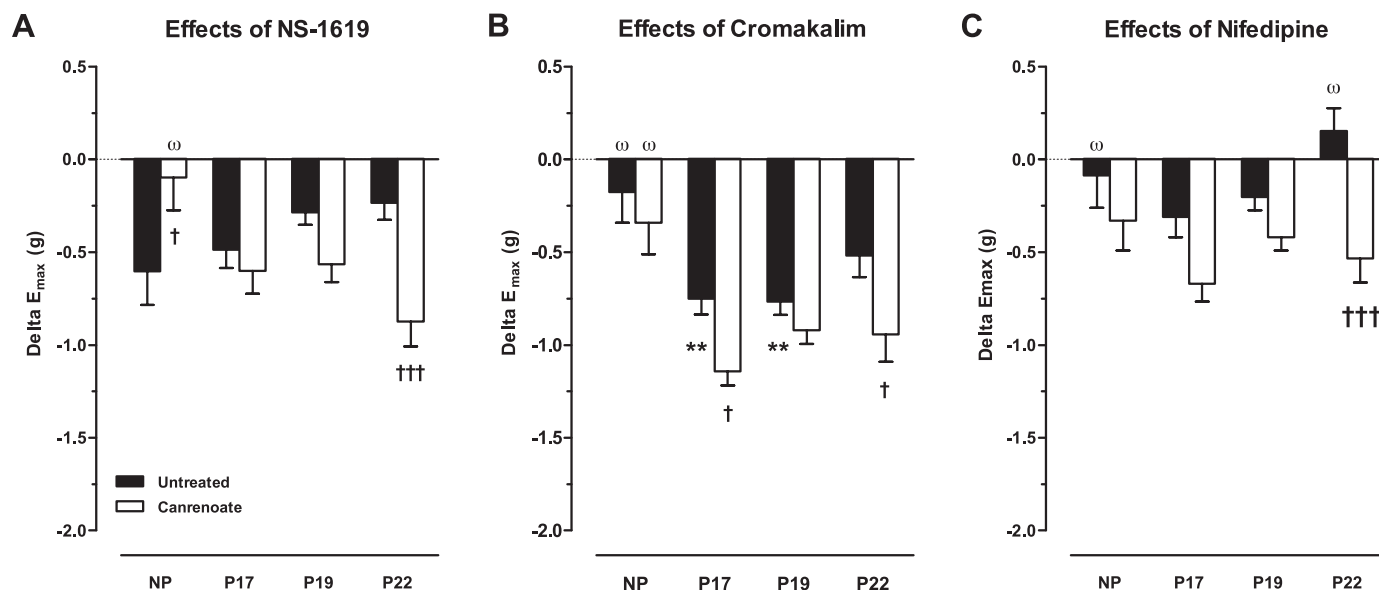


Fig. 2. Differences in E_{max} of PhE responses between aortas used as controls (first row of upper section of Table 1) and those incubated with NS-1619 (30 μmol/l) (A), cromakalim (1 μmol/l) (B), or nifedipine (0.1 μmol/l) (C). Values are means ± SE. **P < 0.01, effect of gestation vs. NP untreated. †P < 0.05 and †††P < 0.001, effect of canrenoate vs. untreated group of same gestational time. ωData not different from null values.

untreated animals with NS-1619, but it is significantly present in all groups of pregnant animals for both potassium channel activators (Table 1). Figure 2A clearly illustrates an opposite effect between time of gestation and canrenoate treatment on the ability of NS-1619 to reduce PhE responses. This is illustrated by significant interaction in the two-way ANOVA ($P < 0.001$). As term of pregnancy approached, the capacity of NS-1619 to interfere with PhE responses was reduced, an outcome that was the inverse with canrenoate treatment. On the other hand, pregnancy significantly increased the efficacy of cromakalim to lower the E_{\max} of PhE ($P < 0.001$, 2-way ANOVA; Fig. 2B). Furthermore, canrenoate treatment further increased cromakalim's inhibitory effect on PhE responses ($P < 0.001$, 2-way ANOVA), with significant elevations on days 17 and 22 (both $P < 0.05$ vs. P17 and P22, respectively; Fig. 2B).

Nifedipine also induced significant reduction of PhE responses, but only in aorta of pregnant animals (Table 1). In the untreated groups, nifedipine was only able to reduce PhE responses in the aorta of pregnant animals at day 17 and 19 (Table 1 and Fig. 2C). Again, canrenoate treatment significantly increased the attenuating effect of nifedipine (as for potassium channel activators) on E_{\max} to PhE ($P < 0.001$, 2-way ANOVA; Fig. 2C).

Effect of canrenoate on aortic responses to KCl, influence of ion channel modulators. Cromakalim and NS-1619 had very different outcomes on KCl contraction curves. Cromakalim was a weak inhibitor of KCl and even increased E_{\max} to KCl in some groups (Table 1 and Fig. 3B). NS-1619, on the other hand, markedly lowered E_{\max} in all groups (Table 1 and Fig. 3A). As for the response to PhE, pregnancy and canrenoate treatment had opposite effects on NS-1619's action (interaction $P < 0.001$, 2-way ANOVA; Fig. 3A). Indeed, inhibition by NS-1619 was lowered as pregnancy progressed to term ($P < 0.01$ for P19 and P22 vs. NP; Fig. 3A), whereas canrenoate decreased the inhibitory effect of NS-1619 on NPC ($P < 0.01$

vs. NP; Fig. 3A) and reinforced it in the aorta of pregnant rats ($P < 0.01$ for PC22 vs. P22; Fig. 3A).

Nifedipine (0.1 $\mu\text{mol/l}$) is a very efficient inhibitor of KCl responses. It markedly lowered E_{\max} in all groups compared with aortas in the absence of modulators (Table 1). Furthermore, its effect was diminished by the progression of pregnancy ($P < 0.001$, 2-way ANOVA; Fig. 3C), demonstrated by significant differences in the P19 and P22 groups (both $P < 0.01$ vs. NP; Fig. 3C). In contrast, canrenoate treatment augmented nifedipine's inhibitory power ($P < 0.001$, 2-way ANOVA; Fig. 3C).

DISCUSSION

The present study was undertaken to determine if MR antagonism influences the development of blunted responses to vasoconstrictors accompanying pregnancy. We evaluated the impact of canrenoate treatment of pregnant rats on PhE- and KCl-induced aortic contractions and on the involvement of calcium and potassium channels, via their pharmacological modulation, in these contractions. We first demonstrated that the responses to PhE and KCl were decreased in the aortic rings of pregnant rats (Fig. 1, A and B), confirming earlier observations on blunted responses to vasopressors associated with gestation (3, 9, 24, 30, 33, 34, 38). Interestingly, these blunted responses were already evident at P17, before the BP reduction that usually occurs at P18 (4). This implies that reduced reactivity to vasoconstrictors could be involved in decreased peripheral resistance responsible for the drop in BP. This fits with Chapman et al. (10) who demonstrated peripheral vasodilatation very early in human pregnancy, before full placentation and in linkage with RAA system activation. As suggested elsewhere (36), it is suspected that generalized vasodilatation is the consequence of some hormonal stimulus linked to RAA system activation that evokes gradual increases of plasma volume and cardiac output to maintain BP. By the

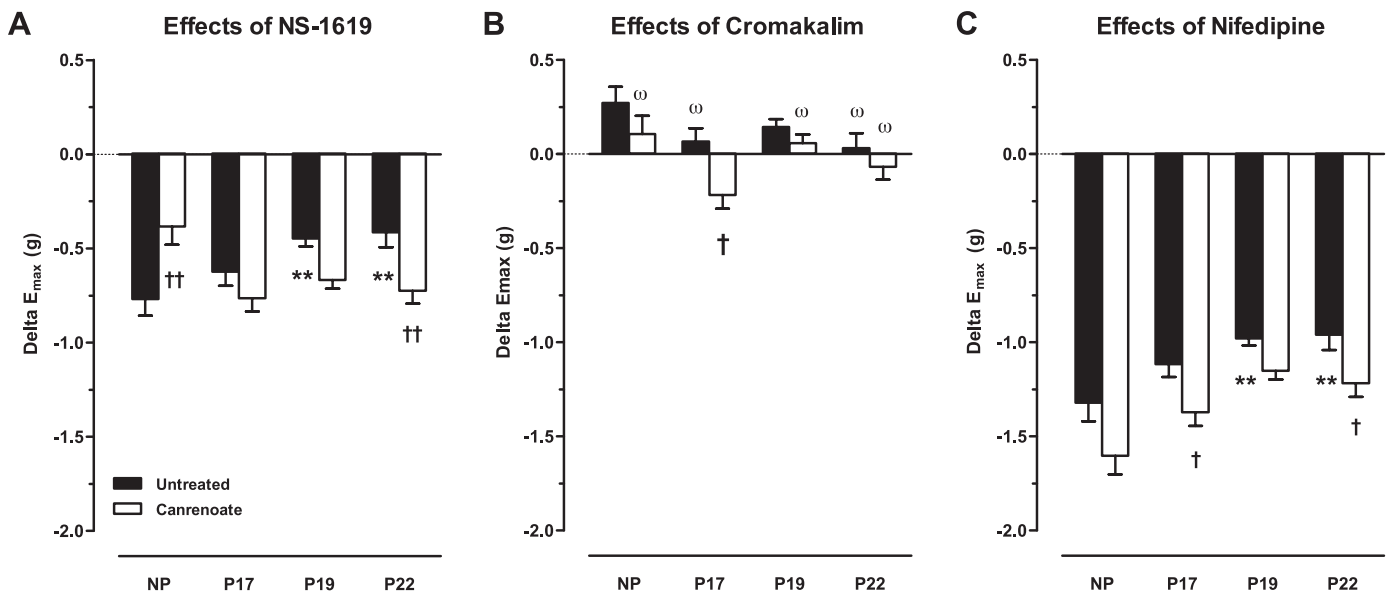


Fig. 3. Differences in E_{\max} of KCl responses between aortas used as controls (first row of lower section of Table 1) and those incubated with NS-1619 (30 $\mu\text{mol/l}$) (A), cromakalim (1 $\mu\text{mol/l}$) (B), or nifedipine (0.1 $\mu\text{mol/l}$) (C). Values are means \pm SE. ** $P < 0.01$, effect of gestation vs. NP untreated. † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$, effect of canrenoate vs. untreated group of same gestational time. ω Data not different from null values.

end of the first trimester, when these compensatory mechanisms are not sufficient anymore, BP starts to drop while vascular dilatation keeps building up.

Moreover, treatment with canrenoate increased the vascular responses of endothelium-denuded aortas to PhE and KCl (Fig. 1, A and B). There are discrepancies concerning signaling mechanisms for aldosterone on vascular reactivity. Heylen et al. (20) reported that, in mesenteric arteries, aldosterone-induced vasodilatation is mediated through MR but resulted in a dual action, endothelium-dependent dilation and smooth muscle-dependent constriction. Furthermore, MR can be activated by both aldosterone and corticosterone, but the presence of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 in VSMC and endothelial cells, converting the latter in inactive cortisone, makes the vasculature more responsive to aldosterone than corticosterone through MR. In the present study, corticosterone levels varied within untreated pregnant groups while no difference was noted between the canrenoate-treated animals (data not shown). However, it is impossible to assess here the impact of corticosterone on the vascular effects of canrenoate treatment in pregnant animals. Recent experiments have shown that aldosterone could act directly on VSM by nongenomic and genomic mechanisms (8, 17, 43), with regulation of ion handling by VSMC being frequently reported. Because ion channels are major partners in the control of vascular reactivity, it could explain how our *in vivo* treatment modified the vascular responses.

Modulation of ion channel activity. Several studies reported involvement of ion channels in the control of vascular reactivity during pregnancy (3, 9, 14, 22, 33, 34). In agreement with previous reports (3, 9), we have observed that PhE responses were greatly reduced by activators of K_{ATP} (cromakalim, $1 \mu\text{mol/l}$) and BK_{Ca} (NS-1619, $30 \mu\text{mol/l}$) while the latter and VDCC inhibitor (nifedipine, $0.1 \mu\text{mol/l}$) were more efficient in inhibiting KCl responses.

In the present experiments, cromakalim exerted an enhanced inhibitory effect on PhE-induced contractions in the aortas of pregnant groups compared with NP ones (Fig. 2B). The inhibitory action of cromakalim is believed to be due to increased probability of the open state of K_{ATP} channels (6). The ATP-to-ADP ratio controls basal K_{ATP} activity in VSMC (15, 16, 29), and we suggest that in pregnancy the ratio could be decreased, resetting basal K_{ATP} activity. It has been shown that K_{ATP} channel activity is increased in VSMC during pregnancy (3, 9, 22), which could be attributed to metabolic changes (19). Moreover, it has been reported that in metabolically inhibited states, such as hypoxia or ischemia, a fall in the intracellular ATP-to-ADP ratio will activate K_{ATP} currents favoring vasodilatation (for review, see Ref. 16). Our results, together with the above considerations, are suggestive of an involvement of MR in this control of K_{ATP} activity in gestation. Indeed, treatment with canrenoate further increased the inhibitory effect of cromakalim in the pregnant groups (Fig. 2B). Further analyses will be necessary to investigate the signaling mechanisms involved in this regulation.

In contrast, our results with NS-1619 show decreased inhibitory effects of the BK_{Ca} activator on PhE and KCl contractions as we get closer to term (Figs. 2A and 3A), indicating different degrees of involvement for both BK_{Ca} and K_{ATP} in the control of VSMC responses during pregnancy. As previously reported (3, 9), K_{ATP} seems to be more involved in the control of resting

membrane potential, by either induced hyperpolarization or retarded development of myotropic responses. On the other hand, it appears that BK_{Ca} activation prevents the full expression of myotropic responses, as suggested by Nelson et al. (27). Because BK_{Ca} are primarily regulated by voltage and intracellular calcium (21), pregnancy could control their activity by influencing the frequency of calcium sparks and membrane potential. However, because their activity is also determined by phosphorylation and by small molecules, such as steroids, fatty acids, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, and reactive oxygen species (21), different signaling pathways could alter BK_{Ca} activity during pregnancy. For example, it has been reported that estrogens can relax arteries through activation of BK_{Ca} (12, 41, 44), and that, during pregnancy, an altered expression of BK_{Ca} subunits contributed to estrogen-mediated increases in ovine uterine blood flow (31, 32). However, in rat aorta, estrogens' treatment did not modify BK_{Ca} expression, suggesting some tissue-selective influence of estrogens on the potassium channel expression (40). Aldosterone can also affect BK_{Ca} activity, since its overexpression in mice altered VSMC BK_{Ca} expression and coronary BK_{Ca} -dependent relaxation (1). Our results clearly revealed some role of the MR in the regulation of BK_{Ca} activity. In the groups treated with canrenoate, inhibition by NS-1619 was reduced in the aortas of NP rats, whereas it was increased in pregnant rats (Figs. 2A and 3A). It is not known if the modulation of BK_{Ca} activity during pregnancy is the result of an altered expression of its subunits, a change in the stoichiometric composition, or a direct effect of aldosterone that would modulate the gating properties of the channel. This is presently under study.

In untreated pregnant animals, the inhibitory effects of nifedipine on KCl were less potent than in NP rats (Fig. 3C). This is consistent with the observation that the blunted responses to vasoconstrictors of pregnancy could be due to some functional VDCC alterations (11, 34). Indeed, Roy et al. (34) showed that extracellular calcium mobilization of aortic ring, through VDCC, was delayed at the end of pregnancy. Here, we report that the reduction of nifedipine's effect gradually appeared as the rats come closer to the end of gestation, indicating that the open probability of VDCC varies during pregnancy to adapt or participate in hemodynamic changes. It is well-documented that the open probability of VDCC is mostly influenced by membrane potential (28), and this correlates the increased BK_{Ca} activity described above with the observed decrease in VDCC activity. Moreover, nifedipine's inhibitory effect is enhanced in the group receiving canrenoate treatment (Fig. 3C), suggesting increased VDCC activity. It is possible that mineralocorticoids impact calcium channels by nongenomic mechanisms either directly or through phospholipase C and protein kinase C (43). Mironneau (25) demonstrated that spironolactone inhibits slow calcium channels of VSMC in a manner similar to that of calcium channel blockers. By analogy, it is possible that canrenoate could act in a similar way since both compounds share the same metabolite, canrenone. The increased inhibitory effect of nifedipine, observed in all groups, could then be an additive effect of channel inhibition by canrenoate. However, our results are consistent with what was noted when the animals received a high-sodium diet (3) that suppressed the RAA system, reinforcing our belief that MR are implicated in the regulation of VDCC activity.

In summary, the present study supports our hypothesis that mineralocorticoids participate in the blunted responses to vasoconstrictors associated with pregnancy. Furthermore, our results demonstrated the involvement of VDCC, K_{ATP} , and BK_{Ca} in the regulation of vascular reactivity and indicate significant regulation of these channels by mineralocorticoids. While these data are indirect measurements of ion channel activity, this study is, to our knowledge, the first to functionally evaluate the involvement of MR in the blunted vascular responses associated with normal pregnancy. Studies are needed to characterize the signaling pathways of mineralocorticoid actions in VSMC during pregnancy. Furthermore, the role of endothelium will need to be assessed to get a full representation of the MR regulation in vivo. The involvement of MR in the control of vascular reactivity as pregnancy gets closer to term could help support the hemodynamic changes that occur simultaneously. Moreover, understanding how they impact vascular reactivity can provide insights in pathologies like preeclampsia, where the RAA system is less activated (36).

ACKNOWLEDGMENTS

Benoit Sicotte and Rébecca Gaudet are acknowledged for technical assistance.

GRANTS

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-84450). M. Provencher and V. Houde received studentship from the CIHR, La Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, and La Fondation des Étoiles.

DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the authors.

REFERENCES

- Ambroisine ML, Favre J, Oliviero P, Rodriguez C, Gao J, Thuillez C, Samuel JL, Richard V, Delcayre C. Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (BK_{Ca}) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 116: 2435–2443, 2007.
- Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MR, Pidgeon J, Soni S. Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 330: 81–93, 1982.
- Auger K, Beausejour A, Brochu M, St-Louis J. Increased Na^+ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K^+ and Ca^{2+} function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1848–H1856, 2004.
- Beausejour A, Auger K, St-Louis J, Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375–H383, 2003.
- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 26: 8–20, 2002.
- Brayden JE. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 312–316, 2002.
- Brochu M, Lehoux JG, Picard S. Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 138: 2354–2358, 1997.
- Cachofeiro V, Miana M, de Las HN, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J, Lahera V. Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 331–335, 2008.
- Cadorete C, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J. Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H567–H576, 2000.
- Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 54: 2056–2063, 1998.
- Crews JK, Novak J, Granger JP, Khalil RA. Stimulated mechanisms of Ca^{2+} entry into vascular smooth muscle during NO synthesis inhibition in pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R530–R538, 1999.
- De WH, Allen M, Holmes C, Stobbart M, Lippiat JD, Callaghan R. Modulation of the BK channel by estrogens: examination at single channel level. *Mol Membr Biol* 23: 420–429, 2006.
- Duprez DA. Aldosterone and the vasculature: mechanisms mediating resistant hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9: 13–18, 2007.
- Ezimokhai M, Osman N. Calcium supplementation is associated with endothelium dependent attenuation of vascular smooth muscle reactivity in normotensive pregnant and nonpregnant rats. *Am J Hypertens* 11: 88–96, 1998.
- Farzaneh T, Tinker A. Differences in the mechanism of metabolic regulation of ATP-sensitive K^+ channels containing Kir6.1 and Kir6.2 subunits. *Cardiovasc Res* 79: 621–631, 2008.
- Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. Muscle K_{ATP} channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 90: 799–829, 2010.
- Funder JW. Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* 147: 5564–5567, 2006.
- Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, Milne CM. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol* 113: 435–444, 1987.
- Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 14: 66–71, 2009.
- Heylen E, Huang A, Sun D, Kaley G. Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 535–542, 2009.
- Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ, Braun AP. Large conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 584: 2033–2042, 2010.
- Keyes L, Rodman DM, Curran-Everett D, Morris K, Moore LG. Effect of K^+ -ATP channel inhibition on total and regional vascular resistance in guinea pig pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H680–H688, 1998.
- McCurley A, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2011 doi: 10.1016/j.mce.2011.06.014.
- Meyer MC, Brayden JE, McLaughlin MK. Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1510–1516, 1993.
- Mironneau J. Calcium channel antagonist effects of spironolactone, an aldosterone antagonist. *Am J Cardiol* 65: 7K–8K, 1990.
- Moutquin JM, Rainville C, Giroux L, Raynauld P, Amyot G, Bilodeau R, Pelland N. A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 151: 191–196, 1985.
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633–637, 1995.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* 259: C3–C18, 1990.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 268: C799–C822, 1995.
- Poston L. Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hypertens* 10: 391–394, 1996.
- Rosenfeld CR, Liu XT, DeSpain K. Pregnancy modifies the large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel and cGMP-dependent signaling pathway in uterine vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1878–H1887, 2009.
- Rosenfeld CR, Roy T, DeSpain K, Cox BE. Large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels regulate basal uteroplacental blood flow in ovine pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 12: 402–408, 2005.
- 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. *Eur J Pharmacol* 280: 1–9, 1995.
- 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. *Biol Reprod* 60: 979–988, 1999.

35. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608–613, 1999.
36. **St-Louis J, Brochu M.** The cardiovascular paradox of pregnancy. *Med Sci (Paris)* 23: 944–949, 2007.
37. **St-Louis J, Massicotte G, Parent A.** Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Méd Sci* 6: 358–365, 1988.
38. **St-Louis J, Pare H, Roy B, Brochu M.** Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Investig* 2: 516–522, 1995.
39. **Torgersen KL, Curran CA.** A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 29: 2–19, 2006.
40. **Tsang SY, Yao X, Wong CM, Chan FL, Chen ZY, Huang Y.** Differential regulation of K⁺ and Ca²⁺ channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 483: 155–162, 2004.
41. **Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R.** Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285: 1929–1931, 1999.
42. **Viengchareun S, Le MD, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le TL, Lombes M.** The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5: e012, 2007.
43. **Wehling M.** Effects of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on intracellular electrolytes. *Heart Fail Rev* 10: 39–46, 2005.
44. **Yu X, Ma H, Barman SA, Sellers M, Stallone JN, Prossnitz ER, White RE, Han G.** Activation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E882–E888, 2011.



**CHAPITRE III: Les modifications de l'activité de la
Na⁺/K⁺-ATPase dans l'aorte des rates gestantes
influencent la fonction des canaux potassiques**

STATUT : En préparation

**MODIFICATIONS OF Na^+/K^+ -ATPASE ACTIVITY IN AORTA OF PREGNANT RATS INFLUENCE
POTASSIUM CHANNELS FUNCTION**

Provencher M^{1,2}, Houde V¹, Théoret Y^{1,2}, Brochu M¹, St-Louis J^{1,2}

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine and Departments of Obstetrics-Gynecology and

²Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running head: Inhibition of mineralocorticoid receptors during pregnancy.

J. ST-LOUIS

Centre de recherche

CHU Sainte-Justine

3175, chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal, QC, Canada H3T 1C5

Email:

Telephone

Fax

ABSTRACT

Mineralocorticoid receptors (MR) are key components of the renine-angiotensin-aldosterone system. We evaluated if they are involved in the reduced vascular reactivity associated with pregnancy through modulation of Na^+/K^+ -ATPase activity. Canrenoate (MR antagonist; 20 mg/kg·d) was administered to pregnant rats from day 15 to 22 of pregnancy. These animals were sacrificed on day 14, 17, 19 and 22 of gestation. Na^+/K^+ -ATPase activity was measured in endothelium-denuded aortic rings by KCl-induced vasorelaxation. Pregnancy induced a reduction of the pump activity at day 19, this effect was reversed by canrenoate. To determine if this response was due to the partial agonist effect of canrenoate on the Na^+/K^+ -ATPase, another group of pregnant animals was treated with PST 2238, an ouabain antagonist of the Na^+/K^+ -ATPase. Once again, the pump activity was increased in the treated group. The reversal, by both treatments, of the reduced activity of the pump induced by pregnancy suggests that it is caused via some interactions with the ouabain-binding site of the pump. Expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits was measured by western blot. Pregnancy did not modify the expression of those proteins. However, the expression of $\alpha 1$ was decreased in the canrenoate-treated groups at the end of pregnancy, suggesting that $\alpha 2$ is responsible for the changes of activity observed. On the other hand, PST 2238 treatment did not significantly change the expression of either protein. Finally, we observed a progressive decrease in TEA-induced contractile responses as pregnancy gets closer to term that parallels the decreased activity of the Na^+/K^+ -ATPase. This lets us believe that the modifications in Na^+/K^+ -ATPase activity, through modification in membrane potential, influenced the potassium channels. However, the diminution in TEA responses was not associated with any change in BK_{Ca} channel expression. Our data confirm that the Na^+/K^+ -ATPase is implicated in the decreased vascular reactivity associated with pregnancy and that this effect is most likely attributable to the $\alpha 2$ subunit. However, even if mineralocorticoids influence $\alpha 1$ expression, these do not appear to be implicated in the regulation of the sodium pump activity during pregnancy.

Key words: Pregnancy, Potassium canrenoate, Rostafuroxin, Na^+/K^+ -ATPase, TEA

INTRODUCTION

It is well established that pregnancy is characterized by significant vascular adaptations that are required for normal pregnancy outcome. It has been demonstrated that peripheral vasculature undergoes major structural and functional changes to insure an adequate blood flow in the uteroplacental circulation for the developing fetus (8; 25; 26; 38; 39). It is known that not only resistance-size arteries manifest these changes but also large conduit arteries, like the aorta, experience blunted reactivity to vasoconstrictors during pregnancy (6; 29; 31; 37). It is believed that these changes occur early during pregnancy to accommodate the increasing blood volume, cardiac output and renin angiotensin aldosterone system (RAAS) while maintaining a normal or decreased blood pressure (7; 9; 34; 37).

Our group has reported that decreased RAAS activity, by increasing sodium intake during the last week of gestation, results in a model of gestational hypertension (4). Furthermore, this model was associated with enhanced vascular reactivity and alterations of potassium and calcium channels function in the aorta (1). These data suggested that the RAAS is involved in the decreased vascular reactivity associated with gestation. In another study, administration of a mineralocorticoid receptor (MR) antagonist during the last week of gestation showed increased aortic vascular reactivity. Moreover, it was shown that mineralocorticoids differently regulated potassium and calcium channels activity in non pregnant and pregnant animals (29). Because of the impact on ion channels, it was suggested that mineralocorticoids could modulate vascular reactivity by influencing membrane potential.

Membrane potential is tightly regulated in vascular smooth muscle cells (VSMC) to insure a precise control of vascular tone and blood flow. Potassium channels and the sodium pump (Na^+/K^+ -ATPase) are major players in this regulation (2; 15). The Na^+/K^+ -ATPase maintains the electrical membrane potential by controlling the sodium and potassium gradients which drives secondary co-/countertransporters. Furthermore, by acting via ATP hydrolysis, it determines a fraction of the cellular metabolic rate (2). Many studies have demonstrated some interactions between the Na^+/K^+ -ATPase and the potassium and calcium channels that would affect their activities; they suggest an

implication of the pump in the control of intracellular calcium concentrations and VSMC contractility (14; 16; 28).

In rodents, the α isoforms of the Na^+/K^+ -ATPase are regulated independently and have different affinities for Na^+ , K^+ and ouabain (17; 36). Moreover, their specific localization in the cell allows a precise regulation of the functions of the pump. The distribution of $\alpha 1$ is ubiquitous fitting with the control of the generalized cellular Na^+ and K^+ homeostasis. On the other hand, $\alpha 2$ is localised in caveolae adjacent to the sarcoplasmic reticulum (SR). This location allows it to modulate SR functions via colocalization with other ion channels and thus affect vascular contractility (17; 36). The ouabain-binding site of $\alpha 2$ was even implicated in maintaining normal blood pressure in late pregnancy (24).

