

Université de Montréal

**Études d'interventions pharmacologiques au niveau de
la Na⁺/K⁺-ATPase et des récepteurs des
minéralocorticoïdes durant la gestation avec ou sans
supplément sodique**

par

Mylène Provencher

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

décembre, 2006

© Mylène Provencher, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études d'interventions pharmacologiques au niveau de la Na⁺/K⁺-ATPase et des récepteurs des minéralocorticoïdes durant la gestation avec ou sans supplément sodique

11784753

présenté par :
Mylène Provencher

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Alzbeta Chorvatova, président-rapporteur

Dr Jean St-Louis, directeur de recherche

Dr François Dubé, membre du jury

RÉSUMÉ

La grossesse est accompagnée de plusieurs changements hémodynamiques. Parmi eux on retrouve des diminutions de la pression artérielle, de la résistance périphérique et de la réactivité vasculaire ainsi que des augmentations du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), du rythme cardiaque, du volume plasmatique et du débit cardiaque. Notre laboratoire a réussi en diminuant l'activité du SRAA, par un supplément sodique, à inhiber la baisse de pression artérielle et à modifier la réactivité vasculaire, nous permettant de créer un modèle de prééclampsie expérimentale. Ce projet de recherche évalue la réactivité vasculaire systémique et la pression artérielle durant la gestation et est divisé en deux volets. Premièrement, il est présumé que le potentiel membranaire est impliqué dans les changements vasculaires liés à la gestation. Comme la Na^+/K^+ -ATPase en est un modulateur important, nous avons évalué son activité et son expression dans des aortes de rates non gestantes, gestantes avec ou sans supplément sodique et traitées ou non avec du PST 2238 (un antagoniste de la ouabaïne sur la Na^+/K^+ -ATPase). Le traitement n'a eu aucune influence sur la chute de pression artérielle des rates gestantes. Cependant, alors que le supplément sodique a induit une diminution de l'activité du SRAA, le traitement au PST 2238 a induit une augmentation de l'activité rénine plasmatique. De plus, nos résultats démontrent que l'activité et l'expression ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte sont grandement augmentées par le traitement chez des rates ne recevant pas de supplément sodique. Au contraire, chez les rates recevant la diète 0.9%NaCl, l'expression de $\alpha 1$ est augmentée mais l'activité n'est pas changée. De plus, la diète sodique modifie l'effet du PST 2238 puisque les réponses de ce groupe ne sont pas différentes du groupe de gestantes contrôle. Pour conclure cette partie, nous suggérons que des altérations combinées de la fonction et de l'expression de la Na^+/K^+ -ATPase (particulièrement la sous-unité $\alpha 1$) pourraient être responsables des modifications des fonctions vasculaires observées lors de la gestation et de l'hypertension gestationnelle.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le rôle de l'aldostérone dans la grossesse. Pour ce faire, des rates non gestantes et gestantes ont été traitées avec du canrénoate de potassium (antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes) durant la dernière semaine de gestation. Le traitement a augmenté la baisse de pression induite par la gestation. De plus, la réactivité vasculaire a été mesurée sous modulation des canaux calciques et potassiques. Le canrénoate a amplifié la réponse des agents vasoconstricteurs dans les deux groupes. Il

a aussi augmenté les effets des modulateurs des canaux ioniques mais de façon prépondérante durant la gestation. Ces résultats nous amène à conclure que les récepteurs des minéralocorticoïdes seraient impliqués dans les mécanismes responsables des baisses de pression artérielle et de réactivité vasculaire associées à la gestation.

Mots-clés : Grossesse, Hypertension gestationnelle expérimentale, Pression artérielle, Réactivité vasculaire, Aorte, Système rénine-angiotensine-aldostérone, Minéralocorticoïdes, Pompe à sodium (Na^+/K^+ -ATPase), Canrénoate de potassium, PST 2238

ABSTRACT

Pregnancy is associated with several hemodynamic changes. This includes decreased blood pressure, peripheral resistance and vascular reactivity, as well as increased activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), heart rate, plasma volume, and cardiac output. Our laboratory was able to lowered RAAS activity in rats by giving a high sodium intake; this resulted in the inhibition of the decrease in blood pressure and restoration of non-pregnant vascular reactivity. These rats are use has a model of experimental preeclampsia. This project is concerned with studies of systemic vascular reactivity and blood pressure during pregnancy and is divided in two parts. First, it is believed that membrane potential is involved in the vascular changes associated with pregnancy. Since Na^+/K^+ -ATPase is an important player in the control of membrane potential, we evaluated its activity and its expression in aorta of non pregnant, normal pregnant and pregnant rats receiving a high sodium intake, treated or not with PST 2238 (an antagonist of ouabain activity on Na^+/K^+ -ATPase). Treatments did not have any effect on blood pressure of pregnant rats. While sodium intake induced a decrease of RAAS activity, PST 2238 increased plasma renin activity. Our results demonstrated