The gene expression of the different isoforms (4 α and 3 β subunits) seems to be differently regulated by estradiol, mineralocorticoids and glucocorticoids or a combination of the above (22; 27). Moreover, the cardiostonic steroids (CTS) also influence the activity of Na^+/K^+ -ATPase by either inhibiting its ionic pump action or by using it as a receptor that activates proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Src)/epidermal growth factor receptor (EGFR) complex to initiate multiple signaling pathways (2; 18; 23; 42). Since steroid hormones are elevated in pregnancy (2; 7; 30; 33), it is expected that Na^+/K^+ -ATPase expression and activity will be modified in this condition.

As we have previously demonstrated that MR influence vascular reactivity of the aorta during pregnancy (29), we hypothesized that aldosterone induces these modifications by altering the activity of Na^+/K^+ -ATPase and potassium channels. To confirm this, pregnant rats were treated with potassium canrenoate, a MR antagonist, during the last week of pregnancy. The objectives were to characterize Na^+/K^+ -ATPase and potassium channels activity in the aorta with pharmacological tools and to evaluate the expression of their catalytic subunits.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experimental procedures were reviewed and approved by the local Animal Care Committee, accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, QC, Canada), weighing between 225 and 250 g, were used. Pregnant rats were obtained as detailed previously (4) and they were separated in groups according to gestational age (14, 17, 19 and 22 days of gestation, parturition on day 23). The animals (9-10 per group) were housed under conditions of controlled lighting (6 AM to 6 PM) and temperature ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) and they were fed a normal diet containing 0.23% NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad; Montréal, QC, Canada). The animals were randomly assigned to 2 groups that either continued drinking tap water or were switch to a potassium canrenoate (C) solution diluted in tap water (20 mg/kg·day; Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) from day 15 of gestation until sacrifices. Rats of gestational day 14 served as pre-treatment control. At each selected time of treatment, days 14 (P14), 17 (P17, PC17), 19 (P19, PC19) or 22 (P22, PC22) of gestation, the 7 pregnant (P) groups of rats were decapitated (9–9:30 AM). The aorta was removed for *in vitro* assays and western blot analysis, and blood was collected for canrenone measurements.

Another group of pregnant rats, housed in similar conditions, were randomly assigned to 2 groups that either received PST 2238 (1 mg/kg·day s.c.; Prassis/SigmaTau, Milan, Italy) or vehicle during the last week of pregnancy. The animals were euthanized by decapitation on the 22nd day of pregnancy and the aorta was removed for *in vitro* assays and western blot analysis.

Organ Bath Assay

Vascular reactivity was measured, as described previously (1), in thoracic aortic rings of untreated and canrenoate-treated pregnant rats at day 14, 17, 19 and 22 of gestation as well as in the PST 2238-treated rats. After sacrifice, the thoracic aorta was removed rapidly, immersed in cold Krebs-bicarbonate solution (KBS), cleaned of fat and extraneous tissues, 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, to measure changes of myotropic responses at the level of the smooth muscle. Indeed, as the vascular endothelium

influences reactivity of the underlying smooth muscle (via NO, EDHF, etc.) by activating coupling mechanisms similar to the ones used by the agonists on smooth muscle (for instance, the ion channels herein studied), we chose to remove it in order to get a precise picture of the consequences on the vascular smooth muscle. The rings were mounted in individually jacketed tissue baths (15 ml; Radnotti Glass, Monrovia, CA, USA) maintained at 37°C and equilibrated for 1 h under 2.0 g passive tension with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in KBS of the following composition (in mmol/L): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂•2H₂O, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄, and 5.5 dextrose. NaCl and MgSO₄ were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada); KCl, KH₂PO₄ and NaHCO₃ from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada); dextrose was supplied by J.T. Baker Chemicals (Phillipsburg, NJ) and CaCl₂ from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). The solution was bubbled with a mixture of 95% O₂-5% CO₂; pH was 7.4. After 1 h equilibration, the tissues were challenged with 1.0 μmol/L phenylephrine (PhE). At the plateau response, carbachol (0.1 mmol/L) was added to verify endothelium removal. Tension was measured by force displacement transducers, and recorded on a computerized data-acquisition system (Dataq Instruments, Akron, OH, USA).

After return to baseline (~60 min), cumulative concentration-response curves to tetraethylammonium (TEA) (0.3-30 mmol/L) were obtained on aortic rings with or without preincubation with a low dose of KCl (10 mmol/L) as used previously (6). One hour after tension from the previous maneuver had returned to baseline and frequent washing, the following protocol was initiated. The vessels were bathed in a KBS solution without potassium (KCl was omitted and KH₂PO₄ was replaced with NaH₂PO₄). At the plateau of contraction to PhE (10⁻⁶ mol/L), concentration-response curve to KCl (1-10 mmol/L) was measured. One of the rings from each group served as the control, whereas each of the other 3 were preincubated with different concentrations of ouabain (0.01, 0.03 and 0.1 mmol/L; Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) 10 min before we initiate the contraction to PhE. It has been demonstrated that in a Krebs solution without potassium, the relaxation to KCl, of a precontracted blood vessel, is proportional to the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase (40). The responses are given in relative (%) relaxation of the precontraction to PhE. In the potassium-free solution, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase is inhibited and sodium accumulates in the cells. When potassium is gradually reintroduced, the sodium pump is activated and is stimulated by the high intracellular concentration of sodium. This results in

hyperpolarisation which decreases membrane excitability and causes the relaxation that we observed in the first part of the curve. Once the Na^+/K^+ -ATPase reduces the intracellular sodium concentration toward normal, its activity decreases and the membrane potential returns to normal (5; 40). The subsequent doses of KCl will then induce depolarization of the cell and we observed a return of the contraction. The addition of ouabain, by inhibiting the Na^+/K^+ -ATPase, delays the return to normal of membrane potential and thus right-shifted the curves, proportionally to the concentration added.

Western blot

To prepare one sample, 2 thoracic aortae (or 4 halves aorta) from different rats were pooled, frozen in liquid nitrogen, and crushed together. Tissues were homogenized in cold buffer (20 $\mu\text{mol/L}$ Hepes, 1% NP-40 Alternative, pH 7.4, 10% protease inhibitors cocktail (Complete Mini, EDTA-free; Roche Diagnostics, USA)). Homogenates were centrifuged at 3000rpm for 10 min. Protein concentration was determined with the Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) with bovine serum albumin as standard. The supernatants collected were resuspended in Laemmli buffer. Proteins (40 $\mu\text{g/lane}$), with rat brain microsomes (RBM; Millipore, Temecula, CA, USA) as positive control, were separated by 8% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked in 5% dry skim milk in Phosphate buffer Saline - 0.1% Tween 20 (PBST). Afterward, membranes were incubated with rabbit anti- $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ (BK_{Ca}) (diluted 1:500 in PBST; Alomone labs, Jerusalem, Israel) or with mouse anti- $\text{Na/K-ATPase } \alpha 1$ subunit monoclonal antibodies or with rabbit antiserum for $\text{Na/K-ATPase } \alpha 2$ subunit (both diluted 1:1000 in PBST; Millipore, Temecula, CA, USA). After washing with PBST, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated either sheep anti-mouse immunoglobulin or donkey anti-rabbit immunoglobulin (both diluted 1:4000 in PBST; Amersham Bioscience, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK). After a second set of washing, immunoreactive bands were visualized by exposition to ECL chemoluminescence detection system (Amersham Bioscience, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK). Equal protein loading was determined on the same membrane with mouse anti- β -actin primary antibodies (Abcam, Cambridge, MA, USA).

Serum Canrenone Levels by High-Performance Liquid Chromatography

Analyses were performed on a Hitachi Elite LaChrom system possessing an L-2130 pump, an L-2200 autosampler and an L-2450 diode array detector (Hitachi High Technologies America Inc., Pleasanton, CA, USA). Data were acquired and integrated using EzChrom Elite software (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA). Chromatographic separation was achieved using a Waters Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm, 4 μ m) analytical column preceded by a filter at room temperature. The mobile phase, consisting of acetonitrile: water (40:60), was filtered, degassed and pumped at a flow rate of 1 mL/min. The detection was carried out at 300 nm.

Calibration curve was prepared as follows. A stock of pooled rat serum containing 358.3 pmol/mL canrenone (Spectrum chemicals and laboratory supplies, New Brunswick, NJ) was diluted serially with drug-free serum to give final serum concentrations ranging from 11.5 to 358.3 pmol/mL. Standards and serum samples (400 μ L) were extracted using Oasis HLB cartridges (1 cc/30 mg) (Waters Ltd, Lachine, Qc, Canada). The eluents were collected in borosilicate glass tubes and evaporated to dryness at 37°C under nitrogen using a Zymark TurboVap LV Evaporator Workstation. The pellet was reconstituted in 100 μ L of mobile phase and 75 μ L aliquot was injected onto the HPLC system.

Statistical Analysis

Concentration-response curves to TEA in presence of KCl were analyzed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation (Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the concentration producing the EC_{50} and the maximum asymptote of the curve (E_{max}). The effect of the progression of pregnancy and of canrenoate treatment on E_{max} and EC_{50} was evaluated.

The relaxations of the KCl concentration-response curves are expressed as a percentage of the initial PhE contraction. Maximal relaxation was determined graphically. The relaxing part of the curve was analyzed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation (Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA), where the maximal relaxation value was extrapolated from the graph, to evaluate the concentration producing the IC_{50} . The effect of the

progression of pregnancy and of canrenoate or PST 2238 treatments on the maximal relaxation and the estimated IC_{50} was evaluated.

Data from organ bath assays, western blot analysis and canrenone measurement for the groups treated with canrenoate and their controls were analyzed by 1-way analysis of variance (ANOVA). When significant, a *post hoc* Bonferroni was performed to assess the impact of pregnancy and potassium canrenoate treatment (Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA). Data from organ bath assays and western blot analysis for the group treated with PST 2238 and its control were analyzed by a Student T test (Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA). All results are expressed as mean values \pm standard errors of the mean (SEM). In the organ bath assays, numbers in parentheses correspond to the number of aortae studied while in the western blot analysis they correspond to the number of samples analyzed (each samples being a pool of at least two aortae from different animals). Statistical significance was assumed when the difference reached the probability level of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Canrenone serum level

Canrenone was present in the serum of animals of all the groups treated with the MR antagonist. Levels were statistically identical in the different groups of pregnant animals (PC17 (N=11): 79.8 ± 8.3 , PC19 (N=11): 87.7 ± 7.2 , PC22 (N=12): 140.0 ± 30.8 pmol/L). Of course, no canrenone was detected in the serum of the untreated groups.

Sodium pump activity

Figure 1 displays the relaxing curves to KCl, at different stages of pregnancy, of control aortae (circles) and aortae treated with 0.03 mmol/L ouabain (squares) (graphical data for the aortae treated with 0.01 and 0.1 mmol/L ouabain are not shown but they induced a concentration-dependent inhibition). The plateau contraction to PhE, in gram-tension, was similar in all the groups studied (data not shown). The control curves for untreated animals (closed circles) show reductions of Na^+/K^+ -ATPase activity as pregnancy progresses to term; although only significant on day 19 of pregnancy (maximal relaxation of P19: $38.0 \pm 4.6\%$ vs P14: $71.5 \pm 6.6\%$, $p < 0.05$; Fig. 1 C vs A, closed circles). However, the

sensitivity of the aortic rings to ouabain inhibition is not affected by progression of the pregnancy as shown by similar estimated IC_{50} for the relaxation part of the curve in the presence of each concentration of ouabain in the untreated groups (Table 1). On the other hand, when the animals were treated with canrenoate, maximal relaxation to KCl was similar in the three groups of animals (PC17: $59.1 \pm 6.4\%$, PC19: $63.9 \pm 7.0\%$ and PC22: $48.3 \pm 8.8\%$; Fig. 1 opened circles). This resulted in the restoration of the Na^+/K^+ -ATPase activity on day 19 (maximal relaxation of PC19: $63.9 \pm 7.0\%$ vs P19: $38.0 \pm 4.6\%$, $p < 0.01$; Fig. 1C, circles). However, this effect did not persist on day 22 of pregnancy. As reported in Table 1, the inhibitory effect of ouabain on the sodium pump was not affected by the canrenoate treatment.

To evaluate if the effects observed with canrenoate were related to its partial agonist function on the pump or to its effect as an MR inhibitor, Na^+/K^+ -ATPase activity was evaluated in aortae of pregnant rats treated with PST 2238, an ouabain antagonist on the Na^+/K^+ -ATPase. Figure 2 shows the relaxing curve to KCl of control aortae (circles) and aortae treated with 0.03 mmol/L ouabain (squares) (graphical data for the aortae treated with 0.01 and 0.1 mmol/L ouabain are not shown). PST 2238 increased significantly Na^+/K^+ -ATPase activity at 22 days of pregnancy (maximal relaxation for P22: $22.2 \pm 5.5\%$ vs PPST 2238: $58.5 \pm 7.9\%$, $p < 0.01$; Fig. 2, circles). Furthermore, the inhibiting effects of the different concentrations of ouabain were not affected by the treatment to PST 2238 as confirm by the estimated IC_{50} of the relaxing part of the curve (data not shown).

Expression of the sodium pump

We measured the expression of the two catalytic subunits of the Na^+/K^+ -ATPase ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) most abundant in the VSMC by western blot in the aortae of all the groups. The upper panels of figures 3 and 4 illustrate an example of the blot for each subunit. Our results show that the expression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ was not modified by the progression of pregnancy (Fig. 3). This suggests that the difference of activity noted in the P19 group is not related to the expression of the pump. However, the protein expression of $\alpha 1$ was decreased at day 19 and 22 of pregnancy in the group receiving potassium canrenoate, although significantly only at day 22 because of the small number of samples (Figure 3A). On the opposite, $\alpha 2$ expression was not modified by the treatment (Figure 3B). This may suggest that $\alpha 2$ compensate for the decrease in $\alpha 1$ to maintain and increase the activity of

the pump detected in the organ baths or that metabolic factors (ATP/ADP ratio for example) had a stronger influence. In the group treated with PST 2238, we can observe a tendency for an increase in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits expression, although not significant since we have a small number of samples with a large distribution (Fig. 4).

Effects of TEA

Responses to TEA, a non selective K^+ channel blocker, were obtained in denuded aortic rings of pregnant rats at different stages of pregnancy (Fig. 5). It was previously demonstrated that aortae from pregnant rats do not respond to TEA while non pregnant ones respond in a dose-dependent manner (1; 6). Our results confirm this lack of response at the end of pregnancy (Fig. 5D; solid squares). Furthermore, we showed that this lack of response gradually appeared as one gets closer to term (Fig. 5 A-D, close squares). Canrenoate treatment, on the other hand, did not change this fall in reactivity (Fig. 5 B-D, open squares). When 10 mmol/L KCl was added in the bathing solution, a small increase in tone (between 0.1 and 0.6 g) was obtained in all the groups, although the response to KCl at day 17 of pregnancy was hindered by canrenoate (Fig.5B, circles). Following the addition of KCl, a dose-response curve to TEA was measurable in all the groups (Fig. 5, circles). The profile of decreased maximal responses was kept as we got closer to term (closed circles). Again, maximal responses were not affected by the canrenoate treatment (open circles). On the other hand, on day 17 (Fig. 5B) and 22 (Fig. 5D) of gestation, a clear right-shift of the curve was recorded in the canrenoate treated groups, although not significant. This shift could indicate that the aortae of those groups are less sensitive to the K^+ -channel blocker. However, on day 19 (Fig. 5C), we did not observe this deviation to the right, suggesting that at this stage of pregnancy, canrenoate had a different influence on the potassium channels activity.

Expression of BK_{Ca} channels

We measured the expression of the pore forming subunit of the BK_{Ca} channels (α subunit) by Western blot analysis in the aortae of all the groups. Figure 6 upper panel shows an example of the blot for each group. The lower panel illustrates that the progression of pregnancy did not alter the expression of the protein nor did the canrenoate

treatment. We can thus conclude that the difference of responses to TEA described above is not due to a change in the expression of the catalytic subunit of the BK_{Ca} channel.

DISCUSSION

The present study was undertaken to determine if mineralocorticoids, through Na⁺/K⁺-ATPase, influences vascular reactivity during pregnancy. To do so, pregnant rats were treated with a MR antagonist, canrenoate, during the last week of pregnancy and Na⁺/K⁺-ATPase activity was evaluated in denuded thoracic aortic rings of these animals at different times of gestation. Our results demonstrate that as pregnancy progress, vascular Na⁺/K⁺-ATPase activity is decreased as shown by the significant reduction of maximal relaxation to KCl at 19 days of gestation *versus* 14 days of gestation. When the aortae were treated with ouabain, the relaxation to KCl was delayed in a dose-dependent manner as demonstrated by the estimated IC₅₀ in table 1. However, time of pregnancy did not influence the sensitivity of the vessel to ouabain. Our results are in agreement with those of Fedorova et al. (10) that showed decreased Na⁺/K⁺-ATPase activity in aortae of pregnant rats and linked this effect to the increase of cardiotonic steroids during pregnancy. Canrenone (metabolite of canrenoate) can act as a partial agonist of the digitalis receptor site on the Na⁺/K⁺-ATPase, antagonizing ouabain binding, besides its action as a MR antagonist (2; 13; 35; 41). This function of canrenoate could be responsible for the reversal of the inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity observed at day 19 in the canrenoate-treated group. The fact that this effect cannot be observed at day 22 could be related to the dose of canrenoate administered. Indeed, Fedorova et al. (10) reported that at day 19 of gestation, endogenous ouabain and marinobufagenin levels are in the nanomolar ranges while the concentrations of canrenone in our animals are in the picomolar ranges at all times studied. Other studies have shown that canrenone concentrations need to be in the micromolar range to reverse the inhibition by ouabain (3; 13). According to this, the concentrations of canrenone in our treated animals at day 22 of pregnancy could be insufficient to reverse cardiotonic steroids inhibitory effects on the Na⁺/K⁺-ATPase at the end of pregnancy.

To confirm that the effects observed with canrenoate were due to its partial agonist activity, another group of pregnant rats were treated with PST 2238 for the last

week of pregnancy. PST 2238 is a steroid compound designed to act as an endogenous ouabain antagonist on the Na^+/K^+ -ATPase (11; 12). Our results demonstrated that when we block the action of endogenous cardiotonic steroids at the end of pregnancy, Na^+/K^+ -ATPase activity is restored. We thus suggest that the effects observed with canrenoate are related to the inhibition of the binding of cardiotonic steroids molecules to the Na^+/K^+ -ATPase.

We cannot exclude the MR antagonist action of canrenoate and its possible effect on the genomic responses of aldosterone. We wanted to determine if the observed differences in activity of the pump were due to a change in the expression of the catalytic subunit of Na^+/K^+ -ATPase. Fedorova et al (10) previously demonstrated a slight increase of $\alpha 1$ and no change in $\alpha 2$ subunits expression in the aortae of pregnant rats at 19 days of gestation *versus* virgin animals. Our results showed no modification of $\alpha 1$ or $\alpha 2$ subunits in the untreated groups even if the activity of the pump was reduced at the end of pregnancy. This suggests that even if the steroid hormones are highly elevated during pregnancy, there must be mechanisms that insure a normal expression of the sodium pump in the aorta during pregnancy. Furthermore, this emphasizes that the decreased activity is caused by inhibition of the pump. In the groups receiving canrenoate, we noted a decreased expression of $\alpha 1$ at day 19 and 22 of gestation while $\alpha 2$ expression was unaffected. This makes us believe that the expression of the two α subunits is differently regulated and that mineralocorticoids are mostly responsible for the control of the expression of $\alpha 1$. However these observations are in opposition with those of Michea et al. (22), who showed, in aortae from adrenalectomized (ADX) rats and ADX rats with deoxycorticosterone supplement (ADX-DOCA), modification in the $\alpha 2$ expression while $\alpha 1$ remains unchanged. However, pregnancy is a special condition in which other hormones, that are thought to influence Na^+/K^+ -ATPase expression, are elevated, like estradiol that can upregulate the expression of $\alpha 2$ (27). A complete profile of the genomic effects of steroid hormones on the Na^+/K^+ -ATPase expression during pregnancy will be necessary to shed light on this issue. Nonetheless, our results suggest that $\alpha 2$ compensates for the decrease in $\alpha 1$ and was responsible for the changes of Na^+/K^+ -ATPase activity observed in the organ baths. This will fit with the data of Shelly et al. (36) demonstrating that the different isoforms of the Na^+/K^+ -ATPase differ functionally and that the $\alpha 2$ isoform couples more strongly to activation-relaxation pathways.

Curiously, in the animal treated with PST 2238, we observed a tendency for an increase of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits expression. How PST 2238 induces increased expression of Na^+/K^+ -ATPase? One explanation is by preventing the binding of endogenous cardiotonic steroids, PST 2238 has disrupted ouabain-induced signaling for endocytosis and protein degradation in the intracellular compartments. It has been demonstrated that ouabain binding to Na^+/K^+ -ATPase expressed in the plasma membrane initiates internalization of the Na^+/K^+ -ATPase and compartmentalization of some signaling molecules (e.g. c-Src, EGFR, and ERK1/2) (19; 23). However, because the expression of the Na^+/K^+ -ATPase was examined using whole aortae, the subcellular distribution of the pump is unresolved. Further analysis of the expression is necessary to determine if the different expression could be the result of a defective endocytosis or an increase of the novo proteins.

Activity of the sodium pump can influence the activity of other ionic channels by controlling Na^+ and K^+ gradients and membrane potential of the cell. It has been demonstrated that VSMC are hyperpolarized during pregnancy (21) and we suggest that this hyperpolarisation appears gradually with the decreased activity of the Na^+/K^+ -ATPase as the pregnancy progress. This is also supported by the progressive inhibition of TEA responses (E_{max}) as we get closer to term. TEA is a non selective potassium channel inhibitor and we have previously reported that aortae of pregnant rats do not respond to TEA unless the aorta is preincubated in a low concentration (10 mM) of depolarising KCl (1; 6). In aortae of hypertensive rats, a potentiation of the contractile response to TEA was linked to increased density of BK_{Ca} currents (32) and enhanced expression of the channel (20). It was previously shown that the inhibitory effect of NS-1619 (activator of BK_{Ca}) on PhE and KCl vasoconstrictions faded progressively as pregnancy got closer to term; suggesting a modulation of BK_{Ca} activity (29). However, the present results show that the expression of the catalytic subunit of BK_{Ca} was not altered by the progression of the pregnancy and cannot be link to the decreased E_{max} of TEA responses.

Canrenoate treatment did not influence E_{max} of TEA responses. On the other hand, we noticed a tendency for a decreased response, similar to a loss of sensitivity of the aortae to TEA, at day 17 and 22 of gestation, an effect that was absent at day 19. The increased Na^+/K^+ -ATPase activity at day 19 in the canrenoate-treated group could influence the activity of potassium channels. An increase activity of the Na^+/K^+ -ATPase would induce a

decrease in the ratio ATP/ADP. If the pump is in close proximity of K_{ATP} channels (for example in a microdomain such as the calveole) it would change the local environment of these channels and could induce the activation of K_{ATP} currents (14). This is compatible with the lack of effect of canrenoate treatment at day 19 of gestation, on cromakalim (activator of K_{ATP}) inhibitory effect on PhE responses previously observed (29). The proximity and possible interactions between the Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ subunit and the K_{ATP} channels in microdomains will need to be further investigated.

In summary, this study showed that Na^+/K^+ -ATPase activity is gradually decreased during pregnancy and that this effect appears to be mediated through inhibition of the ouabain-binding site of the $\alpha 2$ isoform. Furthermore, we demonstrated that the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase correlated with the activity of potassium channels. This suggests that the sodium pump might be responsible for the decrease vascular reactivity linked to pregnancy. Contrary to our hypothesis, mineralocorticoids are apparently not involved in the changes of Na^+/K^+ -ATPase activity, although they modified $\alpha 1$ expression at the end of the pregnancy; cardiotonic steroids are believed to be logical candidates. Genomic studies are required to further explore the regulation of Na^+/K^+ -ATPase expression during pregnancy and the impact of such modifications in the aorta.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-84450). M.P. and V.H. received studentship from the CIHR, La Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine and La Fondation des Étoiles. Benoit Sicotte, Rébecca Gaudet, Christiane Drouin and Susanne Malouin are acknowledged for their technical assistance. We thank Prassis-Sigma Tau (Milan, Italy) for supplying PST 2238.

Table 1

Estimated sensitivity^x of aortic rings to the relaxing effect of KCl in absence (control) and presence of different concentrations of ouabain (0.01, 0.03 and 0.1 mM)

Canrenoate/ Ouabain	14 days Pregnant	17 days Pregnant		19 days Pregnant		22 days Pregnant	
	-	-	+	-	+	-	+
Control	2.58 ±0.04	2.65 ±0.04	2.68 ±0.03	2.61 ±0.05	2.61 ±0.04	2.63 ±0.05	2.67 ±0.05
0.01 mM	2.64 ±0.07	2.56 ±0.05	2.58 ±0.05	2.54 ±0.07	2.53 ±0.08	2.51 ±0.05	2.48 ±0.03
0.03 mM	2.41 ±0.04	2.44 ±0.04	2.49 ±0.05	2.46 ±0.05	2.36 ±0.05	2.47 ±0.04	2.39 ±0.02
0.1 mM	2.28 ±0.06	2.20 ±0.03	2.31 ±0.06	2.28 ±0.06	2.22 ±0.07	2.26 ±0.06	2.28 ±0.07

^xValues are means of Log of IC₅₀ ± SEM.

Figure 1

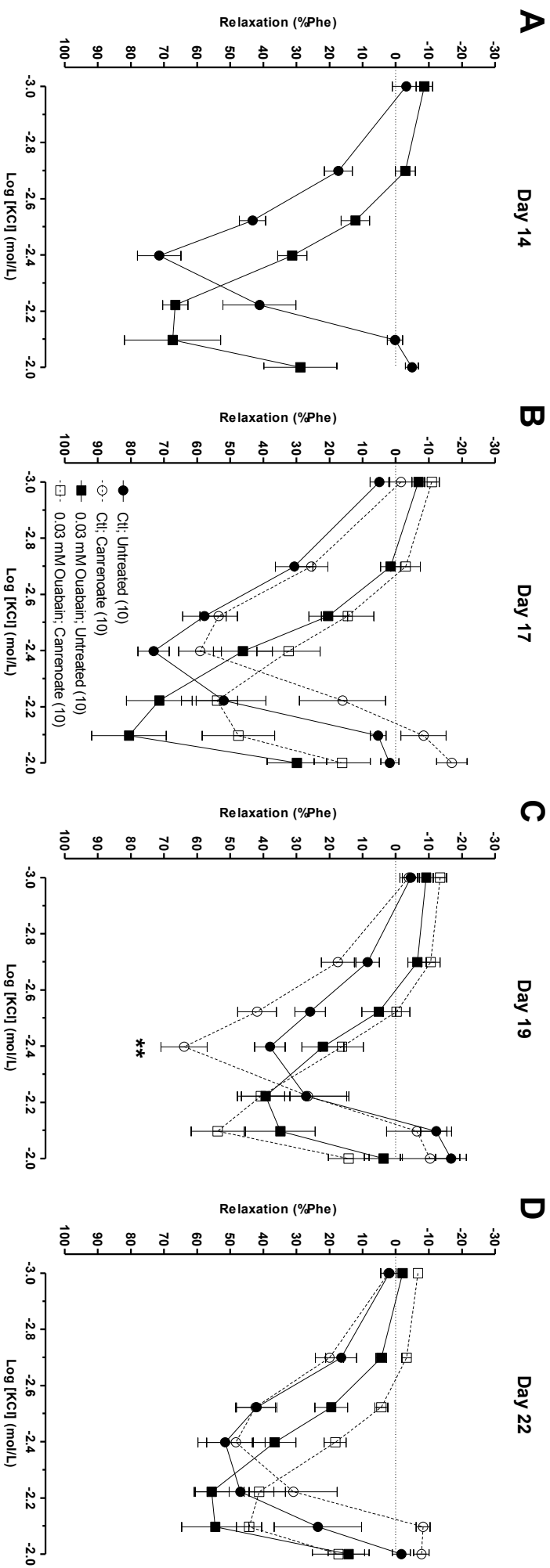


Figure 2

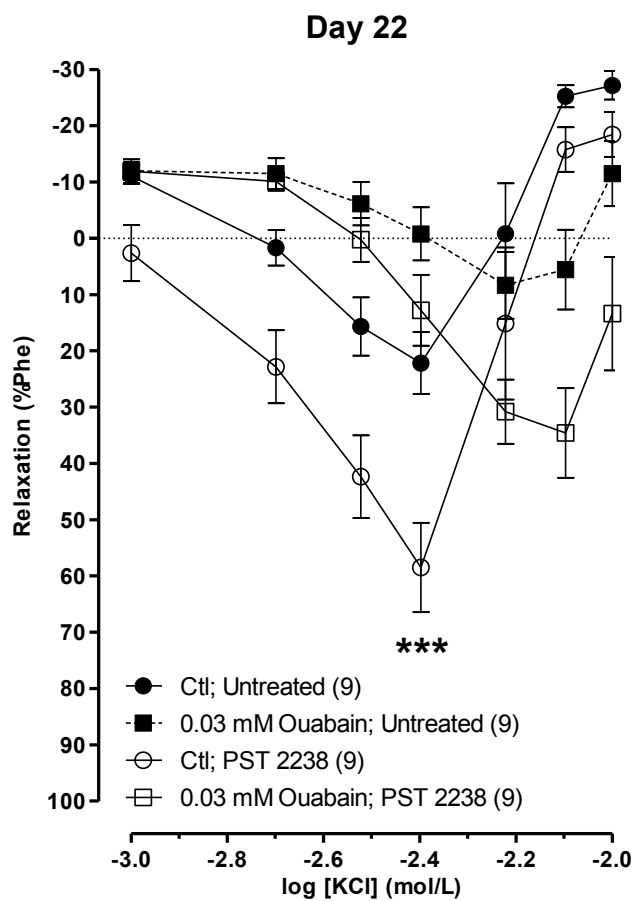


Figure 3

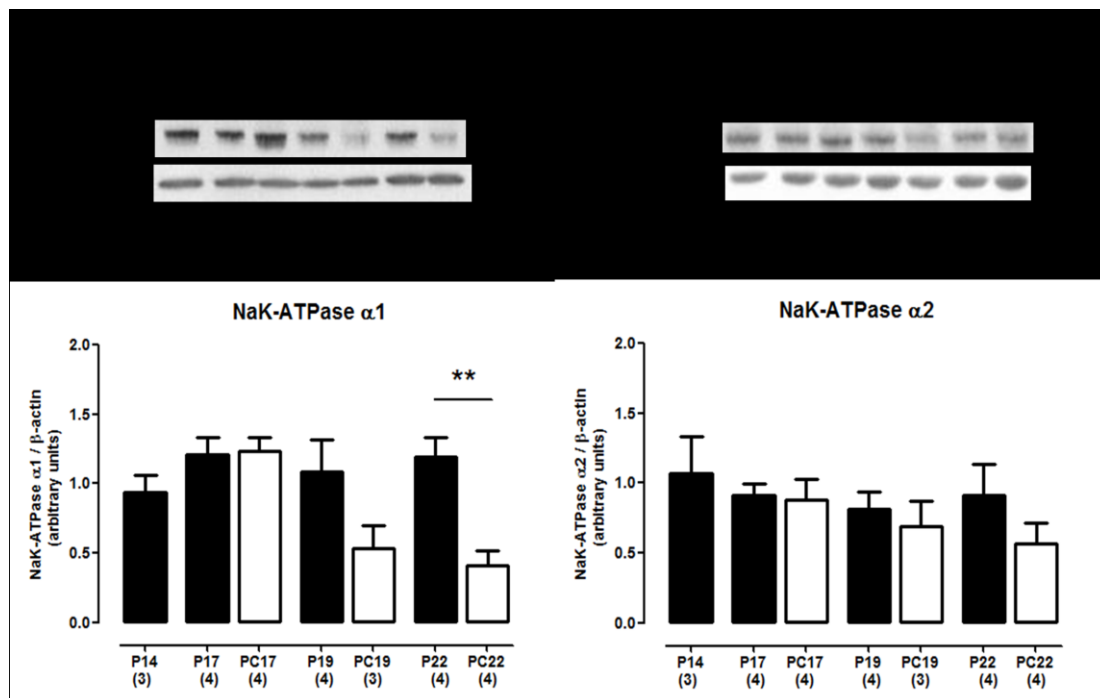


Figure 4

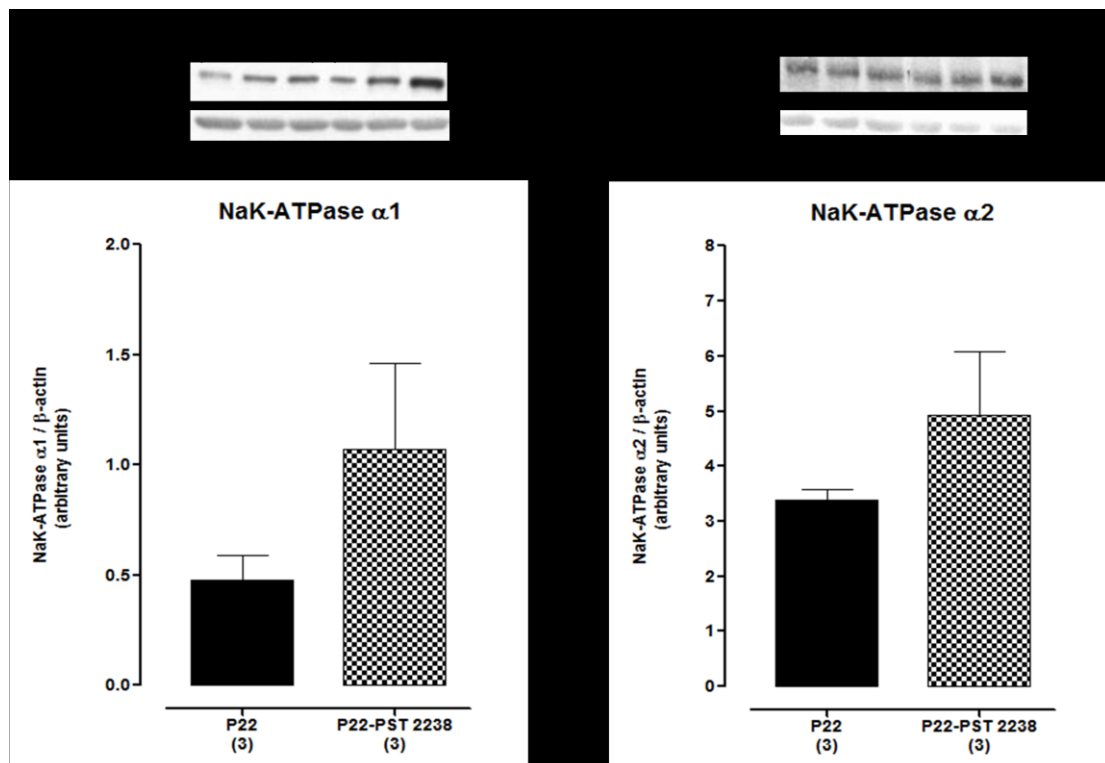


Figure 5

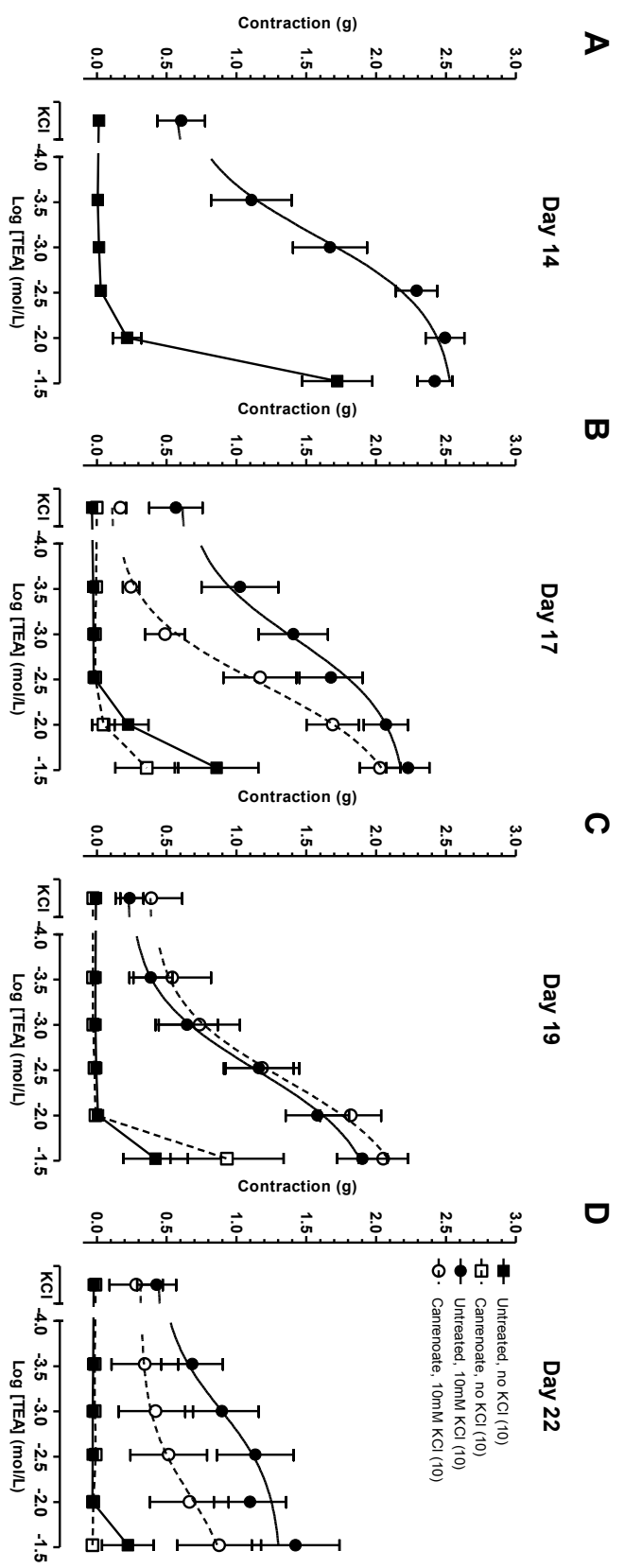
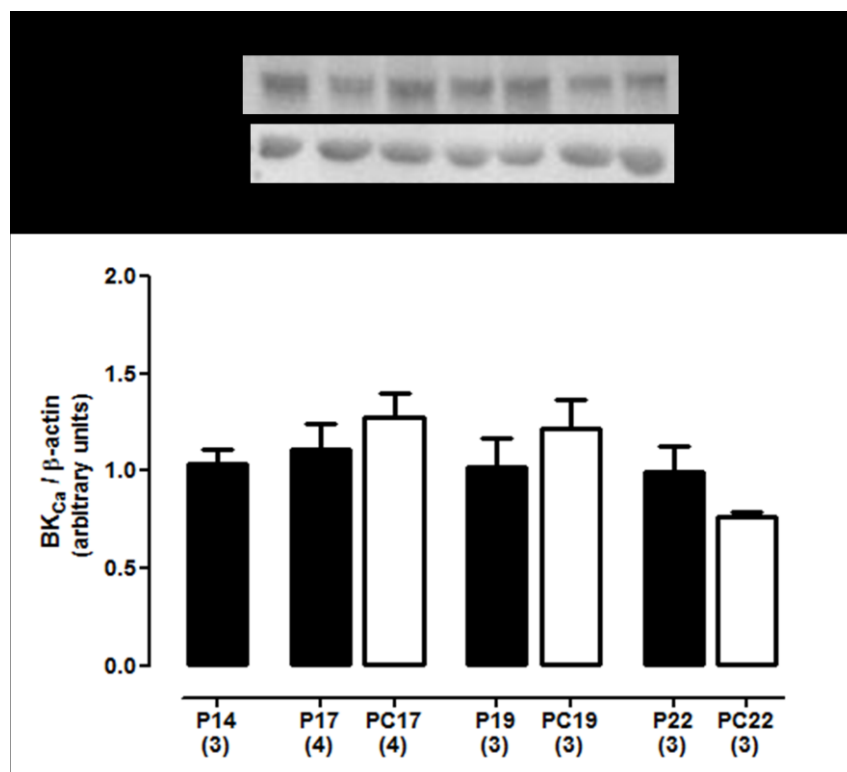


Figure 6



FIGURES LEGEND

Figure 1: Potassium-induced relaxation of endothelium-denuded aortic rings following contraction by PhE in absence (circles) or presence of ouabain (0.03 mM; squares) from untreated (closed symbols) and canrenoate-treated (opened symbols) rats at day 14 (A), 17 (B), 19 (C) and 22(D) of gestation. Values are means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of rats tested. ** $p < 0.01$ effect of canrenoate vs untreated group of same gestational time.

Figure 2: Potassium-induced relaxation of endothelium-denuded aortic rings following contraction by PhE in absence (circles) or presence of ouabain (0.03 mM; squares) from untreated (closed symbols) and PST 2238-treated (opened symbols) rats at day 22 of gestation. Values are means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of rats tested. *** $p < 0.001$ effect of canrenoate vs untreated group.

Figure 3: Expression of the $\alpha 1$ (A) and $\alpha 2$ (B) subunits of the Na^+/K^+ -ATPase in the aortae of pregnant rats at different stages of pregnancy and treated or not with canrenoate. Representative immunoblots are shown in the upper panels. Data from densitometric analysis are expressed in arbitrary units relative to β -actin as means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of samples. One sample is composed of 2 aortae from different animals of a same group. ** $p < 0.01$ effect of canrenoate vs untreated group of same gestational time.

Figure 4: Expression of the $\alpha 1$ (A) and $\alpha 2$ (B) subunits of the Na^+/K^+ -ATPase in the aortae of untreated pregnant rats at day 22 and of PST 2238 pregnant rats at the same gestational age. Representative immunoblots are shown in the upper panels. Data from densitometric analysis are expressed in arbitrary units relative to β -actin as means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of samples. One sample is composed of 3 aortae from different animals of a same group. * $p < 0.05$ effect of PST 2238 vs untreated group.

Figure 5: Concentration-response curves to tetraethylammonium (TEA) of endothelium-denuded aortic rings of pregnant rats at day 14 (A), 17 (B), 19 (C) and 22(D) of gestation

from untreated animals (closed symbols) and canrenoate-treated one (open symbols). Curves were obtained in the absence (squares) and presence (circles) of 10 mmol/L hypertonic KCl for both groups of rats. Values are means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of rats tested.

Figure 6: Expression of the calcium-activated potassium channel (BK_{Ca}) α subunit in the aortae of pregnant rats at different stages of pregnancy and treated or not with canrenoate. Representative immunoblots are shown in the upper panel. Data from densitometric analysis are expressed in arbitrary units relative to β -actin as means \pm SEM. Numbers in parentheses represent the number of samples. One sample is composed of 2 aortae from different animals of a same group.

Reference List

1. **Auger K, Beausejour A, Brochu M and St-Louis J.** Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1848-H1856, 2004.
2. **Bagrov AY, Shapiro JI and Fedorova OV.** Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61: 9-38, 2009.
3. **Balzan S, Nicolini G, Bellitto L, Ghione S, Biver P and Montali U.** Effect of canrenone on the digitalis site of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in human placental membranes and in erythrocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 32-36, 2003.
4. **Beausejour A, Auger K, St-Louis J and Brochu M.** High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375-H383, 2003.
5. **Brochet DX and Langton PD.** Dual effect of initial [K] on vascular tone in rat mesenteric arteries. *Pflugers Arch* 453: 33-41, 2006.
6. **Cadorette C, Sicotte B, Brochu M and St-Louis J.** Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H567-H576, 2000.
7. **Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T and Schrier RW.** Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 54: 2056-2063, 1998.
8. **Cipolla M and Osol G.** Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* 171: 805-811, 1994.
9. **Edouard DA, Pannier BM, London GM, Cuche JL and Safar ME.** Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol* 274: H1605-H1612, 1998.

10. **Fedorova OV, Kolodkin NI, Agalakova NI, Namikas AR, Bzhelyansky A, St-Louis J, Lakatta EG and Bagrov AY.** Antibody to marinobufagenin lowers blood pressure in pregnant rats on a high NaCl intake. *J Hypertens* 23: 835-842, 2005.
11. **Ferrari P.** Rostafuroxin: an ouabain-inhibitor counteracting specific forms of hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1254-1258, 2010.
12. **Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Padoani G, Duzzi L, Florio M, Conti F, Melloni P, Vecsi L, Corsico N and Bianchi G.** PST2238: a new antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 83-94, 1998.
13. **Finotti P and Palatini P.** Canrenone as a partial agonist at the digitalis receptor site of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 217: 784-790, 1981.
14. **Glavind-Kristensen M, Matchkov V, Hansen VB, Forman A, Nilsson H and Aalkjaer C.** KATP-channel-induced vasodilation is modulated by the Na,K-pump activity in rabbit coronary small arteries. *Br J Pharmacol* 143: 872-880, 2004.
15. **Haddy FJ, Vanhoutte PM and Feletou M.** Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R546-R552, 2006.
16. **Jha S and Dryer SE.** The beta1 subunit of Na⁺/K⁺-ATPase interacts with BKCa channels and affects their steady-state expression on the cell surface. *FEBS Lett* 583: 3109-3114, 2009.
17. **Juhaszova M and Blaustein MP.** Distinct distribution of different Na⁺ pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implications. *Ann N Y Acad Sci* 834: 524-536, 1997.
18. **Lingrel JB.** The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 72: 395-412, 2010.
19. **Liu J and Shapiro JI.** Regulation of sodium pump endocytosis by cardiotonic steroids: Molecular mechanisms and physiological implications. *Pathophysiology* 14: 171-181, 2007.

20. **Liu Y, Pleyte K, Knaus HG and Rusch NJ.** Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension* 30: 1403-1409, 1997.
21. **Meyer MC, Brayden JE and McLaughlin MK.** Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1510-1516, 1993.
22. **Michea L, Valenzuela V, Bravo I, Schuster A and Marusic ET.** Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase in aorta. *Am J Physiol* 275: E1072-E1081, 1998.
23. **Nesher M, Shpolansky U, Rosen H and Lichtstein D.** The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci* 80: 2093-2107, 2007.
24. **Oshiro N, Dostanic-Larson I, Neumann JC and Lingrel JB.** The ouabain-binding site of the alpha2 isoform of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation during pregnancy. *Am J Hypertens* 23: 1279-1285, 2010.
25. **Osol G and Cipolla M.** Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am J Obstet Gynecol* 168: 268-274, 1993.
26. **Osol G and Mandala M.** Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)* 24: 58-71, 2009.
27. **Palacios J, Marusic ET, Lopez NC, Gonzalez M and Michea L.** Estradiol-induced expression of N⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1793-H1800, 2004.
28. **Pritchard TJ, Bowman PS, Jefferson A, Tosun M, Lynch RM and Paul RJ.** Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase and Ca⁽²⁺⁾ clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H548-H556, 2010.

29. **Provencher M, Houde V, Brochu M and St-Louis J.** Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1195-H1201, 2012.
30. **Puschett JB, Agunanne E and Uddin MN.** Marinobufagenin, resibufogenin and preeclampsia. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1246-1253, 2010.
31. **Roy B, Sicotte B, Brochu M and St-Louis J.** Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: Contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biol Reprod* 60: 979-988, 1999.
32. **Rusch NJ and Runnells AM.** Remission of high blood pressure reverses arterial potassium channel alterations. *Hypertension* 23: 941-945, 1994.
33. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL and Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47: 203-208, 2006.
34. **Schrier RW and Ohara M.** Dilemmas in human and rat pregnancy: proposed mechanisms relating to arterial vasodilation. *J Neuroendocrinol* 22: 400-406, 2010.
35. **Semplicini A, Serena L, Valle R, Ceolotto G, Felice M, Fontebasso A and Pessina AC.** Ouabain-inhibiting activity of aldosterone antagonists. *Steroids* 60: 110-113, 1995.
36. **Shelly DA, He S, Moseley A, Weber C, Stegemeyer M, Lynch RM, Lingrel J and Paul RJ.** Na(+) pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C813-C820, 2004.
37. **Slangen BF, van Ingen Schenau DS, van Gorp AW, De Mey JG and Peeters LL.** Aortic distensibility and compliance in conscious pregnant rats. *Am J Physiol* 272: H1260-H1265, 1997.
38. **St-Louis J, Pare H, Sicotte B and Brochu M.** Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am J Physiol* 273: H1148-H1153, 1997.

39. **St-Louis J, Sicotte B, Bedard S and Brochu M.** Blockade of angiotensin receptor subtypes in arcuate uterine artery of pregnant and postpartum rats. *Hypertension* 38: 1017-1023, 2001.
40. **Webb RC and Bohr DF.** Potassium-induced relaxation as an indicator of Na⁺-K⁺ ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 15: 198-207, 1978.
41. **Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG and Blaustein MP.** Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J Physiol* 569: 243-256, 2005.
42. **Zhang L, Zhang Z, Guo H and Wang Y.** Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol* 22: 615-621, 2008.

**CHAPITRE IV : Le canrénoate active le système rénine
angiotensine aldostérone mais ne modifie pas la
pression artérielle des rates gestantes**

STATUT : En préparation

**LE CANRÉNOATE ACTIVE LE SYSTÈME RÉNINE ANGIOTENSINE ALDOSTÉRONÉ MAIS NE MODIFIE
PAS LA PRESSION ARTÉRIELLE DES RATES GESTANTES**

Provencher M ^{1,2}, Houde V ¹, Thibault G ³, Brochu M ¹, St-Louis J ^{1,2}

¹ Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine et Départements d'Obstétrique-Gynécologie ² de Pharmacologie, Université de Montréal; ³ Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada

En-tête paginale : Inhibition des récepteurs des minéralocorticoïdes durant la grossesse

J. ST-LOUIS

Centre de recherche

CHU Sainte-Justine

3175, chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal, QC, Canada H3T 1C5

Email:

Téléphone (

Fax

RÉSUMÉ

La grossesse est accompagnée de plusieurs modifications, à savoir des augmentations du rythme cardiaque, du volume sanguin et du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) ainsi que de réductions paradoxales de la pression artérielle et de la résistance vasculaire périphérique. Nous avons précédemment démontré qu'une inhibition du SRAA, avec une diète élevée en sodium, bloque la baisse de pression artérielle associée à la gestation. Comme les minéralocorticoïdes sont une des composantes principales du SRAA, nous voulions déterminer s'ils sont impliqués dans les changements hémodynamiques associées à la grossesse. Pour ce faire, nous avons traité des rates gestantes avec du canrénoate de potassium (20 ou 60 mg/kg·jr), un antagoniste des récepteurs des minéralocorticoïdes (MR), des jours 15 à 22 de la gestation. Les paramètres physiologiques (poids des mères, de leurs organes, des ratons et des placentas) ont été mesurés pour s'assurer du bon déroulement de la grossesse. Seule la prise de poids des mères recevant la dose de 60 mg/kg·jr est inférieure à celle des autres groupes mais cette différence n'affecte pas le bon déroulement de la grossesse. Dans le même groupe de rates, l'osmolalité est diminuée alors que le sodium, le potassium sériques et l'hématocrite sont inchangés. Cette différence peut être due à une légère augmentation de la diurèse et natriurèse. Par contre, il n'y a pas de différence entre les taux sériques de canrénone, bien qu'un groupe recevait une dose trois fois plus élevée que l'autre. L'atteinte d'un taux maximum et une plus grande excrétion du médicament pourrait expliquer ce fait mais nous n'avons pas effectué de collecte urinaire et nous ne pouvons donc pas vérifier cette hypothèse. Malgré cette similitude des concentrations sériques, des différences de réponse du SRAA sont observées. En effet, chez le groupe recevant 60 mg/kg·jr, l'activité rénine plasmatique (PRA), la corticostérone et l'aldostérone sont élevées tandis que chez les rates recevant 20 mg/kg·jr, seulement l'aldostérone est élevée en comparaison au groupe contrôle. Malgré ces différences des composantes du SRAA, le canrénoate n'a pas induit de modification de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de la pression pulsée. Bien que nous ayons précédemment démontré qu'une réduction de l'activité du SRAA empêchait la baisse de pression artérielle associée à la gestation, nos résultats démontrent que l'aldostérone, via les MR, n'est pas responsable du contrôle de la pression artérielle durant la grossesse.

Mots clés : Aldostérone, Récepteur des minéralocorticoïdes, Pression artérielle, Canrénoate de potassium, Activité rénine plasmatique

INTRODUCTION

La grossesse est accompagnée de multiples changements cardiovasculaires qui sont essentiels à son bon déroulement. Une augmentation du volume sanguin et de la fréquence cardiaque ainsi qu'une activation du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) est paradoxalement accompagnée d'une baisse de la pression artérielle et de la résistance vasculaire (1; 10; 13; 32). Lorsque ces modifications ne sont pas présentes, la femme enceinte développe la prééclampsie, une complication affectant 6 à 10% des grossesses et qui est associée à un haut taux de morbidité et mortalité fœtales et maternelles. Cette pathologie se caractérise par l'apparition d'hypertension après la 20^e semaine de grossesse et est accompagnée de protéinurie et d'œdème (22). De plus, une augmentation du tonus vasculaire maternelle et une diminution du flot sanguin utéroplacentaire sont observées (21; 25). Finalement, les femmes souffrant de prééclampsie ont une expansion volumique plus faible ainsi qu'une activité rénine plasmatique (PRA) et des taux d'aldostérone diminués en comparaison à celles ayant une grossesse normale (3; 8; 30). Ceci met l'emphase sur le paradoxe existant entre le SRAA et la régulation de la pression artérielle durant les grossesses normales et hypertendues.

Chez la femme, le SRAA est activé très tôt dans la grossesse, i.e. au moins dès la 6^e semaine avant même la baisse de la pression artérielle (10). Chez la rate, le SRAA s'active vers la fin de la 2^e semaine (sur 3) de gestation, soit quelques jours avant que chute la pression artérielle (7; 15). Nous avons précédemment modifié l'activité du SRAA de rates gestantes en altérant la prise de sodium durant la dernière semaine de gestation. L'activation du SRAA, causée par une diète faible en sodium, provoque une augmentation des niveaux de PRA et d'aldostérone, mais une expansion du volume sanguin moins importante que dans la grossesse normale. Toutefois, la baisse de pression artérielle est maintenue à la fin de la gestation (29). À l'opposé, la suppression du SRAA, par une diète élevée en sodium, induit une réduction des taux de PRA et d'aldostérone chez les rates gestante en plus d'éliminer la baisse de pression artérielle associée à la gestation (4). Aussi, la résistance aux vasopresseurs observée durant la gestation normale est renversée dans ce modèle animal (2). Ces données démontrent un rôle du SRAA dans le contrôle de l'hémodynamie durant la gestation mais ne permettent pas de déterminer l'implication des ses différentes composantes dans les changements cardiovasculaires liés à la gestation. Dans une autre étude, l'administration d'un antagoniste des récepteurs des minéralocorticoïdes (MR), durant les 7 derniers jours de la gestation, induit une augmentation de la réactivité vasculaire de

l'aorte (26). Ceci suggère que l'aldostérone peut être impliquée dans les changements hémodynamiques de la grossesse.

L'aldostérone est considérée comme un élément primordial dans la santé cardiovasculaire. En effet, les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes (MR), seuls ou en combinaison avec des agents anti-hypertensifs classiques, sont efficaces pour traiter l'hypertension (23). L'ajout d'antagonistes des MR à une thérapie médicale réduit la morbidité ou la mortalité en prévenant les dommages aux organes indépendamment des niveaux de pression artérielle (23; 24; 28). De plus, une mutation du MR (S810L) le rend constitutivement actif en permettant à la progestérone et à d'autres stéroïdes sans groupement 21-hydroxyl de l'activer. Les patientes qui possèdent cette mutation souffrent d'une hypertension précoce qui est grandement exacerbée durant la grossesse (16). De plus, une étude donnant du spironolactone (100 mg/jr) à des femmes enceintes pendant 2 semaines, a révélé une augmentation de la PRA et une diminution de l'excrétion urinaire d'aldostérone, mais malheureusement, la pression artérielle n'a pas été mesurée (20). Ces observations démontrent l'importance d'étudier les effets des antagonistes des minéralocorticoïdes durant la grossesse, une condition où les taux d'aldostérone sont très élevés.

Puisque nous avons précédemment démontré que les MR influencent la réactivité de l'aorte durant la grossesse (26), nous émettons l'hypothèse que l'aldostérone, via son action sur les MR, est responsable des modifications de pression artérielle associée à la grossesse. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons traité des rates gestantes avec un antagoniste des MR, le canrénoate de potassium, durant la dernière semaine de gestation. Les objectifs étant de mesurer les changements hémodynamiques par une technique de télémétrie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

La présente étude a été approuvée par le comité local de protection des animaux qui est accrédité par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Ce protocole a été réalisé à l'animalerie de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) en collaboration avec le Dr Gaétan Thibault. Tout a été mis en œuvre pour maintenir les mêmes conditions que dans les études précédentes soit l'utilisation de la même souche de rats et des conditions d'hébergement

identiques. Les soins et les installations répondent aux standards demandés par le CCPA et toutes les interventions pratiquées sur les animaux ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux de l'IRCM.

Des femelles Sprague-Dawley (Charles River Canada; St-Constant, Qc), pesant 225-250 g, sont croisées avec des mâles fertiles. Le jour 1 de la grossesse est déterminé par la présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal du matin. Tous les animaux sont hébergés dans des conditions de luminosité (6AM à 6PM) et de température ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) contrôlées et reçoivent de la nourriture contenant 0.23% de NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad; Montreal, Qc) et de l'eau du robinet *ad libitum*. Les rates gestantes sont séparées aléatoirement dans trois groupes recevant soit de l'eau du robinet ou de l'eau additionnée de canrénoate de potassium (Sigma, St. Louis, MO, USA) 20 mg/kg-jour ou 60 mg/kg-jour à partir du 15^e jour de gestation. Le poids corporel des animaux est mesuré quotidiennement des jours 8 à 22 de gestation. La consommation d'eau est également mesurée durant la même période pour ajuster la prise de canrénoate. À la fin de la période de traitement (jour 22 de la gestation; terme jour 23), les animaux sont euthanasiés par décapitation (9h-9h30 AM) et des échantillons de sang sont recueillis pour des analyses d'hormones et d'électrolytes. Le cœur, les reins et l'aorte sont prélevés, pesés et conservés pour des analyses ultérieures. Finalement, les paramètres fœtaux (poids des bébés, des placentas et de l'unité fœto-placentaire) sont mesurés au jour 22.

Collecte et Analyse des échantillons

Au sacrifice, le premier échantillon de sang (0.5 ml) est recueilli dans un tube vacutainer K2 EDTA (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA), et un aliquot est également prélevé pour mesurer l'hématocrite. Après une centrifugation de 1500 g à 4°C pendant 20 min, le plasma est entreposé à -80°C pour les mesures de PRA. Le deuxième échantillon est récupéré dans un tube vacutainer sans revêtement et après centrifugation, le sérum est conservé à -80°C pour les mesures d'aldostérone, de corticostérone et de canrénone. Le troisième échantillon est recueilli dans un tube vacutainer lithium héparine, et après centrifugation, le sérum est envoyé au service de biochimie clinique du CHU Ste-Justine pour déterminer les électrolytes (Na^+ et K^+) et l'osmolalité. Le sodium et le potassium sont dosés avec des électrodes spécifiques.

Mesure des hormones

La PRA est déterminée de façon indirecte par radioimmunoessai de l'Ang I après une période d'incubation de 2h tel que décrit par Gutkowska et al (17). L'aldostérone et la corticostérone sériques sont mesurées directement à partir de kits de radioimmunoessai commerciaux (aldostérone: Intermedico, Montréal, Qc; corticostérone: Medicorp, Montréal, Qc). L'interaction de l'anticorps de l'aldostérone avec la progestérone est <0.007%.

Mesure du canrénone

Le canrénone, l'un des principaux métabolites du canrénoate, est mesuré par chromatographie liquide à haute performance (HPLC; *high performance liquid chromatography*). Les analyses sont effectuées sur un système Hitachi Elite LaChrom possédant une pompe L-2130, un échantillonneur L-2200 et un détecteur UV à barrette de diodes L-2450 (DAD; *diode array detector*) (Hitachi High Technologies America Inc., Pleasanton, CA, USA). Les données sont enregistrées et intégrées à l'aide du programme EzChrom Elite (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA). La séparation par chromatographie est effectuée à température ambiante sur une colonne analytique Waters Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm, 4 µm) précédée d'un pré-filtre. La phase mobile, consistant d'acétonitrile et d'eau dans un ratio 40 :60, est filtrée, dégazée et pompée à un flot de 1 mL/min. La détection est effectuée à 300 nm.

La courbe de calibration pour le canrénone est préparée de la façon suivante : une réserve de sérum de rats contenant 358.3 pmol/mL de canrénone (Spectrum chemicals and laboratory supplies, New Brunswick, NJ) est diluée en série avec du sérum ne contenant pas de canrénone pour obtenir des concentrations finales variant entre 11.5 et 358.3 pmol/mL. Les standards et les échantillons de sérum à analyser (400 µL) sont passés sur des cartouches Oasis HLB (1 cc/30 mg) (Waters Ltd, Lachine, Qc, Canada). Les éluants sont recueillis dans des tubes de borosilicate et sont évaporés sous azote à 37°C en utilisant un Évaporateur Zymark TurboVap LV. Le culot est resuspendu dans 100 µL de phase mobile et un aliquot de 75 µL est injecté dans le système HPLC.

Mesure de pression artérielle par téléométrie

La pression artérielle, le rythme cardiaque, la pression pulsée et le degré d'activité des rates sont mesurés par un système d'implant qui transmet les données par radiotéléométrie. Quelques jours après leur réception, les rates subissent une chirurgie pour la mise en place des implants TA11PA-C40 (Data Sciences International; St. Paul, MN, USA). Ces chirurgies sont pratiquées par Manon Laprise, technicienne en santé animale pour l'équipe du Dr Gaétan Thibault. Sous anesthésie, une incision abdominale est pratiquée pour introduire l'implant dans la cavité abdominale et il est maintenu en place par des points de suture sur la paroi abdominale. La canule est insérée dans l'aorte abdominale. Puis, l'incision est refermée à l'aide de suture et d'agrafes chirurgicales. Après quelques jours de repos, les croisements avec les mâles sont entrepris. Une fois les rates gestantes, les lectures débutent à partir du 8^e jour de gestation et se poursuivent jusqu'au 22^e jour (jour du sacrifice). Chaque lecture correspond à la moyenne de 3 mesures enregistrées à quelques secondes d'intervalle. Une lecture est enregistrée toutes les 20 minutes et nous avons fait la moyenne de ses lectures sur une période de 24h pour chaque animal.

Analyses statistiques

Les paramètres physiologiques (consommation d'eau, poids de la mère et des organes, les données fœtales et les paramètres sanguins) sont comparés par analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi d'un post-test de Dunnett lorsque significatif. Les concentrations de canrénone sont comparées à l'aide d'un test T de Student entre les deux groupes recevant le traitement. Finalement, les données hémodynamiques (pression artérielle, rythme cardiaque et pression pulsée) ainsi que le degré d'activité de l'animal sont évalués par un ANOVA à deux facteurs par rapport au temps de gestation et par rapport au traitement au canrénoate de potassium. Toutes les analyses sont effectuées avec le logiciel Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA)

RÉSULTATS

Paramètres physiologiques

Afin d'évaluer l'impact du traitement sur le déroulement de la grossesse, plusieurs paramètres physiologiques sont mesurés. Dans un premier temps, nous avons observé que le gain de poids chez les rates gestantes recevant 60 mg/kg·jr de canrénoate est moins important que dans les autres groupes (Tableau 1). Toutefois, la consommation d'eau des animaux n'est pas affectée par le traitement (Tableau 1) et la prise moyenne de canrénoate est près des doses ciblées, soit 20 et 60 mg/kg·jr, en étant de 22.66 ± 0.94 et de 57.95 ± 1.73 mg/kg·jr. Les paramètres fœtaux (Tableau 2) ne sont pas affectés par le traitement suggérant que ce dernier n'affecte pas le bon déroulement de la grossesse. Finalement, le poids du cœur, des reins et de l'aorte de la mère ainsi que leur ratio au poids corporel sont mesurés pour s'assurer que le traitement n'affecte pas les principaux systèmes impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Aucun changement n'est noté dans les différents groupes (Tableau 3).

Paramètres sanguins

Le tableau 4 montre les différents éléments mesurés dans le sang des animaux. Les concentrations de sodium et de potassium ne sont pas modifiées par le traitement mais on note toutefois une légère augmentation de l'osmolalité chez les rates recevant la plus forte dose de canrénoate par rapport aux contrôles. L'hématocrite n'est pas affecté par le traitement. Par contre, les niveaux d'aldostérone sont augmentés avec les 2 doses de canrénoate. De plus, les niveaux de corticostérone et la PRA sont accrus chez les rates recevant 60 mg/kg·jr.

Afin de s'assurer de l'efficacité du traitement, les concentrations sériques de canrénone, le principal métabolite du canrénoate de potassium, sont mesurées par HPLC. La figure 1 montre les concentrations obtenues dans les deux groupes de rates traitées. Étonnamment, il n'y a pas de différence entre les concentrations sériques de canrénone bien qu'un groupe a reçu trois fois la dose de l'autre groupe. Cela laisse suggérer que des mécanismes d'élimination, soit rénaux ou hépatiques, s'opèrent afin de maintenir un taux maximal du médicament dans le sang.

Paramètres hémodynamiques

Les figures 2 et 3 présentent les données hémodynamiques obtenues en temps réel à l'aide de sondes radiotéléométriques. La figure 2 montre les mesures de pression artérielle systolique, moyenne et diastolique des jours 8 à 21 de gestation pour les trois groupes d'animaux. La figure 3, tant qu'à elle, présente le rythme cardiaque (A), la pression pulsée (B) et le degré d'activité de l'animal (C) pour la même période. Tous ces paramètres sont comparés par un ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées par rapport au temps de gestation et par rapport au traitement au canrénoate de potassium. La prise de canrénoate, autant 20 mg/kg·jr que 60 mg/kg·jr, n'a eu aucun effet sur la pression artérielle, ni sur le rythme cardiaque, la pression pulsée ou le degré d'activité. Par contre, le temps de gestation influence significativement les paramètres hémodynamiques. En effet, la baisse de pression artérielle caractéristique de la grossesse en fin de gestation est observée comme dans des études antérieures de notre groupe (4; 29). Cette dernière est accompagnée d'une diminution de la pression pulsée. De plus, on remarque une légère hausse du rythme cardiaque dans les derniers jours de la gestation. Finalement, le degré d'activité des rates est aussi diminué avec la progression de la grossesse.

DISCUSSION

La présente étude a été réalisée pour déterminer si l'aldostérone, par son action sur les MR, est responsable des modifications de pression artérielle associée à la grossesse. Pour ce faire, des rates gestantes ont été traitées avec du canrénoate de potassium, un antagoniste des MR, durant les 7 derniers jours de gestation et des paramètres physiologiques ainsi que des paramètres hémodynamiques furent mesurés. Nous avons premièrement démontré que le traitement n'influence pas le bon déroulement de la grossesse puisque les paramètres physiologiques mesurés (poids et nombre des ratons et des placentas, ainsi que le poids des organes maternels) ne sont pas modifiés par notre traitement. Seule la prise de poids des rates recevant 60 mg/kg·jr de canrénoate est inférieure à celle des autres groupes mais cela n'affecte pas le rendement de la grossesse. Chez ces mêmes animaux, nous avons observé une hausse modeste mais significative de l'osmolalité bien que les concentrations de sodium et de potassium sériques ainsi que l'hématocrite sont inchangées. Cela peut être causé par une légère hausse de la diurèse et de la natriurèse chez les rates recevant 60 mg/kg·jr puisque le canrénoate est connu pour être un agent diurétique lorsqu'il agit dans le rein (19). Cet effet n'est pas observé chez les

rates recevant 20 mg/kg-jr de canrénoate puisque Bos et al (6) ont rapporté que chez le rat, un traitement au canrénoate d'une semaine à cette dose, bloque complètement les effets cardiovasculaires de l'aldostérone mais n'induit aucune modification de la diurèse, natriurèse et kaliurèse.

Pour vérifier l'efficacité de notre traitement, les taux sanguins de canrénone, le principal métabolite du canrénoate, ont été mesurés. Étonnamment, les taux sanguins sont similaires entre les deux groupes traités bien que la dose ingérée est trois fois plus élevée dans le deuxième groupe. Il est possible que ces animaux excrètent les surplus de médicament. Le canrénone est une molécule liée à 99% aux protéines plasmatiques mais elle est par la suite transformée en d'autres métabolites qui seront excrétés dans l'urine (18; 31). Malheureusement, l'urine des animaux à l'étude n'a pas été collectée et nous ne pouvons confirmer cette hypothèse.

Bien que les taux sanguins de canrénone soient similaires, on note des différences des paramètres hormonaux. En effet, les taux d'aldostérone, de corticostérone et la PRA sont élevés chez les rates recevant 60 mg/kg-jr tandis que seule l'aldostérone est élevée chez les rates recevant la dose de 20 mg/kg-jr par rapport aux gestantes normales. Une justification possible pour cette différence est que la relation entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie est dirigée par les concentrations maximum dans le plasma. Cela signifie que lorsque la concentration locale de canrénone autour des MR atteint le seuil du IC_{50} (concentration requise pour obtenir 50% de l'inhibition maximale), une cascade d'événements est enclenchée pour atteindre une réponse pharmacodynamique précise (19). Par exemple, lorsque les actions de l'aldostérone sont bloquées dans le néphron distal, la relâche de rénine et l'augmentation des taux d'aldostérone sont stimulées par l'interruption d'une longue boucle de rétrocontrôle (31). On peut donc conclure qu'avec une dose de 60 mg/kg-jr de canrénoate on obtient des taux locaux dans le rein suffisant pour atteindre l' IC_{50} et voir une élévation de la PRA et de l'aldostérone. Ces données concordent avec l'étude de Chabert et al. (9) qui ont observé une augmentation des concentrations d'aldostérone et de rénine plasmatique chez des rats recevant du spironolactone (20-30 mg/kg-jr sc) durant 7 jours. Un effet similaire fût également observé chez des femmes enceintes qui ont reçu du spironolactone (100 mg/jr) durant deux semaines (20). On constate toutefois qu'on ne voit pas d'effets d'hyperaldostéronisme malgré que les taux sériques soient le double de ceux d'une grossesse normale. Cela est dû au fait que les MR ne peuvent être activés par l'aldostérone car ils sont liés au canrénoate. Sica et al (31) proposent même que l'élévation

des taux sériques d'aldostérone soit utilisée comme biomarqueur d'un blocage efficace des MR *in vivo*.

Malgré les modifications des composantes du SRAA résultant du traitement au canrénoate, les composantes hémodynamiques mesurées par télémétrie ne sont pas modifiées. En effet, bien que l'on note la baisse de pression artérielle, la légère hausse du rythme cardiaque et la légère baisse de la pression pulsée associée à la fin de la gestation, aucune différence entre les groupes recevant le canrénoate ou le groupe contrôle n'est observée. Bien que le spironolactone et le canrénoate soit administrés cliniquement pour traiter l'hypertension (5; 14), ils ne semblent pas affecter la pression ni le rythme cardiaque dans des conditions non pathologiques. Les données quant à son efficacité varient dans la littérature en fonction du modèle d'hypertension étudié et de la dose administrée. Par exemple, de Mendonça et al. (12) ont démontré dans un modèle de rat hypertendu, induit par une réduction de la masse rénale et un excès de sodium, que 60 mg/kg·jr *per os* de canrénone engendre des effets antihypertenseurs. De son côté, Vargas et al. (33) ont montré qu'une dose de 66 mg/kg·jr *sc* à des rats DOCA-sel réduit la hausse de pression artérielle mais ne la normalise pas. Par contre, Rigsby et al. (27) ont démontré qu'un traitement au spironolactone de 25 mg/kg·jr *per os* n'a pas d'effet sur la pression des rats spontanément hypertendus (SHR) « stroke-prone » (sujets aux accidents vasculaires cérébraux) et même une dose de 100 mg/kg·jr *per os* pendant 14 jours n'a pas d'effet sur la pression artérielle des rats sous diète normale ou élevée en sel (11). Toutes ces variations nous laissent croire que le contrôle spécifique de la pression artérielle durant la grossesse n'est pas affecté par les antagonistes des MR.

Chez les rates gestantes, nous avons précédemment démontré qu'une inhibition du SRAA, par une diète élevée en sodium, empêche la baisse de pression artérielle associée à la grossesse (4). De plus, nous avons démontré qu'en bloquant les MR avec du canrénoate, on modifie la réactivité vasculaire de l'aorte (26). Nos résultats démontrent toutefois que les MR ne sont pas responsables de la modification de pression artérielle observée chez les rates recevant un supplément sodique, malgré l'importante hausse d'aldostérone chez les rates traitées au canrénoate. Un autre mécanisme ou un autre élément du SRAA ou une combinaison de plusieurs éléments semblent plutôt impliqués dans le contrôle de la pression artérielle durant la grossesse.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par des fonds de recherche octroyés par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC; MOP-84450). M.P. et V.H. ont reçu des bourses d'études des IRSC, de la Fondation de l'hôpital Sainte-Justine et la Fondation des Étoiles. Nous remercions Benoit Sicotte et Manon Laprise pour leur assistance technique.

Tableau 1: Effets du traitement au canrénate de potassium sur le gain de poids et la consommation moyenne d'eau chez des rates gestantes des jours 15 à 22.

	Contrôle (10)	Canrénate (20 mg/kg·jr) (10)	Canrénate (60 mg/kg·jr) (13)
Gain de poids (g)	86.24 ± 5.17	87.45 ± 3.56	69.41 ± 3.20 **
Consommation moyenne d'eau (mL/jour)	42.56 ± 2.04	42.69 ± 2.50	39.20 ± 1.79
Prise moyenne de canrénate (mg/kg·jr)	----	22.66 ± 0.94	57.95 ± 1.73

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux. ** p<0.01 vs contrôle.

Tableau 2 : Effets du traitement au canrénate de potassium sur les paramètres foetaux chez des rates gestantes.

	Contrôle (10)	Canrénate (20 mg/kg·jr) (10)	Canrénate (60 mg/kg·jr) (13)
Nombre de ratons/portée	13.90 ± 1.0	14.10 ± 0.8	14.85 ± 0.7
Poids moyen des ratons (g)	5.47 ± 0.19	5.48 ± 0.08	5.39 ± 0.09
Poids moyen des placentas (g)	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.01
Poids des placentas/Poids des ratons (%)	8.9 ± 0.4	8.7 ± 0.4	9.2 ± 0.2

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM au 22^e jour de gestation. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux.

Tableau 3 : Effets du traitement au canrénoate de potassium sur le poids du cœur, des reins et de l'aorte chez des rates gestantes.

	Contrôle (10)	Canrénoate (20 mg/kg·jr) (10)	Canrénoate (60 mg/kg·jr) (13)
Cœur (g)	0.847 ± 0.026	0.878 ± 0.025	0.852 ± 0.023
Rein gauche (g)	0.902 ± 0.027	0.883 ± 0.026	0.895 ± 0.023
Rein droit (g)	0.932 ± 0.020	0.894 ± 0.021	0.902 ± 0.022
Aorte (g/cm)	0.017 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.016 ± 0.002
Cœur/Poids corporel	0.187 ± 0.005	0.193 ± 0.004	0.192 ± 0.005
Rein gauche/ Poids corporel	0.199 ± 0.005	0.194 ± 0.006	0.202 ± 0.004
Rein droit/Poids corporel	0.206 ± 0.005	0.196 ± 0.004	0.203 ± 0.004
Aorte/Poids corporel	0.0038 ± 0.0005	0.0041 ± 0.0006	0.0036 ± 0.0004

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM au 22^e jour de gestation. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux.

Tableau 4 : Effets du traitement au canrénoate de potassium sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes.

	Contrôle	Canrénoate (20 mg/kg·jr)	Canrénoate (60 mg/kg·jr)
Sodium (mmol/L)	134.7 ± 0.8 (10)	136.4 ± 0.5 (10)	136.9 ± 1.0 (12)
Potassium (mmol/L)	6.18 ± 0.18 (10)	6.58 ± 0.17 (10)	6.25 ± 0.15 (13)
Osmolalité (mOsmol/kg H₂O)	289 ± 2 (9)	293 ± 1 (10)	296 ± 2 (10) *
Hématocrite (%)	35.5 ± 0.7 (9)	35.9 ± 0.4 (9)	37.5 ± 0.7 (13)
Aldostérone (pmol/mL)	0.65 ± 0.09 (9)	1.02 ± 0.15 (10) *	1.17 ± 0.06 (14) **
Corticostérone (nmol/mL)	1.83 ± 0.27 (10)	2.42 ± 0.16 (9)	2.49 ± 0.15 (14) *
Activité rénine plasmatique (pmol/ANGI/mL/h)	8.75 ± 1.90 (10)	9.05 ± 1.00 (9)	17.77 ± 2.56 (14) *

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM au 22^e jour de gestation. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux. * p<0.05 vs contrôle, ** p<0.01 vs contrôle.

Figure 1

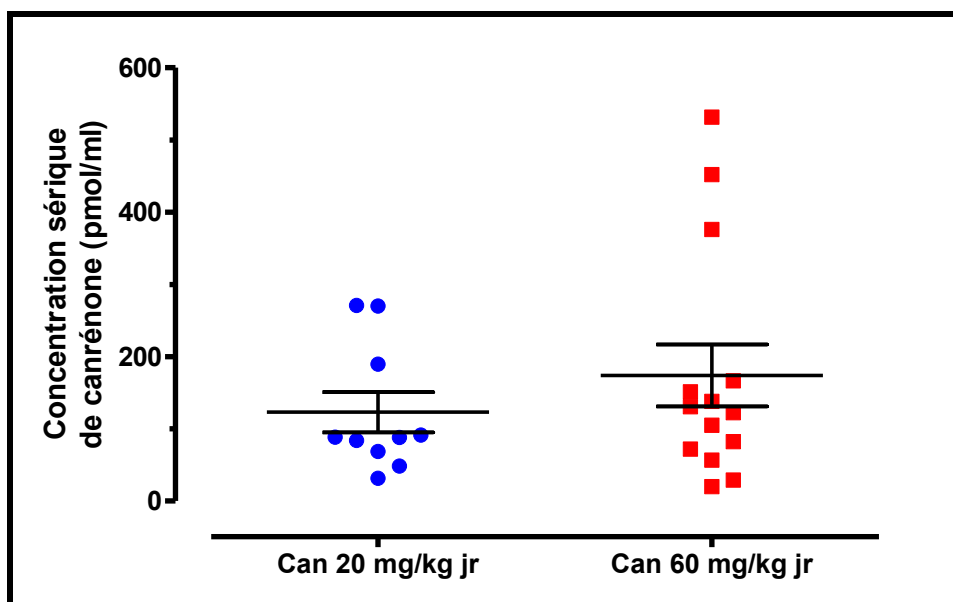


Figure 2

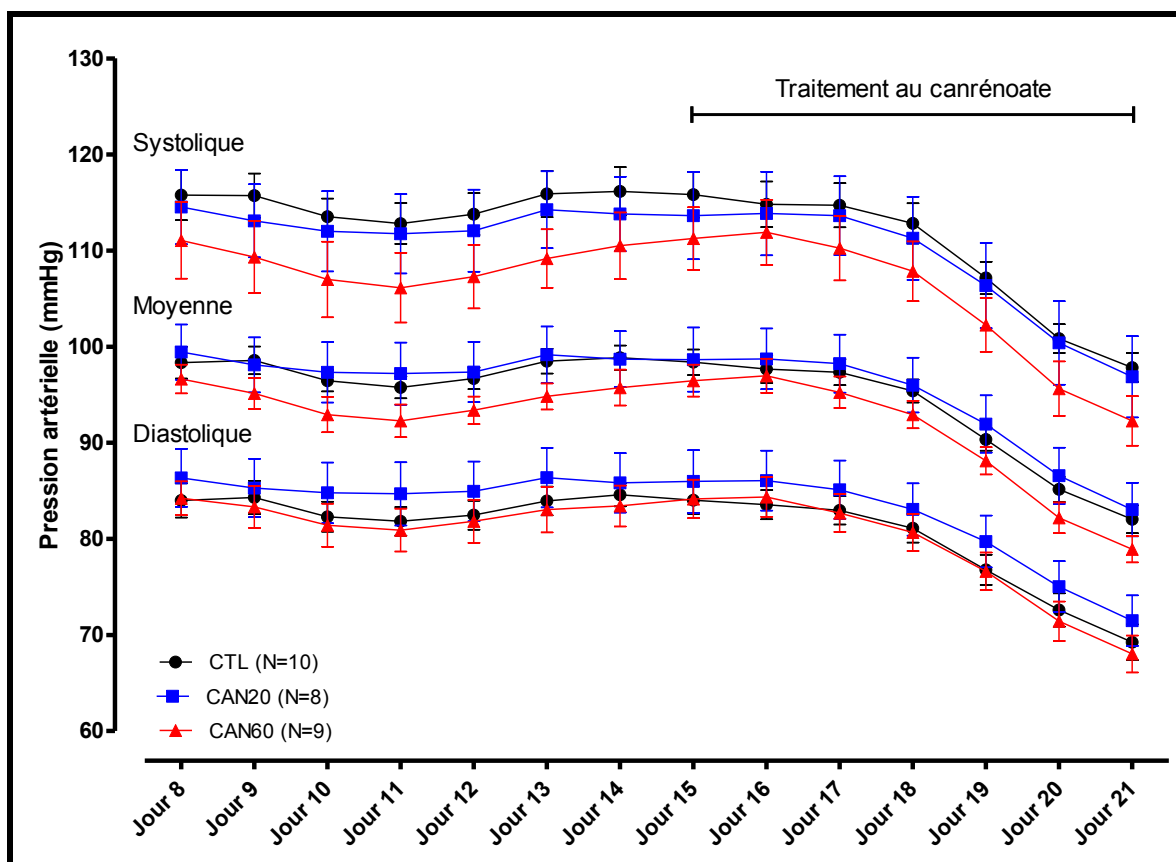
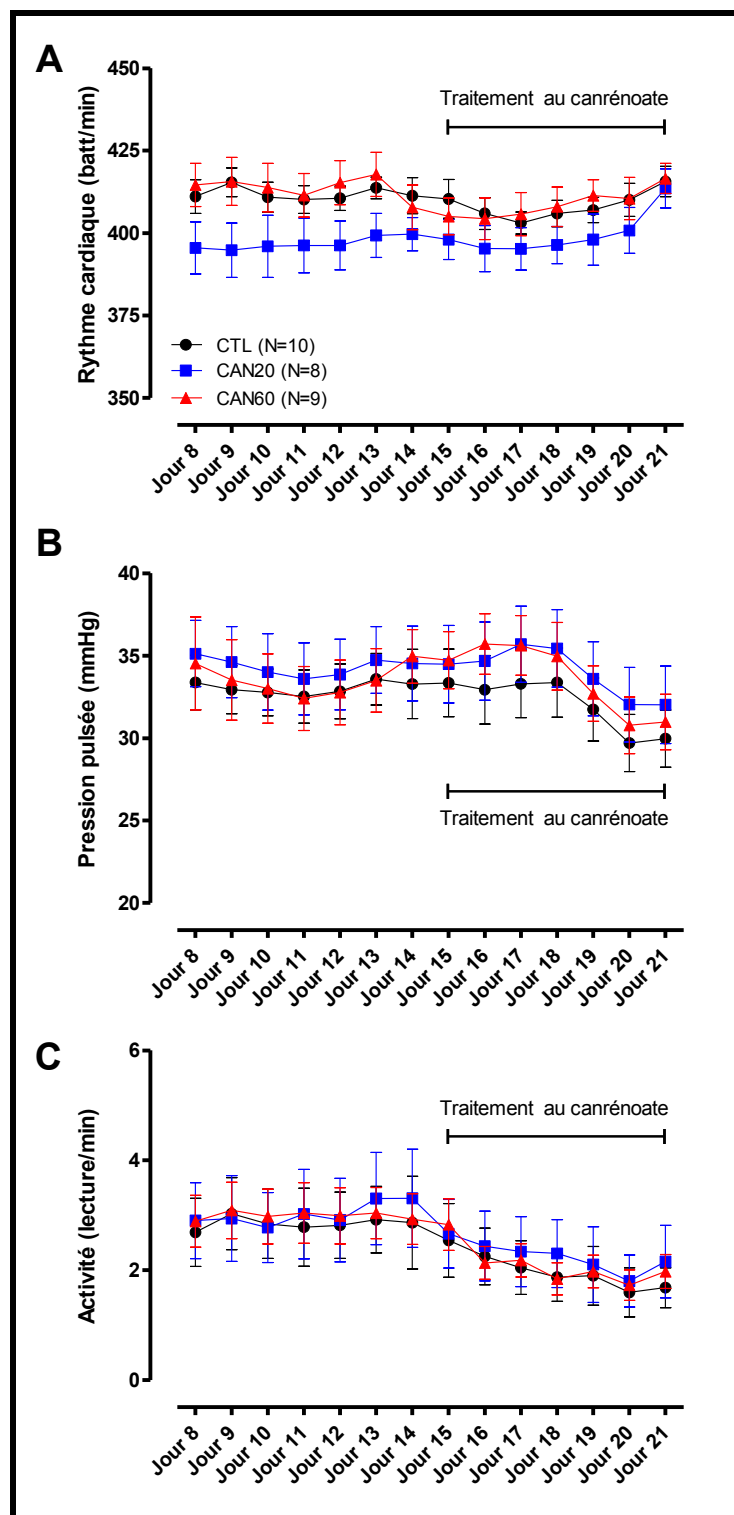


Figure 3



LÉGENDES DES FIGURES

Figure 1: Concentration de canrénone mesurée par HPLC dans le sérum des rates traitées au canrénate de potassium (20 mg/kg·jr (N= 10) et 60 mg/kg·jr (N=14)) au 22^e jour de gestation.

Figure 2: Effets du traitement au canrénate de potassium (20 mg/kg·jr et 60 mg/kg·jr) sur la pression artérielle moyenne, systolique et diastolique obtenue par télémétrie chez des rates gestantes. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux étudiés.

Figure 3: Effets du traitement au canrénate de potassium (20 mg/kg·jr et 60 mg/kg·jr) sur le rythme cardiaque (A), la pression pulsée (B) et l'activité de l'animal (C). Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux étudiés

Bibliographie

1. **Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MR, Pidgeon J and Soni S.** Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 330: 81-93, 1982.
2. **Auger K, Beausejour A, Brochu M and St-Louis J.** Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1848-H1856, 2004.
3. **August P, Lenz T, Ales KL, Druzin ML, Edersheim TG, Hutson JM, Muller FB, Laragh JH and Sealey JE.** Longitudinal study of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive pregnant women: deviations related to the development of superimposed preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1612-1621, 1990.
4. **Beausejour A, Auger K, St-Louis J and Brochu M.** High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375-H383, 2003.
5. **Black HR.** Evolving role of aldosterone blockers alone and in combination with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers in hypertension management: a review of mechanistic and clinical data. *Am Heart J* 147: 564-572, 2004.
6. **Bos R, Mougnot N, Mediani O, Vanhoutte PM and Lechat P.** Potassium canrenoate, an aldosterone receptor antagonist, reduces isoprenaline-induced cardiac fibrosis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 1160-1166, 2004.
7. **Brochu M, Lehoux JG and Picard S.** Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 138: 2354-2358, 1997.
8. **Brown MA, Wang J and Whitworth JA.** The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens* 19: 713-726, 1997.
9. **Chabert PR, Guelpa-Decorzant C, Riondel AM and Vallotton MB.** Effect of spironolactone on electrolytes, renin, ACTH and corticosteroids in the rat. *J Steroid Biochem* 20: 1253-1259, 1984.
10. **Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T and Schrier RW.** Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 54: 2056-2063, 1998.

11. **Cordailat M, Rugale C, Casellas D, Mimran A and Jover B.** Cardiorenal abnormalities associated with high sodium intake: correction by spironolactone in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1137-R1143, 2005.
12. **de MM, Grichois ML, Pernollet MG, Wauquier I, Trouillet-Thormann B, Meyer P, Devynck MA and Garay R.** Antihypertensive effect of canrenone in a model where endogenous ouabain-like factors are present. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 75-83, 1988.
13. **Edouard DA, Pannier BM, London GM, Cuche JL and Safar ME.** Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol* 274: H1605-H1612, 1998.
14. **Funder JW.** RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 121-125, 2005.
15. **Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR and Milne CM.** Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol* 113: 435-444, 1987.
16. **Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB and Lifton RP.** Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289: 119-123, 2000.
17. **Gutkowska J, Boucher R and Genest J.** [Radioimmunologic determination of plasma renin activity]. *Union Med Can* 106: 446-450, 1977.
18. **Karim A.** Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev* 8: 151-188, 1978.
19. **Kolkhof P and Borden SA.** Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
20. **Lammintausta R and Erkkola R.** Effect of spironolactone treatment on the renin-aldosterone system during pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 17: 294-298, 1979.
21. **Lockwood C and Paidas M.** Preeclampsia and hypertensive disorders. In: Cherry and Merkatz's Complications of Pregnancy, edited by Cohen WR. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2000, p. 207-214.
22. **Moutquin JM, Rainville C, Giroux L, Raynauld P, Amyot G, Bilodeau R and Pelland N.** A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 151: 191-196, 1985.

23. **Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D and Williams GH.** Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 108: 1831-1838, 2003.
24. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J.** The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-717, 1999.
25. **Poston L, McCarthy AL and Ritter JM.** Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther* 65: 215-239, 1995.
26. **Provencher M, Houde V, Brochu M and St-Louis J.** Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1195-H1201, 2012.
27. **Rigsby CS, Ergul A, Portik D, V, Pollock DM and Dorrance AM.** Effects of spironolactone on cerebral vessel structure in rats with sustained hypertension. *Am J Hypertens* 24: 708-715, 2011.
28. **Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A and Stier CT, Jr.** Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 31: 451-458, 1998.
29. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608-613, 1999.
30. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL and Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47: 203-208, 2006.
31. **Sica DA.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. *Heart Fail Rev* 10: 23-29, 2005.
32. **Torgersen KL and Curran CA.** A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 29: 2-19, 2006.
33. **Vargas F, Haro JM, Jodar E, Soler A and Garcia del RC.** Effects of K⁺-canrenoate on the development of DOCA-salt hypertension. *J Pharm Pharmacol* 41: 335-338, 1989.

CHAPITRE V : DISCUSSION

La grossesse est une condition physiologique particulière. Elle entraîne chez la femme plusieurs changements anatomiques, physiologiques, métaboliques et biochimiques en réponse aux stimuli hormonaux et aux signaux de l'unité fœto-placentaire qui se résorberont en *post-partum*. Parmi ces changements, on note d'importantes modifications hémodynamiques. Le volume sanguin, le rythme cardiaque et le SRAA sont augmentés tandis que la pression artérielle et la résistance vasculaire sont paradoxalement diminuées (12; 47; 100; 208; 292; 293; 313). Tous ces changements assurent une irrigation adéquate de l'unité fœto-placentaire pour subvenir aux besoins du fœtus en développement. Toutefois, les mécanismes assurant cette adaptation à la grossesse ne sont pas encore définis. De plus, lorsque ceux-ci ne sont pas mis en place, les femmes enceintes développent des pathologies telles que la prééclampsie (20; 208; 262; 292). Bien qu'il semble que les mécanismes impliqués soient sous un contrôle multifactoriel, nous croyons que le SRAA est lié aux modifications hémodynamiques observées. Antérieurement, notre laboratoire a développé deux modèles animaux avec un SRAA altéré en diminuant ou en augmentant la consommation de sodium durant la dernière semaine de gestation chez la rate. Cela nous a respectivement donné un modèle de restriction de croissance intra-utérine (259) et un modèle d'hypertension gestationnelle (20). En effet, avec une diète faible en sodium durant les 7 derniers jours de grossesse, nous avons observé une augmentation de la PRA et de l'aldostérone, avec toutefois une expansion volumique inférieure à celle de la gestation normale. De plus, la baisse de pression artérielle associée à la gestation était maintenue, mais les rats souffraient de restriction de croissance intra-utérine (259). À l'opposé, quand le SRAA est supprimé par une diète élevée en sodium, nous avons une diminution de la PRA et de l'aldostérone ainsi qu'une élimination de la baisse de pression artérielle associée à la gestation (20). Également, la résistance aux vasopresseurs observée chez les rates gestantes normales est renversée chez ces animaux (14). Bien que ces modèles démontrent une implication du SRAA dans le contrôle des changements hémodynamiques associés à la gestation, ils ne permettent pas de différencier l'implication des différentes composantes de ce système. À partir des connaissances sur l'implication de l'aldostérone dans le contrôle de la pression artérielle et de ses effets sur la vasculature (36; 77; 96; 108; 176; 192; 269), nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation des taux sériques d'aldostérone durant la grossesse est responsable des changements hémodynamiques observés et que ces effets sont causés par l'activation des MR. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traité des rates gestantes avec un antagoniste des MR, le canrénoate de potassium, durant les 7 derniers jours de gestation. Nous avons évalué, dans un premier temps,

la réactivité vasculaire de l'aorte puis les effets du traitement sur l'hémodynamie systémique en mesurant la pression artérielle et le rythme cardiaque à l'aide de sondes radiotéléométriques.

Plusieurs études indiquent que la réactivité aux vasopresseurs de plusieurs vaisseaux systémiques est diminuée durant la grossesse (14; 37; 84; 135; 200; 236; 237; 257; 258; 292). Cette baisse de réactivité vasculaire apparaît très tôt, avant même que ne baisse la pression artérielle (47). En effet, ce phénomène est observé dès le 17^e jour de gestation où la réactivité vasculaire à la PhE et au KCl des aortes est diminuée (Chapitre II; (240)). Ces deux agonistes induisent la vasoconstriction par des mécanismes différents permettant d'étudier plusieurs aspects de ce phénomène. En effet, la PhE, en se liant aux récepteurs α -adrénergiques, stimule l'entrée de calcium extracellulaire par les canaux calciques dépendants d'un ligand et occasionne la relâche de calcium des réserves intracellulaires. De son côté, le KCl cause une dépolarisation de la membrane qui enclenche l'entrée de calcium par les VDCC (84; 135). Comme la réactivité vasculaire à ces vasoconstricteurs est réduite durant la grossesse, on peut conclure que les mécanismes d'entrée du calcium dans la cellule sont modifiés (84; 258). Jain et al. (135) ont démontré que les mécanismes de contraction à la PhE et au KCl peuvent être modulés indépendamment l'un de l'autre au cours de la grossesse et que le stade de gestation étudié influence différemment la réponse contractile à ces agents. Cela pourrait expliquer les différentes réponses aux modulateurs des canaux ioniques. En effet, comme dans les études précédentes de notre groupe (14; 37), nos résultats montrent que les réponses à la PhE sont réduites de façon plus importante par les activateurs de K_{ATP} (cromakalim, 1 $\mu\text{mol/L}$) et de BK_{Ca} (NS-1619, 30 $\mu\text{mol/L}$). Toutefois, ce dernier et le bloqueur de VDCC (nifédipine, 0.1 $\mu\text{mol/L}$) sont les plus efficaces pour inhiber les réponses au KCl (Chapitre II; (240)). De plus, ces différences de réponses entre la PhE et le KCl pourraient expliquer que le canrénoate augmente la réactivité vasculaire à la PhE de façon plus importante en fin de gestation tandis que l'effet est plus marqué chez les rates non gestantes et chez les rates gestantes à 17 jours de grossesse pour la réponse au KCl (Chapitre II; (240)).

L'activation du MR influence aussi les fonctions vasculaires par des mécanismes non-génomiques et génomiques (36; 95; 192; 337), mais la compréhension de ceux-ci reste limitée puisque les études sur des vaisseaux *ex vivo* fournissent des résultats contradictoires (170). Ces différences peuvent être dues aux variations dans la conception des études (lit vasculaire, espèce, dose et durée du traitement) (192). Par exemple, des études *in vitro* démontrent que le canrénone induit une relaxation des contractions à la PhE et au KCl, mais ces études étaient réalisées sur des

aortes de rats mâles et utilisaient de très fortes concentrations de canrénone (50-300 μ M) en comparaison à notre étude (41; 289). La différence avec nos résultats peut donc être due aux variations des concentrations de l'antagoniste, au fait que nous l'administrons *in vivo* plutôt qu'*in vitro* et à la gestation qui entraîne de fortes hausses d'hormones stéroïdes dans notre modèle.

De plus, le MR n'est pas spécifique à l'aldostérone puisqu'il peut être activé par le cortisol (corticostérone chez le rat) et inhibé par la progestérone. Il existe toutefois des voies d'inactivation de ces hormones dans les tissus qui répondent à l'aldostérone, tels que les vaisseaux sanguins. Celles-ci assurent que l'activation du MR est causée principalement par l'aldostérone. En effet, la 11 β -HSD2 est exprimée dans l'aorte et elle convertit le cortisol en cortisone chez l'humain et la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone chez les rongeurs (51; 134). Cela permet à l'aldostérone d'agir sur le MR sans que la concentration circulante 1000 fois plus élevée de cortisol n'affecte l'activation de ce dernier. Toutefois, l'expression et l'activité de cette enzyme dans l'aorte n'ont pas été mesurées durant la grossesse bien qu'elles varient dans le placenta en fonction du temps de gestation (321). On peut toutefois supposer que la 11 β -HSD2 est modulée durant la grossesse pour s'adapter aux variations d'aldostérone et de corticostérone et ainsi permettre à l'aldostérone de contrôler la réactivité vasculaire dans l'aorte comme le démontrent nos résultats (Chapitres II et III). Par ailleurs, il a été proposé que le SRAA est activée durant la grossesse pour contrer la hausse de progestérone qui inhibe les fonctions des MR, particulièrement dans les reins (221). Par contre, Quinkler et al. (244; 245) ont démontré que bien que la progestérone avait une forte action antagoniste du MR *in vitro*, elle n'avait qu'un faible effet antagoniste sur les reins lorsqu'elle est administrée *in vivo* à des concentrations 1000 fois plus élevées que celles de l'aldostérone (concentrations similaires à celles du troisième trimestre de gestation). Ces auteurs suggèrent qu'il existe des mécanismes qui métabolisent la progestérone, similaires à l'action de la 11 β -HSD2, et qui permettent aux MR d'être activé principalement par l'aldostérone. Il serait intéressant de déterminer si de tels mécanismes sont présents dans les VSMC de l'aorte et d'évaluer s'ils sont modulés différemment durant la grossesse pour contrer la hausse de progestérone. Chose certaine, nos résultats avec le canrénoate démontrent que les vaisseaux sanguins s'adaptent lors de la grossesse pour permettre à l'aldostérone de contrôler la réactivité vasculaire malgré les hausses importantes d'hormones stéroïdiennes. Ce contrôle de l'activation du MR est d'autant plus important que Geller et al. (102) ont démontré qu'une mutation, dans le domaine de liaison à l'hormone du MR (S810L), rend ce dernier constitutionnellement actif et lui permet d'être activé par les stéroïdes sans groupement hydroxyl en position 21 tels que la progestérone et le spironolactone. De plus, cette mutation

cause une hypertension précoce qui est grandement exacerbée durant la grossesse. Si l'activation des MR est dérégulée par la présence des autres stéroïdes durant la grossesse, nous aurions observé des modifications hémodynamiques dont un changement de la pression artérielle. Nous pouvons donc conclure que les vaisseaux s'adaptent à la hausse des hormones stéroïdiennes durant la grossesse et que les mécanismes assurant l'activation spécifique des MR par l'aldostérone s'adaptent pour maintenir cette fonction.

Parmi les cibles des MR, on retrouve les canaux ioniques et les voies de signalisation qui contrôlent les électrolytes. L'implication des canaux ioniques dans le contrôle de la réactivité vasculaire durant la grossesse est reconnue depuis longtemps (14; 37; 84; 85; 149; 257; 258). Le calcium est un élément essentiel aux mécanismes de contraction des VSMC (215). Notre laboratoire a précédemment démontré que la diminution de réponses aux vasopresseurs associée à la grossesse est due à une altération de l'activité des VDCC (258). Chez les animaux contrôles, les effets de la nifédipine sur les réponses au KCl sont moins importants chez les rates non gestantes que chez les rates gestantes et cet effet semble s'accroître en s'approchant du terme de la gestation (Chapitre II; (240)). Cela suggère que la probabilité d'ouverture des canaux calciques varie durant la grossesse pour s'adapter aux changements hémodynamiques. La probabilité d'ouverture des VDCC est principalement influencée par le potentiel de membrane (215) et la grossesse est associée à une hyperpolarisation des VSMC (200). De plus, une hyperpolarisation aussi petite que de 2 mV peut diminuer la probabilité d'ouverture des VDCC de 30% (215). Le potentiel de membrane étant contrôlé par une variété de canaux et de pompes, plusieurs éléments peuvent influencer l'entrée de calcium dans la cellule. De plus, les concentrations de calcium influencent également l'activation de canaux ioniques dépendants du calcium (18). Ceci démontre donc l'importance de la balance ionique et du synchronisme entre les différents canaux.

Le synchronisme entre les différents canaux est facilité par la localisation des canaux dans certaines régions de la membrane dont les cavéoles (fig. V-1). Ces structures sont des invaginations de la membrane en forme de flasque, enrichies en cholestérol et sphingolipides et stabilisées par les protéines de la famille des cavéolines. Il existe 3 isoformes de cavéoline (1, 2 et 3); Cav-1 étant la plus importante dans les VSMC. Ces protéines se lient au cholestérol et peuvent recruter des protéines à la membrane et affecter la signalisation cellulaire. Au moins trente protéines ont été identifiées comme étant abondantes dans les cavéoles par rapport à la membrane plasmique incluant des récepteurs, des kinases, des phospholipides et des canaux ioniques tels que les BK_{Ca}, les K_{ATP} et la Na⁺/K⁺-ATPase (24; 118; 302). Les cavéoles jouent donc un

rôle important dans la contraction des VSMC, du métabolisme et de la différenciation et la prolifération cellulaire (118).

Les canaux potassiques sont d'importants régulateurs du potentiel membranaire. Les canaux BK_{Ca} agiraient en prévenant l'expression maximale de la réponse myotropique (214). Ils sont principalement contrôlés par le voltage et le calcium intracellulaire, mais leur activité peut également être influencée par leur phosphorylation. Ils sont activés par PKA et PKG et inhibés par PKC et la tyrosine kinase c-Src. De petites molécules telles que les stéroïdes, les acides gras, le PIP₂ et les ROS contrôlent également leur activation (125). Dans les VSMC, les canaux BK_{Ca} sont principalement localisés dans les cavéoles (24; 118) et ils interagissent avec Cav-1 (7). Cette localisation des BK_{Ca} permet de coupler son activité avec les « calcium sparks », des RYR, des RS (fig. V-1) (24; 118). L'espace restreint entre les cavéoles et le RS permet à de faibles modulations du calcium, qui n'affecte pas les concentrations de calcium total, d'influencer l'activité de certains canaux. La diminution de l'effet inhibiteur du NS-1619 avec l'avancement de la grossesse (Chapitre II; (240)) pourrait être due à une diminution de l'entrée de calcium par les VDCC ou à des modifications de l'état métabolique de la cellule. De plus, cette localisation permet aux vasoconstricteurs d'inhiber l'activité des BK_{Ca} par une phosphorylation dépendante de c-Src puisque les tyrosines kinases de la famille Src sont reconnues pour être localisées avec la cavéoline (fig. V-1) (7; 24). L'aldostérone peut également activer c-Src dans les VSMC (40), mais les effets de cette activation sur l'activité des BK_{Ca} n'ont toutefois pas été étudiés. Ils pourraient toutefois expliquer l'effet observé dans les aortes des rates non gestantes traitées au canrénoate (Chapitre II; (240)). En effet, si la signalisation du MR était inhibée par le canrénoate, c-Src ne serait pas activé et le BK_{Ca} serait actif. L'ajout du NS-1619 ne pourrait pas suractiver le canal et son effet inhibiteur serait réduit. Toutefois, puisque les réponses observées dans les aortes de rates gestantes sont opposées à celles des rates non gestantes (Chapitre II; (240)), nous croyons que les voies de signalisation du MR sont modifiées durant la grossesse et ce probablement pour protéger les VSMC des hausses importantes d'aldostérone associée à cette condition.

Un autre élément qui pourrait expliquer la perte de l'effet inhibiteur du NS-1619 avec la progression de la grossesse est une régulation précise de l'expression et de l'activité des différents variants du canal BK_{Ca}. Zhu et al. (349) ont démontré dans le myomètre des rates gestantes que le canal Slo (la sous-unité α formant le pore du BK_{Ca}) est activé par la PKA tandis qu'il est inhibé chez les rates non gestantes. Ceci s'expliquerait par l'expression du variant alternatif STREX (*stress axis-regulated exon*), puisque l'on retrouve chez ce dernier une séquence de phosphorylation qui

permet aux canaux, exprimés de façon hétérologue, d'être inhibés par la PKA. L'expression d'ARN de STREX diminue graduellement avec la progression de la grossesse dans le myomètre. De plus, les œstrogènes sont impliqués dans la diminution de cette expression tandis que la progestérone l'augmente. Cette régulation favoriserait la quiescence du myomètre durant la grossesse tandis qu'elle activerait la contraction à terme. Le variant STREX a été localisé dans les vaisseaux cérébraux (238), mais à notre connaissance sa présence n'a pas encore été démontrée dans l'aorte. Étant donné que d'autres stéroïdes tels que les estrogènes, la progestérone et les corticostéroïdes influencent l'expression du variant STREX, on suggère que l'aldostérone peut moduler cette molécule. Les effets de l'aldostérone sur ce variant devront être évalués plus en profondeur puisque nos résultats montrent un effet opposé du NS-1619 chez les rates non gestantes et les rates gestantes traitées au canrénoate (Chapitre II; (240)). Il serait donc intéressant de caractériser plus en profondeur le contrôle de l'expression des différents variants du BK_{Ca} dans les aortes de rates gestantes pour déterminer s'ils influencent la réactivité vasculaire. Malheureusement, il n'existe pas pour l'instant d'anticorps permettant de différencier le variant STREX du canal traditionnel. Toutefois, dans notre étude, l'expression des isoformes de la sous-unité α traditionnelle n'est pas affectée, ni par les différents stades de grossesse, ni par le traitement au canrénoate (Chapitre III). Cela nous laisse croire que les modifications de réponses observées avec le NS-1619 sont dues à une régulation de l'activité du canal plutôt qu'à une modification de son expression. On ne sait toutefois pas si cette régulation s'opère par une modification des sous-unités régulatrices, un changement dans la stœchiométrie du canal ou un effet direct de l'aldostérone qui module les propriétés cinétiques du canal. Une étude plus approfondie de la signalisation qui influence ce canal est nécessaire pour déterminer spécifiquement les facteurs impliqués dans l'aorte et pour déterminer les voies de signalisation par lesquelles les MR influencent ce canal.

Les canaux K_{ATP} sont également très importants dans le contrôle du potentiel membranaire de repos soit en induisant une hyperpolarisation, soit en retardant le développement des réponses myotropiques (14; 37; 215; 216). Dans les VSMC, les canaux K_{ATP} sont inhibés par l'ATP (principale source d'énergie des cellules) et activés par le Mg⁺²-ADP (92). Il est proposé que les concentrations d'ATP et d'ADP établissent le niveau de base de l'activité des K_{ATP} en agissant comme un frein à la contractilité dont la force est déterminée par le ratio ATP/ADP (86; 92; 216). Les vasodilatateurs et vasoconstricteurs modifient ensuite les réponses contractiles en modulant la force de ce « frein » par des mécanismes de phosphorylation impliquant PKA et PKC (92). Des modifications du métabolisme cellulaire, modifiant le ratio

ATP/ADP, pourraient donc modifier l'activité de ce canal. Compte tenu des changements importants du métabolisme durant la grossesse (113), nous suggérons qu'ils peuvent être responsables d'un rééquilibrage de l'activité de base des K_{ATP} (Chapitre II; (240)). Ce contrôle peut s'effectuer en partie par la localisation des K_{ATP} dans les cavéoles (fig. V-1) (69; 118). En effet, cette localisation permet de jumeler ce canal à des mécanismes qui influencent le ratio ATP/ADP tels que la glycolyse (24) et la pompe Na^+/K^+ -ATPase (fig. V-1) (107). Elle peut également faciliter un contrôle par les voies de signalisation activées par le MR puisque nos résultats démontrent une augmentation de l'effet inhibiteur de la cromakalim dans les aortes de rates gestantes (Chapitre II; (240)). Étonnamment, cette régulation est variable avec la progression de la grossesse puisque cet effet n'est pas observé chez les rates gestantes de 19 jours. Un effet semblable est observé dans l'étude des courbes concentration-réponse au TEA, un bloqueur non spécifique des canaux potassiques, où les courbes de réponse des aortes au 19^e jour de grossesse entre les animaux contrôles et ceux recevant le canrénoate sont identiques. Par contre, on observe aux jours 17 et 22, une tendance pour une diminution de la sensibilité au TEA des aortes des animaux traités au canrénoate (Chapitre III). Comme le 19^e jour de gestation correspond au début de la baisse de pression artérielle, on peut présumer que l'aldostérone modifie l'activité de ce canal pour permettre aux vaisseaux de s'adapter à ce changement hémodynamique. Une étude des voies de signalisation qui contrôlent l'activité des K_{ATP} sera toutefois nécessaire pour comprendre comment son activité est influencée durant la grossesse et pour être en mesure de bien cerner son rôle sur la réactivité vasculaire.

On ne pouvait toutefois évoquer le contrôle du potentiel membranaire sans étudier l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Cette pompe qui fonctionne contre le gradient électrochimique de la cellule, nécessite l'hydrolyse de l'ATP pour être active. Elle est responsable, entre autres, de rétablir le gradient suite à une dépolarisation et de contrôler le potentiel de membrane. Pour évaluer son activité dans l'aorte, nous avons utilisé une méthode semblable à celle de Webb et Bohr (335) qui ont démontré que dans une solution de Krebs sans potassium, la relaxation du vaisseau sanguin au KCl est proportionnelle à l'activité de la pompe. D'autres techniques ont été utilisées pour obtenir une mesure plus directe de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Deux techniques spectrophotométriques ont été évaluées, la première mesurant, en temps réel, l'oxydation de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui est couplée à la formation d'ADP par l'ATPase (267) et la seconde, mesurant la formation de phosphate inorganique résultant de l'hydrolyse de l'ATP (21). Une technique par HPLC mesurant les taux d'ATP et d'ADP suite à une réaction enzymatique en présence ou non d'ouabaine a également été essayée (263; 300; 338).

Malheureusement, bien que ces techniques sont très efficaces dans le rein, nous n'avons pas réussi à obtenir la sensibilité nécessaire afin de déterminer l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte de rat de façon reproductible. Il aurait fallu des quantités de tissu trop importantes pour obtenir des résultats fiables. Une technique utilisant le rubidium (83; 87) permettrait de mesurer l'activité de la pompe dans l'aorte, mais malheureusement notre laboratoire n'est pas équipé pour réaliser une telle expérience.

Néanmoins, nos résultats nous permettent de déterminer que l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase diminue avec la progression de la grossesse et plus particulièrement à partir du jour 19 (Chapitre III). Le traitement au canrénoate réussit toutefois à renverser cet effet et à ramener l'activité de la pompe à des niveaux similaires à ceux des autres jours de gestation. Toutefois, il est connu que le canrénone peut agir comme agoniste partiel sur le site de liaison des digitales sur la Na^+/K^+ -ATPase, bloquant la liaison de l'ouabaïne à ce site, en plus d'être reconnu comme antagoniste des MR (19; 91; 276; 346). Comme la méthodologie utilisée dans cette étude ne nous permet pas de différencier la double action de notre antagoniste, nous avons traité un autre groupe de rates gestantes avec du PST 2238, un antagoniste de l'ouabaïne endogène sur la Na^+/K^+ -ATPase (88; 89). Le PST 2238 (Rostafuroxin) est en développement pour traiter une sous-population de patients hypertendus ayant un polymorphisme du gène de l'adducin ou ayant des niveaux élevés d'ouabaïne endogène. La fin de l'étude clinique de phase II (OASIS) révèle que cette molécule est efficace pour traiter l'hypertension chez ces patients (88). Le PST 2238 est reconnu pour sa spécificité sur la Na^+/K^+ -ATPase sans interférence avec d'autres récepteurs, d'enzymes impliquées dans le contrôle de la pression artérielle, et dans le contrôle des hormones stéroïdiennes (89). Il permet d'étudier l'impact de l'inhibition du site de liaison des digitales de la pompe sur l'activité de celle-ci dans l'aorte. Comme en présence de canrénoate, nous avons observé avec le PST 2238 une augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase en fin de grossesse (Chapitre III). Cela permet de conclure que les effets observés en présence de canrénoate sont dus à ses effets d'agoniste partiel sur la pompe. L'inhibition de la pompe associée à la grossesse est donc liée à une inhibition par un facteur endogène; les stéroïdes cardiotoniques semblent être de bons candidats pour cette fonction puisqu'ils sont augmentés durant la grossesse (87). Zhang et al. ont d'ailleurs démontré que le canrénone et le PST 2238 normalisent le tonus myogène d'artères traitées avec de l'ouabaïne (346). Pour étudier plus spécifiquement les effets des MR, ils auraient fallu administrer un antagoniste plus spécifique tel que l'éplérénone ou un des nouveaux composés non-stéroïdiens présentement en développement (153).

On ne peut toutefois pas négliger un effet de notre traitement sur le contrôle de l'expression des gènes de la Na^+/K^+ -ATPase. Pour vérifier cette possibilité, nous avons mesuré l'expression des isoformes de la sous-unité α (sous-unité catalytique) dans les aortes de nos animaux. La grossesse n'a pas affecté l'expression de la pompe, mais le traitement au canrénoate a réduit l'expression d' $\alpha 1$ sans affecter celle d' $\alpha 2$ (Chapitre III). Nous avons donc conclu que l'expression des différents isoformes est contrôlée indépendamment par les minéralocorticoïdes. Les gènes encodant les différents isoformes de la sous-unités α sont d'ailleurs localisés sur des chromosomes différents chez la souris, suggérant que leur expression n'est pas contrôlée par un élément de réponse commun (147). De plus, le patron d'expression des différentes sous-unités α est spécifique à chaque tissu et il varie durant le développement de l'animal (224). Cela laisse croire que durant la grossesse, le patron d'expression de la pompe à sodium pourrait être modifié pour s'adapter aux multiples changements hormonaux associés à cette condition. En effet, l'expression et l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase sont contrôlées par plusieurs hormones telles que les minéralocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes, l'insuline ou les estrogènes (83; 202; 209; 225). L'aldostérone favorise l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase en augmentant son recrutement à la membrane et en induisant la synthèse de nouvelles sous-unités (83). La majorité des études évaluant les effets génomiques de l'aldostérone sur la Na^+/K^+ -ATPase démontre une modulation des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ (83; 209; 222). Nos résultats chez les rates traitées au canrénoate vont dans le même sens, suggérant que les minéralocorticoïdes modulent l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ et que l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ est contrôlée par d'autres facteurs. Il serait toutefois intéressant d'effectuer un profil complet de la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase (sous-unités catalytiques et régulatrices) par les hormones stéroïdiennes et d'évaluer si leur importante augmentation durant la grossesse ou si une interaction entre elles influencent le contrôle de l'activité de la pompe.

Bien que l'expression d' $\alpha 1$ est diminuée par les minéralocorticoïdes, nous croyons que la sous-unité $\alpha 2$ compense pour la diminution d' $\alpha 1$ et qu'elle est responsable des changements de réactivité vasculaire observés dans les bains d'organes (Chapitre III). Zhang et al. (346) soutiennent que la sous-unité $\alpha 2$ est responsable du contrôle du tonus myogène et de la pression artérielle chez la souris. Cela est également en accord avec les données de Shelly et al. (281) qui ont démontré, à l'aide de souris génétiquement modifiées pour les gènes de la sous-unité $\alpha 1$ ou $\alpha 2$, que les différentes sous-unités ont des fonctions différentes dans les aortes. En effet, $\alpha 2$ est principalement reliée à la fonction contractile des VSMC par sa localisation spécifique dans la cellule. $\alpha 1$ est exprimée de façon ubiquitaire à la membrane tandis que $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (dépendamment

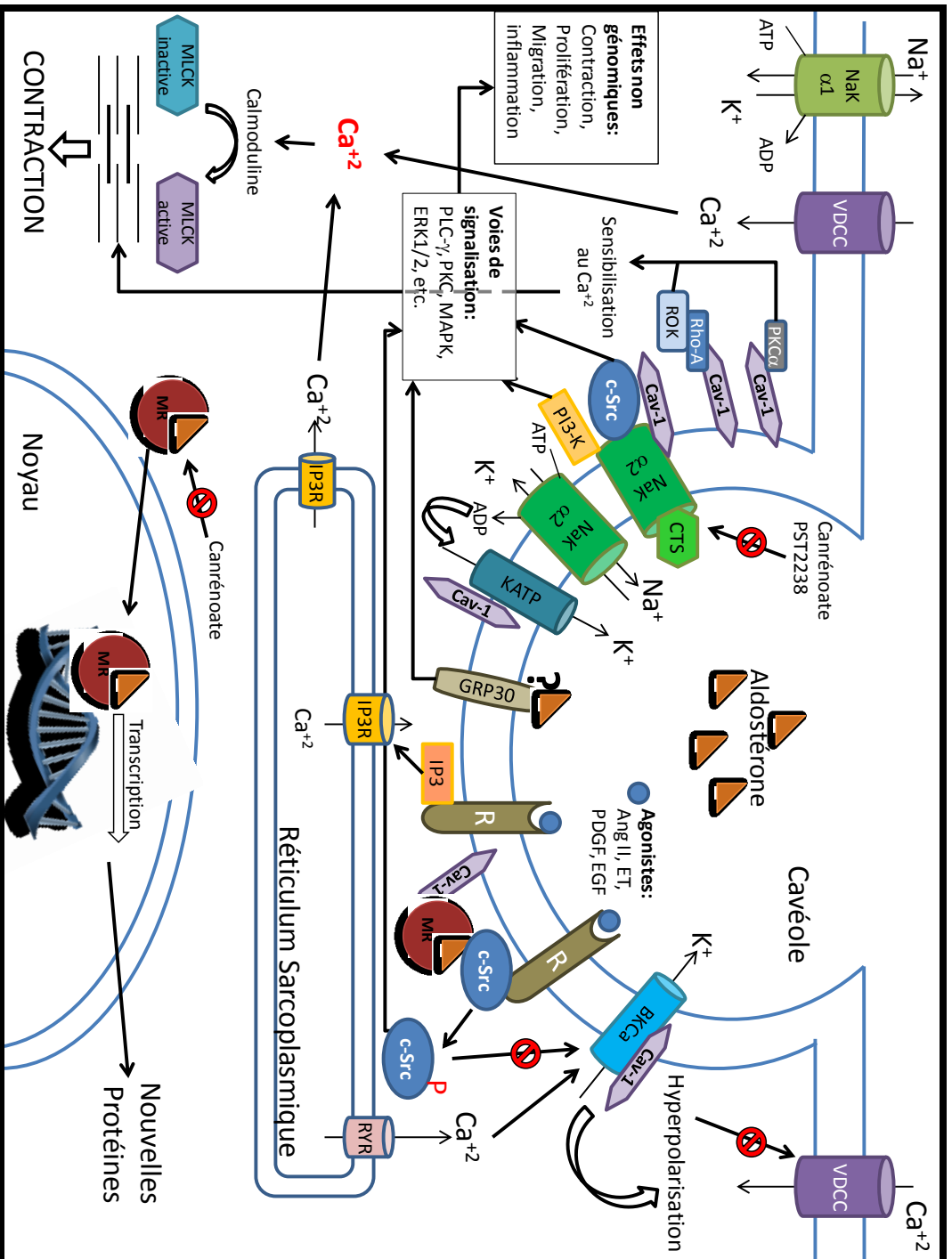


Figure V.1 : Schématisation des effets de l'aldostérone sur les VSMC.

du type cellulaire) sont présents dans des régions de la membrane rapprochées des réticulum endo/sarcoplasmiques, dont les cavéoles (fig. V-1) (139; 281). De plus, une localisation spécifique près des cavéoles permet également à la Na^+/K^+ -ATPase d'interagir avec d'autres canaux ioniques, comme les canaux potassiques, et d'influencer leur activité (fig. V-1). La pompe à sodium pourrait donc être responsable de l'hyperpolarisation des VSMC associée à la grossesse (200) et de la baisse de réactivité aux vasoconstricteurs par son influence sur les autres canaux ioniques. Le contrôle de son activité durant la grossesse serait donc essentiel au bon déroulement des changements hémodynamiques. Toutefois, les minéralocorticoïdes ne semblent pas être le facteur de régulation principal de la Na^+/K^+ -ATPase durant la grossesse dans les vaisseaux sanguins; les stéroïdes cardiotoniques semblent par contre être des candidats possibles.

Nos études de la réactivité vasculaire ont permis de démontrer que la baisse de réponses aux vasopresseurs s'installe tôt durant la grossesse avant même que ne diminue la pression artérielle. De plus, nos résultats déterminent que l'activité des canaux ioniques est modifiée pour s'adapter aux changements vasculaires observés. Tous les canaux sont contrôlés pour fonctionner comme un tout puisque l'activité de l'un peut influencer l'activité d'un autre. En bloquant la réponse des MR avec le canrénoate, nous avons également déterminé que l'activité de certains canaux est influencée différemment par l'activation du MR chez les rates non gestantes et gestantes. Ces résultats nous ont amené à proposer que l'aldostérone participe à l'adaptation de la réactivité vasculaire de la grossesse. Comme la réactivité vasculaire est l'un des éléments qui contrôlent la pression artérielle, et que le canrénoate modifie la réactivité vasculaire, nous voulions déterminer, les impacts d'une inhibition des MR sur la pression artérielle.

Dans cette étude, deux doses de canrénoate (20 et 60 mg/kg-jr) ont été administrées aux rates gestantes. Cette décision fait suite à des travaux préliminaires de notre laboratoire (Provencher M, Houde V, Brochu M et St-Louis J; travaux non publiés) et à l'étude de Bos et al. (29) effectuée sur le rat, où un traitement au canrénoate de potassium d'une semaine, à une dose de 20 mg/kg-jr, bloque complètement les effets cardiovasculaires de l'aldostérone, mais n'induit aucune modification de la diurèse, natriurèse et kaliurèse. Comme ces éléments influencent la pression artérielle, nous avons décidé d'étudier un groupe recevant une dose de canrénoate de 60 mg/kg-jr, puisqu'à cette concentration des effets d'inhibition de la pression artérielle ont été rapportés (70; 116; 325).

En plus d'évaluer les paramètres hémodynamiques, nous avons étudiés plusieurs paramètres physiologiques pour déterminer l'impact de notre traitement sur la grossesse : la prise de poids quotidienne, la mesure de la consommation d'eau des animaux (puisque le traitement était administré dans l'eau de breuvage), le poids des ratons et des placentas, ainsi que celui des organes de la mère (Chapitre IV). Parmi ces éléments, seule la prise de poids des mères recevant 60 mg/kg·jr de canrénoate était inférieure aux autres groupes. Chez ces mêmes animaux, nous avons observé une hausse modeste mais significative de l'osmolalité bien que les concentrations de sodium et de potassium sériques ainsi que l'hématocrite ne sont pas significativement modifiées (Chapitre IV). Cette hausse d'osmolalité peut s'expliquer par un léger effet diurétique et natriurétique à une dose de 60 mg/kg·jr de canrénoate. Cet effet se reflète également dans une légère hausse de l'hématocrite bien qu'elle est non significative (contrôle : $35.5 \pm 0.7 \%$ (N=9); Can 60 mg/kg·jr : $37.5 \pm 0.7 \%$ (N=13); Chapitre IV).

Afin de vérifier l'efficacité de l'administration du traitement, nous avons mesuré les concentrations sériques de canrénone, un des principaux métabolites du canrénoate. Étonnamment, il n'y a pas de différence entre les taux sériques de canrénone chez les deux groupes (Chapitre IV), bien que l'un d'eux a reçu presque trois fois la dose de canrénoate par rapport à l'autre groupe (Prise moyenne de canrénoate : 22.66 ± 0.94 vs 57.95 ± 1.73 mg/kg·jr; Chapitre IV). Nous croyons donc que ces animaux excrètent les surplus de canrénone. Après une administration intraveineuse de canrénoate de potassium marqué radioactivement, une excrétion de 47.5% dans l'urine et de 14.4% dans les selles est rapportée chez l'humain (141; 143). De plus, Ramsay et al. (247) ont démontré qu'il y a une corrélation entre la dose de canrénoate de potassium administrée, la concentration plasmatique après 12h et l'excrétion urinaire de canrénone. Par contre, chez le rat, l'excrétion d'une dose de spironolactone se fait majoritairement par une excrétion biliaire et l'on retrouve moins de 1% de la dose de spironolactone excrétée sous forme de canrénone dans l'urine (141; 142). Le canrénone est métabolisé par trois voies différentes avant d'être éliminé. La première implique l'hydrolyse de l'anneau γ -lactone en acide canrénoïque qui sera excrété dans l'urine, principalement sous la forme de conjugué ester glucuronide. La deuxième voie nécessite une hydroxylation pour obtenir le 15P-OH-canrénone qu'on retrouve dans l'urine des rats (ou 15O-OH-canrénone chez l'homme). Finalement, le canrénone peut être réduit en plusieurs dérivés di-, tétra-, et hexahydro (141). Malheureusement, l'urine et les matières fécales des animaux étudiés n'ont pas été prélevées. Nous ne pouvons pas vérifier si les animaux qui ont reçu 60 mg/kg·jr de canrénoate ont éliminé

une plus grande quantité de canrénone ou de ses métabolites bien que cela nous semble une hypothèse plausible.

Les deux doses administrées ont toutefois entraîné une augmentation de l'aldostérone supérieure à celle induite par la grossesse. De plus, chez les rates recevant 60 mg/kg·jr, une augmentation de la PRA est présente. Cela suggère que le canrénate bloque la boucle de rétroaction lorsque l'action de l'aldostérone sur le MR est inhibée.

De plus, chez les rates qui reçoivent la plus forte dose de canrénate, on remarque également une augmentation de la corticostérone. Cette augmentation est surprenante car les actions de la corticostérone sont principalement contrôlées par les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) et le canrénate ne s'y lie pas. Toutefois, Spencer et al. (291) ainsi que Atkinson et al. (13) ont démontré que les MR sont importants pour le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et que l'administration d'un antagoniste du MR induit une augmentation des niveaux de corticostérone. De plus, bien que la grossesse est associée à des augmentations des niveaux plasmatiques d'ACTH, de corticostérone et d'aldostérone, Lingis et al. (174) ont démontré qu'une infusion de canrénate chez des brebis gestantes réussit à augmenter encore plus leur expression. Ils ont également déterminé que même si le canrénate augmente également ces substances chez les brebis non gestantes, le profil temporel de la réponse varie entre les deux groupes. En effet, la réponse est rapide chez les non gestantes, suggérant que le rôle des MR dans le rétrocontrôle de l'axe HHS est atténué durant la grossesse. Par contre, la réponse plus tardive chez les brebis gestantes reflète une augmentation de l'importance relative des corticostéroïdes, particulièrement l'aldostérone, dans les mécanismes homéostatiques contrôlant le volume plasmatique et la pression artérielle durant la grossesse. Toutefois, avec les expériences effectuées dans notre étude, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si cette hausse de corticostérone affecte les réponses observées. Une série d'études avec un antagoniste des glucocorticoïdes permettrait d'éclaircir leurs rôles dans les modifications hémodynamiques associées à la grossesse.

À cause des augmentations des composantes du SRAA, qui activent normalement le système cardiovasculaire, nous avons mesuré à la fois la pression artérielle, la pression pulsée, le rythme cardiaque ainsi que le niveau d'activité de nos animaux, à l'aide d'un système de télémétrie. Malgré des modifications de la réactivité vasculaire de l'aorte (Chapitres II et III), nous n'avons pas observé d'effets hémodynamiques systémiques de notre traitement (Chapitre IV).

Bien que le spironolactone et le canrénate sont utilisés cliniquement (25; 94), leurs effets sur la pression artérielle de différents modèles animaux sont contradictoires (55; 70; 251; 325). De plus, la relation dose-réponse du spironolactone dans le traitement de l'hypertension essentielle est telle que des doses de 200 ou 400 mg/jr ne procure pas une meilleure baisse de la pression qu'une dose de 100 mg/jr (274; 284). Cela pourrait expliquer que nous n'observons pas de différence de réponses entre les deux doses que nous avons administrées. Lorsque les MR sont liés à un antagoniste, ils sont déstabilisés (57; 153) puis une ubiquitination et une dégradation suivent cette liaison (153; 312; 345). La demi-vie du MR détermine alors la durée d'action pharmacodynamique (153). Comme les concentrations sériques de canrénone sont identiques dans les deux groupes (Chapitre IV), nous semblons avoir atteint la concentration sanguine maximale. Si tous les récepteurs sont déjà occupés de façon maximale avec 20 mg/kg-jr, il est normal de ne pas observer de différences de réponse entre les deux groupes. Dans ces conditions, nous aurions dû observer des modifications de la pression artérielle si l'aldostérone, via son action sur les MR, était responsable des modifications hémodynamiques observées durant la grossesse. Nous avons précédemment démontré qu'une inhibition du SRAA par une diète élevée en sodium empêchait la baisse de pression artérielle associée à la grossesse. Nos résultats démontrent toutefois que les MR ne sont pas responsables de cet effet malgré la hausse importante d'aldostérone durant cette période. Un autre mécanisme ou un autre élément du SRAA ou même une combinaison de plusieurs éléments semblent être impliqués dans le contrôle de la pression artérielle durant la grossesse.

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'hypothèse de départ de cette étude était que *l'augmentation des taux sériques d'aldostérone durant la grossesse est responsable des changements hémodynamiques observés et que ces effets sont causés par l'activation des MR*. La baisse de pression artérielle survenant au 2^e trimestre de grossesse chez la femme, où durant la 3^e semaine de gestation chez la rate, est paradoxale puisque qu'elle est accompagnée de fonctions qui la font normalement augmentée telles que des hausses de la fréquence cardiaque, du volume sanguin et du SRAA. Or, les mécanismes exacts de cette baisse de pression artérielle sont encore inconnus. Parmi les hypothèses étudiées, on compte les diverses fonctions endothéliales, le remodelage des vaisseaux sanguins et l'implication des différentes composantes du SRAA. L'étude des mécanismes impliqués dans les modifications hémodynamiques de la grossesse est primordiale puisque lorsqu'ils ne prennent pas place correctement, la femme développe des pathologies telles que la prééclampsie. Cette pathologie qui affecte 5 à 10% des grossesses est l'une des causes majeures de morbidité et mortalité maternelles et fœtales. Malheureusement, son étiologie est encore inconnue et le seul traitement est l'accouchement prématuré. La compréhension des mécanismes physiologiques de la grossesse est donc essentielle si l'on veut être en mesure d'intervenir lors des cas pathologiques.

Dans notre laboratoire, nous croyons que les composantes du SRAA, et plus particulièrement l'aldostérone, sont impliqués dans les changements hémodynamiques de la grossesse. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons administré du canrénoate de potassium, un antagoniste des MR, à des rates durant les jours 15 à 22 de la gestation. Nous avons premièrement évalué l'effet de ce traitement sur la réactivité vasculaire d'anneaux aortiques dénudés d'endothélium à différentes périodes de gestations (jours 17, 19 et 22). Notre étude démontre que le canrénoate augmente la réactivité vasculaire des aortes à la PhE et au KCl. Puis, à l'aide de modulateurs pharmacologiques, nous avons déterminé que le canrénoate affecte la réactivité vasculaire en modifiant l'activité de certains canaux calciques et potassiques (VDCC, BK_{Ca} et K_{ATP}). Ces résultats suggèrent qu'une modification du potentiel membranaire est responsable de la diminution de réponse aux vasoconstricteurs associée à la gestation.

Puisque nous croyions que le potentiel de membrane était impliqué, nous avons caractérisé, à l'aide d'agents pharmacologiques, l'activité et l'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans l'aorte thoracique des rates traitées au canrénoate. Nos résultats révèlent une baisse de l'activité de la pompe avec la progression de la grossesse, qui est renversée par le traitement au canrénoate. Toutefois, les modifications d'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase sont probablement dues

aux fonctions d'agoniste partiel du canrénoate sur la pompe à sodium plutôt qu'à ses fonctions d'antagoniste du MR. De plus, nous avons déterminé que la sous-unité $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ -ATPase, plutôt que la sous-unité $\alpha 1$, serait impliquée dans les modifications de réactivité vasculaire.

Finalement, nous avons effectué des études *in vivo* sur nos animaux traités au canrénoate. En évaluant des paramètres physiologiques et biochimiques des mères et des fœtus, nous avons démontré que le canrénoate n'a pas d'incidence sur le déroulement de la grossesse. Nous avons également évalué les effets du traitement sur les modifications hémodynamiques de la grossesse par une méthode de télémétrie. Bien que nos résultats montrent que le canrénoate induit une augmentation des composantes du SRAA (PRA et aldostérone), il n'affecte pas le rythme cardiaque, la pression pulsée et la pression artérielle.

Puisque le canrénoate n'a pas modifié les composantes hémodynamiques mesurées par radiotélémétrie, nous sommes obligés de conclure que notre hypothèse de départ était erronée, malgré les modifications de réactivité vasculaire observées *in vitro*. L'aldostérone, par son action sur les MR, n'est pas le principal responsable des changements hémodynamiques observés durant la grossesse.

Plusieurs éléments devraient toutefois être approfondis et plusieurs perspectives de recherche entreprises à partir des travaux présentés dans ce document même si l'hypothèse initiale est réfutée.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur les mécanismes qui ont engendré les modifications de réactivité vasculaire observées et de déterminer comment les MR sont impliqués dans ces réponses. Pour ce faire :

- Les connaissances sur les voies de signalisation stimulées par l'activation des MR dans les muscles lisses vasculaires doivent être approfondies. Il faut déterminer un profil complet des réponses génomiques versus non génomiques. Plusieurs voies de signalisation s'entrecroisent ce qui rend la dissociation de certains éléments difficile à accomplir, mais une vue d'ensemble des différents phénomènes sera nécessaire pour déterminer les mécanismes qui règlent la réactivité vasculaire.
- Il faut évaluer comment les unités régulatrices des canaux ioniques sont influencées par la signalisation des MR puisqu'elles peuvent modifier de façon importante leur

activité. La présente étude ciblait les sous-unités qui forment les pores des canaux ioniques, mais elles ne sont qu'une partie de l'équation.

- Comme les canaux fonctionnent avec un certain synchronisme et que l'activité des uns peut modifier l'activité des autres, il faut étudier leurs interactions. L'emphase mise sur des structures telles que les cavéoles au cours des dernières années a permis de démontrer l'importance de la localisation de plusieurs éléments dans le bon fonctionnement cellulaire. Il faut déterminer si la signalisation des MR ou si la grossesse engendrent des changements dans cette dynamique structurelle.
- Il faut évaluer l'impact du traitement au canrénoate sur l'endothélium vasculaire et déterminer comment cette réponse influence la réactivité vasculaire. Heylen et al. (122) ont démontré qu'*in vitro*, l'aldostérone induit une vasodilatation lorsqu'elle est appliquée dans la lumière du vaisseau (côté endothélial). Par contre, lorsqu'elle est en contact avec les VSMC, elle induit une vasoconstriction. La réponse vasculaire est donc une balance entre les deux éléments. Comme notre traitement est administré *in vivo*, la présence d'endothélium pourrait expliquer l'absence de modification de pression artérielle bien qu'on voit une augmentation de la réactivité vasculaire dans les anneaux aortiques dénudés d'endothélium. Il serait donc important d'évaluer la signalisation des MR dans les cellules endothéliales.
- Finalement, il faut développer les techniques appropriées pour travailler avec du tissu frais ou ayant subi le moins de modifications possibles afin de reproduire le plus fidèlement possible ce qui se produit *in vivo*. En effet, la majorité des travaux qui impliquent la signalisation cellulaire ou l'étude des composantes structurales des cellules est généralement réalisée sur des cellules en culture. Dans les VSMC, lorsqu'on veut évaluer des voies de signalisation, il faut tenir compte que la mise en culture des cellules peut induire des modifications de l'expression de différents canaux puisque la cellule n'est plus soumise aux forces d'étirements du flot sanguin. Par exemple, la sous-unité $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ -ATPase n'est pas exprimée dans les VSMC en culture (222) tandis qu'elle est exprimée dans les tissus vasculaires des rats *in vivo* (202). Une autre problématique similaire s'applique également avec la grossesse, où les conditions du milieu varient constamment avec la progression de celle-ci. La reproduction de ces conditions changeantes avec le temps, dans un milieu de culture,

sont impossible à maîtriser. On peut seulement contrôler certains éléments à la fois. Il faut donc se rappeler qu'on n'obtient pas un portrait complet en travaillant dans ces conditions.

Dans un deuxième temps, il serait pertinent d'obtenir des données sur les effets des autres hormones stéroïdes qui sont également augmentées durant la grossesse. En effet, les modifications hormonales engendrées durant la grossesse font parties des complications associées à la présente étude. Comme mentionné, les MR ne sont pas spécifiques pour l'aldostérone. Ils peuvent également être activés par les glucocorticoïdes et inhibés par la progestérone, qui sont tous deux augmentés durant la gestation. Toutefois, pour assurer un bon déroulement de la grossesse, nous ne pouvons éliminer l'expression hormonale. Pour déterminer l'impact des autres hormones sur les modifications de réactivité vasculaire associé à la gestation. Il faut :

- Évaluer les effets d'antagonistes de plusieurs récepteurs hormonaux, seuls ou en combinaison, sur des vaisseaux *in vitro*, puis essayer d'associer les résultats obtenus avec les effets *in vivo* pour tenter de départager les effets observés.

Dans un troisième temps, il faudrait évaluer les effets d'un antagoniste des MR sur la réactivité d'autres lits vasculaire pour déterminer si les réponses observées sont modifiées différemment durant la grossesse puisque certains vaisseaux (particulièrement les vaisseaux utérins) subissent un grand remodelage pour s'adapter aux modifications hémodynamiques. De plus, comme les modifications du tonus des artères de résistance influencent la pression artérielle, des études sur ces vaisseaux permettraient possiblement d'établir un lien entre les réponses vasculaires au minéralocorticoïdes et l'absence d'effet sur la pression artérielle. Pour y parvenir, il faut :

- Traiter des rates gestantes avec un antagoniste des MR et étudier la réactivité vasculaire de différents vaisseaux tels que les mésentériques ou les utérins.
- Caractériser, à l'aide d'outils pharmacologiques, l'activité et l'expression de différents canaux ioniques impliqués dans la vasoconstriction de ces vaisseaux.

Finalement, comme ce projet découle d'un modèle d'hypertension gestationnelle, où en inhibant le SRAA avec une diète élevée en sodium, on inhibe la baisse de pression artérielle associée à la gestation, et que l'aldostérone n'est pas l'élément responsable de ce phénomène, il

faudrait étudier d'autres composantes du SRAA pour déterminer leurs rôles. Une des difficultés rencontrées est de trouver des composés non tératogènes qui peuvent être administrés durant la grossesse sans en altérer son déroulement. Parmi les cibles intéressantes à étudier on retrouve, entre autres :

- L'angiotensine II et ses récepteurs.

Ces derniers sont reconnus pour leurs actions néfastes sur la pression artérielle et ils font partis des cibles thérapeutiques les plus importantes dans le traitement de l'hypertension. De plus, la grossesse entraîne une augmentation de la PRA, et par conséquent des taux d'Ang II (47; 131; 199). En contre partie, la réactivité vasculaire à l'Ang II est diminuée durant la grossesse (131; 237; 278), démontrant que le corps modifie sa réponse normale pour s'adapter aux hausses subites. De plus, des études voulant tester le rôle de l'Ang II durant la grossesse ont administré des inhibiteurs de l'ACE de façon aigue ou chronique (40 à 44h) à des rates en fin de gestation (54). La PRA fut augmenté tandis que la pression artérielle moyenne diminua chez les rates qui recevaient les inhibiteurs. Des résultats similaires ont été obtenus chez 9 femmes qui ont reçu une dose de captopril avant de subir un avortement électif (15). Ces études suggèrent que l'Ang II pourrait contribuer au maintien de la pression artérielle durant la grossesse. Toutefois, les inhibiteurs utilisés sont tératogènes et ne permettent pas des études d'une longue durée.

- La rénine et ses récepteurs

Le développement de composés pour inhiber l'activité de la rénine est beaucoup plus récent que celui des antagonistes de l'Ang II. Seul l'Aliskiren est utilisé cliniquement comme antihypertenseur (331). Par contre, il n'affecte pas la liaison ni l'activation des RPR (218). Si l'Ang II est l'un des composés qui participent au maintien de la pression artérielle durant la grossesse, il serait intéressant de bloquer la cascade en amont et de contrôler sa production. Toutefois, l'innocuité de l'aliskiren durant la grossesse n'a pas encore été rapportée.

Un blocage des RPR pourrait aussi être envisagé pour diminuer la PRA. Il a toutefois été démontré que les RPR sont impliqués, de façon indépendante à la rénine, dans la signalisation des Wnt, des facteurs de croissance essentiels au développement embryonnaire (62). Cela laisse présager que des bloqueurs de ces récepteurs auront des effets tératogènes.

- L'angiotensine 1-7 et l'ACE2

Le duo ACE2/Ang 1-7 a des fonctions opposées à ACE/Ang II. Ils favorisent la vasodilatation et ne sont pas inhibés par les bloqueurs de l'Ang II et de l'ACE. La grossesse entraîne une élévation de ACE2 et de l'Ang 1-7 (32; 322). Il est possible que leurs fonctions dans la grossesse soient d'imposer une opposition à l'Ang II et de favoriser la vasodilatation et la baisse de pression. Des techniques permettant d'isoler et d'étudier leurs actions devront être développées.

- Les autres vasodilatateurs (prostacyclines, NO, bradykinine et VEGF)

Tout comme l'Ang 1-7, d'autres vasodilatateurs seraient importants pour maintenir la circulation maternelle dans un état hypotendu. Valdes et al (322) suggèrent que plusieurs vasodilatateurs seraient interreliés et qu'ils pourraient se relayer durant la grossesse en fonction du milieu endocrinien changeant pour fournir une vasodilatation constante à la mère. Il serait donc intéressant d'évaluer un ou des systèmes vasodilatateurs en comparaison d'un système vasoconstricteur comme celui du SRAA.

Toutes ces pistes de recherche nous permettront d'éclaircir, dans un premier temps, comment la signalisation des MR contrôle la réactivité vasculaire. Elles nous éclaireront également sur l'impact de l'aldostérone sur les vaisseaux sanguins durant la grossesse. Et finalement, elles nous permettront peut-être d'identifier les mécanismes responsables de la baisse de pression artérielle associée à la gestation. Développer une bonne compréhension des mécanismes physiologiques qui se déroulent dans cette condition particulière qu'est la grossesse, nous permettra éventuellement de déterminer ce qui cause les pathologies qui découlent d'une mauvaise mise en place des mécanismes normaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abdallah MA, Lei ZM, Li X, Greenwold N, Nakajima ST, Jauniaux E and Rao C.** Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 952-956, 2004.
2. **Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K, Connelly KA, Yuen D, Trogadis J, Herzenberg AM, Kuliszewski MA, Leong-Poi H and Gilbert RE.** The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension* 54: 261-269, 2009.
3. **Agarwal MK and Mirshahi M.** General overview of mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol Ther* 84: 273-326, 1999.
4. **Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP and Cole WC.** Protein kinase C inhibits delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271: H109-H119, 1996.
5. **Al-Gubory KH, Solari A and Mirman B.** Effects of luteectomy on the maintenance of pregnancy, circulating progesterone concentrations and lambing performance in sheep. *Reprod Fertil Dev* 11: 317-322, 1999.
6. **Albert AP and Large WA.** Signal transduction pathways and gating mechanisms of native TRP-like cation channels in vascular myocytes. *J Physiol* 570: 45-51, 2006.
7. **Alioua A, Lu R, Kumar Y, Eghbali M, Kundu P, Toro L and Stefani E.** Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression. *J Biol Chem* 283: 4808-4817, 2008.
8. **Ambroisine ML, Favre J, Oliviero P, Rodriguez C, Gao J, Thuillez C, Samuel JL, Richard V and Delcayre C.** Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (BKCa) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 116: 2435-2443, 2007.
9. **Aperia A.** Regulation of sodium/potassium ATPase activity: impact on salt balance and vascular contractility. *Curr Hypertens Rep* 3: 165-171, 2001.

10. **Aron DC, Findling JW and Tyrrell JB.** Glucocorticoides & Adrenal Androgens. In: Basic & Clinical Endocrinology, edited by Greenspan FS and Gardner DG. New York ; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004, p. 362-413.
11. **Ashcroft FM and Gribble FM.** Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *J Diabetes Complications* 14: 192-196, 2000.
12. **Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MR, Pidgeon J and Soni S.** Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 330: 81-93, 1982.
13. **Atkinson HC, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Wiles CC and Lightman SL.** Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E1011-E1022, 2008.
14. **Auger K, Beausejour A, Brochu M and St-Louis J.** Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1848-H1856, 2004.
15. **August P, Lenz T, Ales KL, Druzin ML, Edersheim TG, Hutson JM, Muller FB, Laragh JH and Sealey JE.** Longitudinal study of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive pregnant women: deviations related to the development of superimposed preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1612-1621, 1990.
16. **Babenko AP, Gonzalez G and Bryan J.** Pharmacology of sulfonylurea receptors. Separate domains of the regulatory subunits of K(ATP) channel isoforms are required for selective interaction with K(+) channel openers. *J Biol Chem* 275: 717-720, 2000.
17. **Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC and Ganten D.** Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl)* 79: 76-102, 2001.
18. **Bae YM, Kim KS, Park JK, Ko E, Ryu SY, Baek HJ, Lee SH, Ho WK and Earm YE.** Ca²⁺-dependent membrane currents in vascular smooth muscle cells of the rabbit. *Life Sci* 69: 2451-2466, 2001.
19. **Bagrov AY, Shapiro JI and Fedorova OV.** Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61: 9-38, 2009.

20. **Beausejour A, Auger K, St-Louis J and Brochu M.** High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375-H383, 2003.
21. **Beausejour A, Houde V, Bibeau K, Gaudet R, St-Louis J and Brochu M.** Renal and cardiac oxidative/nitrosative stress in salt-loaded pregnant rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1657-R1665, 2007.
22. **Bentley-Lewis R, Graves SW and Seely EW.** The renin-aldosterone response to stimulation and suppression during normal pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 24: 1-16, 2005.
23. **Berg AA, Thor L and Johansson ED.** Luteectomy in early pregnancy. A report of three cases. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 64: 249-251, 1975.
24. **Bergdahl A and Sward K.** Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 289-299, 2004.
25. **Black HR.** Evolving role of aldosterone blockers alone and in combination with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers in hypertension management: a review of mechanistic and clinical data. *Am Heart J* 147: 564-572, 2004.
26. **Blaustein MP and Hamlyn JM.** Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1219-1229, 2010.
27. **Bogic LV, Mandel M and Bryant-Greenwood GD.** Relaxin gene expression in human reproductive tissues by in situ hybridization. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 130-137, 1995.
28. **Booth RE, Johnson JP and Stockand JD.** Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 26: 8-20, 2002.
29. **Bos R, Mougenot N, Mediani O, Vanhoutte PM and Lechat P.** Potassium canrenoate, an aldosterone receptor antagonist, reduces isoprenaline-induced cardiac fibrosis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 1160-1166, 2004.
30. **Brayden JE.** Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 312-316, 2002.

31. **Brochu M, Lehoux JG and Picard S.** Effects of gestation on enzymes controlling aldosterone synthesis in the rat adrenal. *Endocrinology* 138: 2354-2358, 1997.
32. **Brosnihan KB, Neves LA, Anton L, Joyner J, Valdes G and Merrill DC.** Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res* 37: 1255-1262, 2004.
33. **Brunton PJ, Arunachalam S and Russel JA.** Control of neurohypophysial hormone secretion, blood osmolality and volume in pregnancy. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 8: 27-45, 2008.
34. **Buraei Z and Yang J.** The Beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* 90: 1461-1506, 2010.
35. **Burton GJ, Sibley CP and Jauniaux ERM.** Placental Anatomy and Physiology. In: *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*, edited by Gabbe SJ, Niebyl JR and Simpson JL. New York: Churchill Livingstone, 2007, p. 3-19.
36. **Cachofeiro V, Miana M, de Las HN, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J and Lahera V.** Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 331-335, 2008.
37. **Cadorette C, Sicotte B, Brochu M and St-Louis J.** Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H567-H576, 2000.
38. **Callera GE, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL and Touyz RM.** c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 46: 1032-1038, 2005.
39. **Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S and Schiffrin EL.** Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 45: 773-779, 2005.
40. **Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano AC, He Y, Tostes RC, Schiffrin EL and Touyz RM.** Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovasc Res* 91: 720-731, 2011.

41. **Cargnelli G, Trevisi L, Debetto P, Luciani S and Bova S.** Effects of canrenone on aorta and right ventricle of the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 540-547, 2001.
42. **Carsten ME and Lu MC.** Endocrinology of Pregnancy and Parturition. In: *Essentials of Obstetrics and Gynecology*, edited by Hacker NF, Moore JG and Gambone JC. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004, p. 57-64.
43. **Catterall WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555, 2000.
44. **Causevic M and Mohaupt M.** 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pregnancy and preeclampsia. *Mol Aspects Med* 28: 220-226, 2007.
45. **Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA and Albiston AL.** The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cell Mol Life Sci* 61: 2728-2737, 2004.
46. **Challis JR and Connor K.** Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: mother, fetus, or both? *Endocrinology* 150: 1073-1074, 2009.
47. **Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T and Schrier RW.** Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 54: 2056-2063, 1998.
48. **Chatterjee A and Chatterjee R.** How little luteal tissue of rats is needed to maintain pregnancy till term--an experimental verification. *Acta Anat (Basel)* 144: 329-331, 1992.
49. **Chien EKS and Feltovich H.** Maternal Biological, Biomechanical, and Biochemical Changes in Pregnancy. In: *Clinical Obstetrics The Fetus & Mother*, edited by Reece EA and Hobbins JC. Malden: Blackwell Publishing Ltd, 2007, p. 633-644.
50. **Christ M, Gunther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E and Wehling M.** Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 99: 1485-1491, 1999.
51. **Christy C, Hadoke PW, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR and Walker BR.** 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension* 42: 580-587, 2003.

52. **Cockell AP and Poston L.** Isolated mesenteric arteries from pregnant rats show enhanced flow-mediated relaxation but normal myogenic tone. *J Physiol* 495 (Pt 2): 545-551, 1996.
53. **Conrad KP.** Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R267-R275, 2011.
54. **Conrad KP, Morganelli PM, Brinck-Johnsen T and Colpoys MC.** The renin-angiotensin system during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1065-1072, 1989.
55. **Cordailat M, Rugale C, Casellas D, Mimran A and Jover B.** Cardiorenal abnormalities associated with high sodium intake: correction by spironolactone in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1137-R1143, 2005.
56. **Cornette J, Duvekot J, Roos-Hesselink J, Hop W and Steegers E.** Maternal and fetal haemodynamic effects of nifedipine in normotensive pregnant women. *BJOG* 2010.
57. **Couette B, Lombes M, Baulieu EE and Rafestin-Oblin ME.** Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticosteroid receptor. *Biochem J* 282 (Pt 3): 697-702, 1992.
58. **Cox RH and Petrou S.** Ca(2+) influx inhibits voltage-dependent and augments Ca(2+)-dependent K(+) currents in arterial myocytes. *Am J Physiol* 277: C51-C63, 1999.
59. **Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA and Senaris R.** Progesterone and human placental lactogen inhibit leptin secretion on cultured trophoblast cells from human placentas at term. *Gynecol Endocrinol* 21: 27-32, 2005.
60. **Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA and Senaris R.** Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol Endocrinol* 22: 620-626, 2006.
61. **Cribbs LL.** T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* 40: 221-230, 2006.
62. **Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, Karaulanov E, Reinhard C, Ingelfinger D, Boutros M and Niehrs C.** Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 327: 459-463, 2010.

63. **Csapo AI, Pulkkinen MO, Ruttner B, Sauvage JP and Wiest WG.** The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies. *Am J Obstet Gynecol* 112: 1061-1067, 1972.
64. **Cunningham FG and Williams J.W.** Implantation, Embryogenesis, and Placental Development. In: *Williams Obstetrics*, edited by Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ and Spong KY. New York: McGraw-Hill Medical, 2010, p. 36-77.
65. **Cunningham FG and Williams J.W.** Maternal Physiology. In: *Williams Obstetrics*, edited by Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ and Spong KY. New York: McGraw-Hill Medical, 2010, p. 107-135.
66. **D'Angelo G and Osol G.** Regional variation in resistance artery diameter responses to alpha-adrenergic stimulation during pregnancy. *Am J Physiol* 264: H78-H85, 1993.
67. **DANFORTH DN, MANALO-ESTRELLA P and BUCKINGHAM JC.** THE EFFECT OF PREGNANCY AND OF ENOVID ON THE RABBIT VASCULATURE. *Am J Obstet Gynecol* 88: 952-962, 1964.
68. **Davidge ST, Signorella AP, Lykins DL, Gilmour CH and Roberts JM.** Evidence of endothelial activation and endothelial activators in cord blood of infants of preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1301-1306, 1996.
69. **Davies LM, Purves GI, Barrett-Jolley R and Dart C.** Interaction with caveolin-1 modulates vascular ATP-sensitive potassium (KATP) channel activity. *J Physiol* 588: 3255-3266, 2010.
70. **de MM, Grichois ML, Pernollet MG, Wauquier I, Trouillet-Thormann B, Meyer P, Devynck MA and Garay R.** Antihypertensive effect of canrenone in a model where endogenous ouabain-like factors are present. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 75-83, 1988.
71. **Debrah DO, Novak J, Matthews JE, Ramirez RJ, Shroff SG and Conrad KP.** Relaxin is essential for systemic vasodilation and increased global arterial compliance during early pregnancy in conscious rats. *Endocrinology* 147: 5126-5131, 2006.
72. **DeCherney A, Spencer J, Chard T and Hutchinson KA.** Endocrinology of Pregnancy and the Placenta. In: *Clinical Obstetrics The Fetus & Mother*, edited by Reece EA and Hobbins JC. Malden: Blackwell Publishing Ltd, 2007, p. 68-82.

73. **Delprat B, Bibert S and Geering K.** [FXYP proteins: novel regulators of Na,K-ATPase]. *Med Sci (Paris)* 22: 633-638, 2006.
74. **Descamps P, Marret H, Binelli C, Chaplot S and Gillard P.** [Body changes during pregnancy]. *Neurochirurgie* 46: 68-75, 2000.
75. **Don RD, Schambelan M and Lo JC.** Endocrine Hypertension. In: Basic & Clinical Endocrinology, edited by Greenspan FS and Gardner DG. New York; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004, p. 414-438.
76. **Dupont A.** Disappearance of spironolactone-induced gynaecomastia during treatment with potassium canrenoate. *Lancet* 2: 731, 1985.
77. **Duprez DA.** Aldosterone and the vasculature: mechanisms mediating resistant hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9: 13-18, 2007.
78. **Edouard DA, Pannier BM, London GM, Cuche JL and Safar ME.** Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol* 274: H1605-H1612, 1998.
79. **Eghbali M, Wang Y, Toro L and Stefani E.** Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med* 16: 285-291, 2006.
80. **Elvan-Taspinar A, Franx A, Bots ML, Koomans HA and Bruinse HW.** Arterial stiffness and fetal growth in normotensive pregnancy. *Am J Hypertens* 18: 337-341, 2005.
81. **Escher G.** Hyperaldosteronism in pregnancy. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 3: 123-132, 2009.
82. **Escher G and Mohaupt M.** Role of aldosterone availability in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 28: 245-254, 2007.
83. **Ewart HS and Klip A.** Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 269: C295-C311, 1995.
84. **Ezimokhai M, Aloamaka CP, Cherian T and Morrison J.** The role of extracellular calcium in pregnancy-induced attenuation of phenylephrine contraction in rat aorta with functional endothelium. *J Comp Physiol [B]* 164: 81-87, 1994.

85. **Ezimokhai M and Osman N.** Calcium supplementation is associated with endothelium dependent attenuation of vascular smooth muscle reactivity in normotensive pregnant and nonpregnant rats. *Am J Hypertens* 11: 88-96, 1998.
86. **Farzaneh T and Tinker A.** Differences in the mechanism of metabolic regulation of ATP-sensitive K⁺ channels containing Kir6.1 and Kir6.2 subunits. *Cardiovasc Res* 79: 621-631, 2008.
87. **Fedorova OV, Kolodkin NI, Agalakova NI, Namikas AR, Bzhelyansky A, St-Louis J, Lakatta EG and Bagrov AY.** Antibody to marinobufagenin lowers blood pressure in pregnant rats on a high NaCl intake. *J Hypertens* 23: 835-842, 2005.
88. **Ferrari P.** Rostafuroxin: an ouabain-inhibitor counteracting specific forms of hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1254-1258, 2010.
89. **Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Padoani G, Duzzi L, Florio M, Conti F, Melloni P, Vesci L, Corsico N and Bianchi G.** PST2238: a new antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 83-94, 1998.
90. **Ferrario CM, Trask AJ and Jessup JA.** Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2281-H2290, 2005.
91. **Finotti P and Palatini P.** Canrenone as a partial agonist at the digitalis receptor site of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 217: 784-790, 1981.
92. **Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC and Nichols CG.** Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 90: 799-829, 2010.
93. **French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M and Newnham JP.** Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol* 180: 114-121, 1999.
94. **Funder JW.** RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 121-125, 2005.
95. **Funder JW.** Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* 147: 5564-5567, 2006.

96. **Funder JW.** Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 52: 393-400, 2010.
97. **Fyhriquist F and Saijonmaa O.** Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264: 224-236, 2008.
98. **Gant NF, Worley RJ, Everett RB and MacDonald PC.** Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int* 18: 253-258, 1980.
99. **Garcia-Valdes J, Zamudio FZ, Toro L and Possani LD.** Slotoxin, alphaKTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between alpha and alpha+beta (beta1 or beta4) complexes. *FEBS Lett* 505: 369-373, 2001.
100. **Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR and Milne CM.** Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol* 113: 435-444, 1987.
101. **Geering K.** Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 526-532, 2008.
102. **Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB and Lifton RP.** Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289: 119-123, 2000.
103. **Gennari-Moser C, Khankin EV, Schuller S, Escher G, Frey BM, Portmann CB, Baumann MU, Lehmann AD, Surbek D, Karumanchi SA, Frey FJ and Mohaupt MG.** Regulation of placental growth by aldosterone and cortisol. *Endocrinology* 152: 263-271, 2011.
104. **Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E and Romero R.** Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185: 792-797, 2001.
105. **Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X and O'Rourke ST.** Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110: 103-116, 2006.

106. **Giangiaco** KM, **Garcia ML** and **McManus OB**. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 31: 6719-6727, 1992.
107. **Glavind-Kristensen M**, **Matchkov V**, **Hansen VB**, **Forman A**, **Nilsson H** and **Aalkjaer C**. KATP-channel-induced vasodilation is modulated by the Na,K-pump activity in rabbit coronary small arteries. *Br J Pharmacol* 143: 872-880, 2004.
108. **Gomez-Sanchez EP** and **Gomez-Sanchez CE**. Central regulation of blood pressure by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
109. **Goossens GH**, **Jocken JW**, **Blaak EE**, **Schiffers PM**, **Saris WH** and **van Baak MA**. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension* 49: 542-547, 2007.
110. **Gordon M.C**. Maternal Physiology. In: *Obstetrics*, edited by Gabbe S.G, Niebyl J.R and Simpson J.L. New York: Churchill Livingstone, 2007, p. 56-84.
111. **Gros R**, **Ding Q**, **Sklar LA**, **Prossnitz EE**, **Arterburn JB**, **Chorazyczewski J** and **Feldman RD**. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 57: 442-451, 2011.
112. **Grossmann C**, **Husse B**, **Mildenberger S**, **Schreier B**, **Schuman K** and **Gekle M**. Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1803: 584-590, 2010.
113. **Hadden DR** and **McLaughlin C**. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 14: 66-71, 2009.
114. **Haller H**, **Park JK**, **Lindschau C**, **Meyer M** and **Menne J**. Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system--important player of the local milieu. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 122-125, 2006.
115. **Hamming I**, **Cooper ME**, **Haagmans BL**, **Hooper NM**, **Korstanje R**, **Osterhaus AD**, **Timens W**, **Turner AJ**, **Navis G** and **van GH**. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J Pathol* 212: 1-11, 2007.

116. **Hannaert P, de MM, Grichois ML, Nazaret C, Abitbol JP and Garay R.** Involvement of natriuretic hormones and Na⁺ transport in the antihypertensive action of canrenone. *Uremia Invest* 9: 195-201, 1985.
117. **Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus HG, Kaczorowski GJ and Garcia ML.** The beta subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. Identification of residues involved in charybdotoxin binding. *J Biol Chem* 273: 16289-16296, 1998.
118. **Hardin CD and Vallejo J.** Caveolins in vascular smooth muscle: form organizing function. *Cardiovasc Res* 69: 808-815, 2006.
119. **Hart MV, Morton MJ, Hosenpud JD and Metcalfe J.** Aortic function during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 154: 887-891, 1986.
120. **Hatjis CG, Kofinas AD, Greelish JP, Swain M and Rose JC.** Interrelationship between atrial natriuretic factor concentrations and acute volume expansion in pregnant and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 163: 45-50, 1990.
121. **Hauguel-De MS, Lepercq J and Catalano P.** The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 194: 1537-1545, 2006.
122. **Heylen E, Huang A, Sun D and Kaley G.** Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 535-542, 2009.
123. **Hibbard JU, Shroff SG and Lindheimer MD.** Cardiovascular Alterations in Normal and Preeclamptic Pregnancy. In: Chesley's hypertensive disorders in pregnancy, edited by Marshall D.Lindheimer, James M.Roberts and F.Gary Cunningham. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier, 2009, p. 249-267.
124. **Hill M, Parizek A, Cibula D, Kancheva R, Jirasek JE, Jirkovska M, Velikova M, Kubatova J, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Kancheva L, Kazihnitkova H, Zamrazilova L and Starka L.** Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122: 114-132, 2010.
125. **Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ and Braun AP.** Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 584: 2033-2042, 2010.

126. **Hisaw FL.** Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 23: 661-663, 1926.
127. **Honda T, Honda K, Kokubun C, Nishimura T, Hasegawa M, Nishida A, Inui T and Kitamura K.** Time-course changes of hematology and clinical chemistry values in pregnant rats. *J Toxicol Sci* 33: 375-380, 2008.
128. **Hsueh WA, Luetscher JA, Carlson EJ, Grislis G, Frazee E and McHargue A.** Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 1010-1016, 1982.
129. **Huhtaniemi IT, Korenbrot CC and Jaffe RB.** HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 963-967, 1977.
130. **Hunter S and Robson SC.** Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J* 68: 540-543, 1992.
131. **Irani RA and Xia Y.** The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 29: 763-771, 2008.
132. **Jackson WF.** Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35: 173-178, 2000.
133. **Jackson WF.** Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12: 113-127, 2005.
134. **Jaffe IZ and Mendelsohn ME.** Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 96: 643-650, 2005.
135. **Jain V, Vedernikov YP, Saade GR, Chwalisz K and Garfield RE.** Effect of gestational age on in-vitro responses of pregnant rat aorta. *Hum Reprod* 13: 214-219, 1998.
136. **Jauniaux E, Johnson MR, Jurkovic D, Ramsay B, Campbell S and Meuris S.** The role of relaxin in the development of the uteroplacental circulation in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 84: 338-342, 1994.
137. **Johnson MH and Everitt BJ.** Reconnaissance maternelle et soutien de la gestation. In: *Reproduction*, Paris: De Boeck Université, 2002, p. 191-199.

138. **Joyner J, Neves LA, Granger JP, Alexander BT, Merrill DC, Chappell MC, Ferrario CM, Davis WP and Brosnihan KB.** Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R169-R177, 2007.

139. **Juhaszova M and Blaustein MP.** Distinct distribution of different Na⁺ pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implications. *Ann N Y Acad Sci* 834: 524-536, 1997.

140. **Kaplan JH.** Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71: 511-535, 2002.

141. **Karim A.** Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev* 8: 151-188, 1978.

142. **Karim A, Kook C, Zitzewitz DJ, Zagarella J, Doherty M and Campion J.** Species differences in the metabolism and disposition of spironolactone. *Drug Metab Dispos* 4: 547-555, 1976.

143. **Karim A, Ranney RE and Maibach HI.** Pharmacokinetic and metabolic fate of potassium canrenoate (SC-14266) in man. *J Pharm Sci* 60: 708-715, 1971.

144. **Katz AM.** Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 80: 171-221, 1997.

145. **Katz M and Creasy RK.** Blood pressure and pressor response to angiotensin II during pregnancy and nursing in the rabbit. *Gynecol Obstet Invest* 12: 211-219, 1981.

146. **Kelly BA, Bond BC and Poston L.** Aortic adaptation to pregnancy: elevated expression of matrix metalloproteinases-2 and -3 in rat gestation. *Mol Hum Reprod* 10: 331-337, 2004.

147. **Kent RB, Fallows DA, Geissler E, Glaser T, Emanuel JR, Lalley PA, Levenson R and Housman DE.** Genes encoding alpha and beta subunits of Na,K-ATPase are located on three different chromosomes in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5369-5373, 1987.

148. **Kerins DM, Robertson RM and Robertson D.** Drugs used for the treatment of myocardial ischemia. In: *The pharmacological basis of therapeutics*, edited by Hardman JG, Limbird LE and Goodman Gilman A. USA: McGraw-Hill, 2001, p. 843-900.

149. **Keyes L, Rodman DM, Curran-Everett D, Morris K and Moore LG.** Effect of K⁺ATP channel inhibition on total and regional vascular resistance in guinea pig pregnancy. *Am J Physiol* 275: H680-H688, 1998.
150. **Khalil RA and Granger JP.** Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R29-R45, 2002.
151. **Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K and Itoh H.** The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 107: 30-34, 2010.
152. **Ko EA, Han J, Jung ID and Park WS.** Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44: 65-81, 2008.
153. **Kolkhof P and Borden SA.** Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
154. **Kong RC, Shilling PJ, Lobb DK, Gooley PR and Bathgate RA.** Membrane receptors: structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Mol Cell Endocrinol* 320: 1-15, 2010.
155. **Koos BJ, Nuwayhid BS and Moore JG.** Maternal Physiologic and Immunologic Adaptation to Pregnancy. In: Essentials of obstetrics and gynecology, edited by Hacker NF, Moore JG and Gambone JC. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004, p. 65-82.
156. **Krop M and Danser AH.** Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hypertens Rep* 10: 112-118, 2008.
157. **Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T and Sheppard KE.** The type I and type II 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 391-401, 1999.
158. **Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenerger S, Govindan MV and Gekle M.** Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem* 278: 43060-43066, 2003.

159. **Krug AW, Pojoga LH, Williams GH and Adler GK.** Cell membrane-associated mineralocorticoid receptors? New evidence. *Hypertension* 57: 1019-1025, 2011.
160. **Krug AW, Schuster C, Gassner B, Freudinger R, Mildenerger S, Troppmair J and Gekle M.** Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J Biol Chem* 277: 45892-45897, 2002.
161. **Kumar R, Singh VP and Baker KM.** The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18: 208-214, 2007.
162. **Kurdi M, De Mello WC and Booz GW.** Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1357-1367, 2005.
163. **Kurtzman JT, Wilson H and Rao CV.** A proposed role for hCG in clinical obstetrics. *Semin Reprod Med* 19: 63-68, 2001.
164. **Lacinova L.** Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1: 1-78, 2005.
165. **Langton PD, Nelson MT, Huang Y and Standen NB.** Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. *Am J Physiol* 260: H927-H934, 1991.
166. **Large WA.** Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 493-501, 2002.
167. **Lavoie JL and Sigmund CD.** Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144: 2179-2183, 2003.
168. **Ledoux J, Werner ME, Brayden JE and Nelson MT.** Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 21: 69-78, 2006.
169. **Lehmann WD and Lauritzen C.** HCG + ACTH stimulation of in vitro dehydroepiandrosterone production in human fetal adrenals from precursor cholesterol and delta⁵-pregnenolone. *J Perinat Med* 3: 231-236, 1975.

170. **Leopold JA.** Rapid aldosterone signaling and vascular reactivity: relax or don't do it. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 465-467, 2009.
171. **Leung PS and Carlsson PO.** Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas* 30: 293-298, 2005.
172. **Levick JR.** *An introduction to cardiovascular physiology.* London, UK: Arnorld, 2003.
173. **Li W and Aldrich RW.** Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *J Gen Physiol* 124: 43-57, 2004.
174. **Lingis M, Richards EM and Keller-Wood M.** Differential effects of mineralocorticoid blockade on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in pregnant and nonpregnant ewes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E592-E599, 2011.
175. **Lingrel JB.** The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 72: 395-412, 2010.
176. **Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R and Feldman RD.** Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 108: 2400-2406, 2003.
177. **Longo LD.** Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 245: R720-R729, 1983.
178. **Lopina OD.** Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)* 66: 1122-1131, 2001.
179. **Luft FC, Gallery E.D.M and Lindheimer MD.** Normal and Abnormal Volume Homeostasis. In: Chesley's hypertensive disorders in pregnancy, edited by Marshall D.Lindheimer, James M.Roberts and F.Gary Cunningham. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier, 2009, p. 269-285.
180. **Lund CJ and Donovan JC.** Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am J Obstet Gynecol* 98: 394-403, 1967.

181. **MacGillivray I, Rose GA and Rowe B.** Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci* 37: 395-407, 1969.
182. **Mackenzie SM, Connell JM and Davies E.** Non-adrenal synthesis of aldosterone: A reality check. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
183. **MANALO-ESTRELLA P and Barker AE.** Histopathologic findings in human aortic media associated with pregnancy. *Arch Pathol* 83: 336-341, 1967.
184. **Manegold JC, Falkenstein E, Wehling M and Christ M.** Rapid aldosterone effects on tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 45: 805-813, 1999.
185. **Mannhold R.** KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev* 24: 213-266, 2004.
186. **Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM and Zhou Y.** Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 156: 321-331, 2000.
187. **Marieb E.N.** Système cardiovasculaire: les vaisseaux sanguins. In: Anatomie et physiologie humaines, montréal: Éditions du renouveau pédagogique inc, 1999, p. 692-745.
188. **Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, Hirst JJ, Markus MA, Sarris M, Zakar T, Morris BJ and Lumbers ER.** Molecular characterization of renin-angiotensin system components in human intrauterine tissues and fetal membranes from vaginal delivery and cesarean section. *Placenta* 32: 214-221, 2011.
189. **Martinez FA.** Aldosterone inhibition and cardiovascular protection: more important than it once appeared. *Cardiovasc Drugs Ther* 24: 345-350, 2010.
190. **Massicotte G, St-Louis J, Parent A and Schiffrin EL.** Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2466-2471, 1987.
191. **McCarthy AL, Taylor P, Graves J, Raju SK and Poston L.** Endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 171: 1309-1315, 1994.

192. **McCurley A and Jaffe IZ.** Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
193. **McFadzean I and Gibson A.** The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 135: 1-13, 2002.
194. **McGregor WG, Kuhn RW and Jaffe RB.** Biologically active chorionic gonadotropin: synthesis by the human fetus. *Science* 220: 306-308, 1983.
195. **McGuane JT, Debrah JE, Debrah DO, Rubin JP, Segal M, Shroff SG and Conrad KP.** Role of relaxin in maternal systemic and renal vascular adaptations during gestation. *Ann N Y Acad Sci* 1160: 304-312, 2009.
196. **McLaughlin MK and Keve TM.** Pregnancy-induced changes in resistance blood vessels. *Am J Obstet Gynecol* 155: 1296-1299, 1986.
197. **Medford RM, Hyman R, Ahmad M, Allen JC, Pressley TA, Allen PD and Nadal-Ginard B.** Vascular smooth muscle expresses a truncated Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase alpha-1 subunit isoform. *J Biol Chem* 266: 18308-18312, 1991.
198. **Mehta PK and Griendling KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97, 2007.
199. **Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM and Brosnihan KB.** Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine* 18: 239-245, 2002.
200. **Meyer MC, Brayden JE and McLaughlin MK.** Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1510-1516, 1993.
201. **Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C, Lobos L, Lavandero S and Marusic ET.** Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* 146: 973-980, 2005.
202. **Michea L, Valenzuela V, Bravo I, Schuster A and Marusic ET.** Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase in aorta. *Am J Physiol* 275: E1072-E1081, 1998.

203. **Miller WL and Auchus RJ.** The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32: 81-151, 2011.
204. **Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ and Verde I.** Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2011.
205. **Morgan T, Craven C and Ward K.** Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 32: 683-687, 1998.
206. **Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG and Nissen P.** A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 60-70, 2011.
207. **Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sorensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B and Nissen P.** Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043-1049, 2007.
208. **Moutquin JM, Rainville C, Giroux L, Raynauld P, Amyot G, Bilodeau R and Pelland N.** A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 151: 191-196, 1985.
209. **Muto S, Nemoto J, Ohtaka A, Watanabe Y, Yamaki M, Kawakami K, Nagano K and Asano Y.** Differential regulation of Na⁺-K⁺-ATPase gene expression by corticosteroids in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270: C731-C739, 1996.
210. **Nabi AH and Suzuki F.** Biochemical properties of renin and prorenin binding to the (pro)renin receptor. *Hypertens Res* 33: 91-97, 2010.
211. **Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB and Quesada I.** The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 587: 5031-5037, 2009.
212. **Naden RP and Rosenfeld CR.** Systemic and uterine responsiveness to angiotensin II and norepinephrine in estrogen-treated nonpregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol* 153: 417-425, 1985.
213. **Nardi A and Olesen SP.** BK channel modulators: a comprehensive overview. *Curr Med Chem* 15: 1126-1146, 2008.

214. **Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ and Lederer WJ.** Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633-637, 1995.
215. **Nelson MT, Patlak JB, Worley JF and Standen NB.** Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259: C3-18, 1990.
216. **Nelson MT and Quayle JM.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: C799-C822, 1995.
217. **Nesher M, Shpolansky U, Rosen H and Lichtstein D.** The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci* 80: 2093-2107, 2007.
218. **Nguyen G.** Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci (Lond)* 120: 169-178, 2011.
219. **Nicholls MG, Robertson JI and Inagami T.** The renin-angiotensin system in the twenty-first century. *Blood Press* 10: 327-343, 2001.
220. **Nielsen AH, Schauser KH and Poulsen K.** Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* 21: 468-477, 2000.
221. **Oelkers WK.** Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 61: 166-171, 1996.
222. **Oguchi A, Ikeda U, Kanbe T, Tsuruya Y, Yamamoto K, Kawakami K, Medford RM and Shimada K.** Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265: H1167-H1172, 1993.
223. **Olesen SP, Munch E, Moldt P and Drejer J.** Selective activation of Ca(2+)-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* 251: 53-59, 1994.
224. **Orlowski J and Lingrel JB.** Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263: 10436-10442, 1988.
225. **Palacios J, Marusic ET, Lopez NC, Gonzalez M and Michea L.** Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1793-H1800, 2004.

226. **Paller MS.** Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 247: H100-H108, 1984.
227. **Papatsonis DN, Lok CA, Bos JM, Geijn HP and Dekker GA.** Calcium channel blockers in the management of preterm labor and hypertension in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97: 122-140, 2001.
228. **Parry LJ and Vodstrcil LA.** Relaxin physiology in the female reproductive tract during pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 612: 34-48, 2007.
229. **Pasqualini JR.** Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 401-415, 2005.
230. **Paul M, Poyan MA and Kreutz R.** Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803, 2006.
231. **Pepe GJ, Burch MG and Albrecht ED.** Localization and developmental regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 in the baboon syncytiotrophoblast. *Endocrinology* 142: 68-80, 2001.
232. **Petersen LK, Vogel I, Agger AO, Westergard J, Nils M and Uldbjerg N.** Variations in serum relaxin (hRLX-2) concentrations during human pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 74: 251-256, 1995.
233. **Phippard AF, Horvath JS, Glynn EM, Garner MG, Fletcher PJ, Duggin GG and Tiller DJ.** Circulatory adaptation to pregnancy--serial studies of haemodynamics, blood volume, renin and aldosterone in the baboon (*Papio hamadryas*). *J Hypertens* 4: 773-779, 1986.
234. **Podjarny E, Baylis C and Losonczy G.** Animal models of preeclampsia. *Semin Perinatol* 23: 2-13, 1999.
235. **Poppas A, Shroff SG, Korcarz CE, Hibbard JU, Berger DS, Lindheimer MD and Lang RM.** Serial assessment of the cardiovascular system in normal pregnancy. Role of arterial compliance and pulsatile arterial load. *Circulation* 95: 2407-2415, 1997.
236. **Poston L.** Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hypertens* 10: 391-394, 1996.

237. **Poston L, McCarthy AL and Ritter JM.** Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther* 65: 215-239, 1995.
238. **Poulsen AN, Wulf H, Hay-Schmidt A, Jansen-Olesen I, Olesen J and Klaerke DA.** Differential expression of BK channel isoforms and beta-subunits in rat neuro-vascular tissues. *Biochim Biophys Acta* 1788: 380-389, 2009.
239. **Poulsen H, Morth P, Egebjerg J and Nissen P.** Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett* 584: 2589-2595, 2010.
240. **Provencher M, Houde V, Brochu M and St-Louis J.** Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1195-H1201, 2012.
241. **Puschett JB, Agunanne E and Uddin MN.** Marinobufagenin, resibufogenin and preeclampsia. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1246-1253, 2010.
242. **Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE and Nelson MT.** Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* 269: C1112-C1118, 1995.
243. **Quayle JM, Nelson MT and Standen NB.** ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77: 1165-1232, 1997.
244. **Quinkler M and Diederich S.** Difference of in vivo and in vitro antimineralocorticoid potency of progesterone. *Endocr Res* 28: 465-470, 2002.
245. **Quinkler M, Diederich S, Bahr V and Oelkers W.** The role of progesterone metabolism and androgen synthesis in renal blood pressure regulation. *Horm Metab Res* 36: 381-386, 2004.
246. **Rainey WE, Rehman KS and Carr BR.** Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 31: 817-35, x, 2004.
247. **Ramsay L, Shelton J, Harrison I, Tidd M and Asbury M.** Spironolactone and potassium canrenoate in normal man. *Clin Pharmacol Ther* 20: 167-177, 1976.

248. **Rao CV and Lei ZM.** The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 269: 2-8, 2007.
249. **Rautureau Y, Paradis P and Schiffrin EL.** Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells. *Steroids* 76: 834-839, 2011.
250. **Richard S.** Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs* 65 Suppl 2: 1-10, 2005.
251. **Rigsby CS, Ergul A, Portik D, V, Pollock DM and Dorrance AM.** Effects of spironolactone on cerebral vessel structure in rats with sustained hypertension. *Am J Hypertens* 24: 708-715, 2011.
252. **Robb AO, Mills NL, Din JN, Smith IB, Paterson F, Newby DE and Denison FC.** Influence of the menstrual cycle, pregnancy, and preeclampsia on arterial stiffness. *Hypertension* 53: 952-958, 2009.
253. **Robson SC, Dunlop W, Moore M and Hunter S.** Combined Doppler and echocardiographic measurement of cardiac output: theory and application in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 94: 1014-1027, 1987.
254. **Rosen M and Cedars M.** Female Reproductive Endocrinology & Infertility. In: Basic & Clinical Endocrinology, edited by Greenspan FS and Gardner DG. New York; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004.
255. **Rosenfeld CR.** Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1025-R1040, 2001.
256. **Rosenfeld CR, Roy T, DeSpain K and Cox BE.** Large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels regulate basal uteroplacental blood flow in ovine pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 12: 402-408, 2005.
257. **Roy B, Sicotte B, Brochu M and St-Louis J.** Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *Eur J Pharmacol* 280: 1-9, 1995.
258. **Roy B, Sicotte B, Brochu M and St-Louis J.** Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: Contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biol Reprod* 60: 979-988, 1999.

259. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608-613, 1999.
260. **Sadee W, Dagcioglu M and Schroder R.** Pharmacokinetics of spironolactone, canrenone and canrenoate-K in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 185: 686-695, 1973.
261. **Sakai K and Sigmund CD.** Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep* 7: 135-140, 2005.
262. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL and Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47: 203-208, 2006.
263. **Samizo K, Ishikawa R, Nakamura A and Kohama K.** A highly sensitive method for measurement of myosin ATPase activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 293: 212-215, 2001.
264. **San-Frutos L, Engels V, Zapardiel I, Perez-Medina T, Almagro-Martinez J, Fernandez R and Bajo-Arenas JM.** Hemodynamic changes during pregnancy and postpartum: a prospective study using thoracic electrical bioimpedance. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011.
265. **Santos RA and Ferreira AJ.** Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16: 122-128, 2007.
266. **Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R and Walther T.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8258-8263, 2003.
267. **Scharschmidt BF, Keeffe EB, Blankenship NM and Ockner RK.** Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and NaK-ATPase activity. *J Lab Clin Med* 93: 790-799, 1979.
268. **Scheiner-Bobis G.** The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem* 269: 2424-2433, 2002.

269. **Schiffrin EL.** Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension* 47: 312-318, 2006.
270. **Schmidt BM, Oehmer S, Delles C, Bratke R, Schneider MP, Klingbeil A, Fleischmann EH and Schmieder RE.** Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension* 42: 156-160, 2003.
271. **Scholz H.** Pharmacological aspects of calcium channel blockers. *Cardiovasc Drugs Ther* 10 Suppl 3: 869-872, 1997.
272. **Schoof E, Girstl M, Frobenius W, Kirschbaum M, Repp R, Knerr I, Rascher W and Dotsch J.** Course of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. *Eur J Endocrinol* 145: 187-192, 2001.
273. **Schrier RW and Ohara M.** Dilemmas in human and rat pregnancy: proposed mechanisms relating to arterial vasodilation. *J Neuroendocrinol* 22: 400-406, 2010.
274. **Schrijver G and Weinberger MH.** Hydrochlorothiazide and spironolactone in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 25: 33-42, 1979.
275. **Scott PA, Tremblay A, Brochu M and St-Louis J.** Vasorelaxant action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3713-H3719, 2007.
276. **Semplicini A, Serena L, Valle R, Ceolotto G, Felice M, Fontebasso A and Pessina AC.** Ouabain-inhibiting activity of aldosterone antagonists. *Steroids* 60: 110-113, 1995.
277. **Seron-Ferre M, Lawrence CC and Jaffe RB.** Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 834-837, 1978.
278. **Shah DM.** Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614-F625, 2005.
279. **Shah DM.** Preeclampsia: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16: 213-220, 2007.
280. **Shan Z, Cuadra AE, Sumners C and Raizada MK.** Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons. *Exp Physiol* 93: 701-708, 2008.

281. **Shelly DA, He S, Moseley A, Weber C, Stegemeyer M, Lynch RM, Lingrel J and Paul RJ.** Na(+) pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C813-C820, 2004.
282. **Sherwood OD.** Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 25: 205-234, 2004.
283. **Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F and Toyoshima C.** Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459: 446-450, 2009.
284. **Sica DA.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. *Heart Fail Rev* 10: 23-29, 2005.
285. **Slangen BF, Out IC, Janssen BJ and Peeters LL.** Blood pressure and heart rate variability in early pregnancy in rats. *Am J Physiol* 273: H1794-H1799, 1997.
286. **Slangen BF, Out IC, Verkeste CM and Peeters LL.** Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol* 270: H1779-H1784, 1996.
287. **Slangen BF, van Ingen Schenau DS, van Gorp AW, De Mey JG and Peeters LL.** Aortic distensibility and compliance in conscious pregnant rats. *Am J Physiol* 272: H1260-H1265, 1997.
288. **Smith MC, Murdoch AP, Danielson LA, Conrad KP and Davison JM.** Relaxin has a role in establishing a renal response in pregnancy. *Fertil Steril* 86: 253-255, 2006.
289. **Sorrentino R, Autore G, Cirino G, d'Emmanuele d, V, Calignano A, Vanasia M, Alfieri C, Sorrentino L and Pinto A.** Effect of spironolactone and its metabolites on contractile property of isolated rat aorta rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 230-235, 2000.
290. **Spaanderman ME, Willekes C, Hoeks AP, Ekhart TH and Peeters LL.** The effect of pregnancy on the compliance of large arteries and veins in healthy parous control subjects and women with a history of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 183: 1278-1286, 2000.

291. **Spencer RL, Kim PJ, Kalman BA and Cole MA.** Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology* 139: 2718-2726, 1998.
292. **St-Louis J and Brochu M.** [The cardiovascular paradox of pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 23: 944-949, 2007.
293. **St-Louis J, Massicotte G and Parent A.** Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Sciences* 6: 358-365, 1988.
294. **St-Louis J, Pare H, Roy B and Brochu M.** Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Investig* 2: 516-522, 1995.
295. **St-Louis J, Pare H, Sicotte B and Brochu M.** Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am J Physiol* 273: H1148-H1153, 1997.
296. **Standen NB and Quayle JM.** K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164: 549-557, 1998.
297. **Stennett AK, Qiao X, Falone AE, Koledova VV and Khalil RA.** Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H745-H755, 2009.
298. **Stewart DR, Celniker AC, Taylor CA, Jr., Cragun JR, Overstreet JW and Lasley BL.** Relaxin in the peri-implantation period. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1771-1773, 1990.
299. **Stotz SC, Jarvis SE and Zamponi GW.** Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 554: 263-273, 2004.
300. **Sudo J, Terui J, Iwase H and Kakuno K.** Assay of ATPase and Na,K-ATPase activity using high-performance liquid chromatographic determination of ADP derived from ATP. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 744: 19-23, 2000.
301. **Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss JF, III, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ and .** Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity

- in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4778-4782, 1995.
302. **Taggart MJ.** Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* 16: 61-65, 2001.
303. **Taylor RN and Lebovic DI.** The endocrinology of pregnancy. In: Basic & Clinical Endocrinology, edited by Greenspan FS and Gardner DG. New York; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004, p. 637-657.
304. **Teramoto N.** Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol* 572: 617-624, 2006.
305. **Therien AG and Blostein R.** Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C541-C566, 2000.
306. **Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD and Morton MJ.** Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol* 24: 11-14, 2000.
307. **Thorneloe KS and Nelson MT.** Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 215-242, 2005.
308. **Ticconi C, Piccione E, Belmonte A and Rao C.** HCG--A new kid on the block in prematurity prevention. *J Matern Fetal Neonatal Med* 19: 687-692, 2006.
309. **Tigerstedt R. and Bergman P.** Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol (Germany)* 8: 223-271, 1898.
310. **Tihtonen KM, Koobi T and Uotila JT.** Arterial stiffness in preeclamptic and chronic hypertensive pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 128: 180-186, 2006.
311. **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G and Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275: 33238-33243, 2000.

312. **Tirard M, Almeida OF, Hutzler P, Melchior F and Michaelidis TM.** Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 268: 20-29, 2007.
313. **Torgersen KL and Curran CA.** A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 29: 2-19, 2006.
314. **Tortora GJ and Grabowski SR.** Système cardiovasculaire: les vaisseaux sanguins et l'hémodynamie. In: *Principes d'anatomie et de physiologie*, Montreal: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc, 2001, p. 709-779.
315. **Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB and Carvalho MH.** Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 36: 1143-1158, 2003.
316. **Toth P, Lukacs H, Gimes G, Sebestyen A, Pasztor N, Paulin F and Rao CV.** Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review. *Reprod Biol* 1: 5-11, 2001.
317. **Tranquilli AL and Giannubilo SR.** Use and safety of calcium channel blockers in obstetrics. *Curr Med Chem* 16: 3330-3340, 2009.
318. **Tresham JJ, Boutros P, Wintour EM and May CN.** Role of nitric oxide in the attenuated pressor responses of pregnant or sodium-deplete sheep. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 908-915, 1996.
319. **Tuckey RC.** Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26: 273-281, 2005.
320. **Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C and Schwanstecher M.** Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* 274: 28079-28082, 1999.
321. **Vagnerova K, Vackova Z, Klusonova P, Staud F, Kopecky M, Ergang P, Miksik I and Pacha J.** Reciprocal changes in maternal and fetal metabolism of corticosterone in rat during gestation. *Reprod Sci* 15: 921-931, 2008.
322. **Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB and Joyner-Grantham J.** Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 79, 2009.

323. **Valdes G, Neves LA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J and Brosnihan KB.** Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta* 27: 200-207, 2006.
324. **Varagic J and Frohlich ED.** Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1435-1442, 2002.
325. **Vargas F, Haro JM, Jodar E, Soler A and Garcia del RC.** Effects of K⁺-canrenoate on the development of DOCA-salt hypertension. *J Pharm Pharmacol* 41: 335-338, 1989.
326. **Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M and Putney JW, Jr.** The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 1742: 21-36, 2004.
327. **Velazquez-Roman JA, Villafana S, Lopez SP, Fernandez-Vallin E and Bobadilla Lugo RA.** Effect of pregnancy and diabetes on vascular receptors for angiotensin II. *Clin Exp Hypertens* 33: 167-173, 2011.
328. **Viana GE, Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Oliveira CA, Santos RA and Reis AM.** Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. *Exp Physiol* 2011.
329. **Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A and Tummino P.** Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277: 14838-14843, 2002.
330. **Viengchareun S, Le MD, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le TL and Lombes M.** The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5: e012, 2007.
331. **Wal P, Wal A, Rai AK and Dixit A.** Aliskiren: An orally active renin inhibitor. *J Pharm Bioallied Sci* 3: 189-193, 2011.
332. **Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H and Luft FC.** Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 103: 945-952, 1999.

333. **Wang Y, Deng X, Hewavitharana T, Soboloff J and Gill DL.** Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 1127-1133, 2008.
334. **Waterman EJ, Magee LA, Lim KI, Skoll A, Rurak D and von DP.** Do commonly used oral antihypertensives alter fetal or neonatal heart rate characteristics? A systematic review. *Hypertens Pregnancy* 23: 155-169, 2004.
335. **Webb RC and Bohr DF.** Potassium-induced relaxation as an indicator of Na⁺-K⁺ ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 15: 198-207, 1978.
336. **Wehling M.** Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action. *Steroids* 60: 153-156, 1995.
337. **Wehling M.** Effects of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on intracellular electrolytes. *Heart Fail Rev* 10: 39-46, 2005.
338. **Williams JH, Vidt SE and Rinehart J.** Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 372: 135-139, 2008.
339. **Wray S and Burdyga T.** Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90: 113-178, 2010.
340. **Wu RS and Marx SO.** The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits. *Kidney Int* 78: 963-974, 2010.
341. **Wynne BM, Chiao CW and Webb RC.** Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* 3: 84-95, 2009.
342. **Yamakage M and Namiki A.** Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49: 151-164, 2002.
343. **Yang J and Fuller PJ.** Interactions of the mineralocorticoid receptor - Within and without. *Mol Cell Endocrinol* 2011.

344. **Yao J, Chen X, Li H, Zhou Y, Yao L, Wu G, Chen X, Zhang N, Zhou Z, Xu T, Wu H and Ding J.** BmP09, a "long chain" scorpion peptide blocker of BK channels. *J Biol Chem* 280: 14819-14828, 2005.
345. **Yokota K, Shibata H, Kobayashi S, Suda N, Murai A, Kurihara I, Saito I and Saruta T.** Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocr Res* 30: 611-616, 2004.
346. **Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG and Blaustein MP.** Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J Physiol* 569: 243-256, 2005.
347. **Zhang L, Zhang Z, Guo H and Wang Y.** Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol* 22: 615-621, 2008.
348. **Zhang Y, Stewart KG and Davidge ST.** Endogenous estrogen mediates vascular reactivity and distensibility in pregnant rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H956-H961, 2001.
349. **Zhu N, Eghbali M, Helguera G, Song M, Stefani E and Toro L.** Alternative splicing of Slo channel gene programmed by estrogen, progesterone and pregnancy. *FEBS Lett* 579: 4856-4860, 2005.
350. **Zingman LV, Hodgson DM, Bienengraeber M, Karger AB, Kathmann EC, Alekseev AE and Terzic A.** Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* 277: 14206-14210, 2002.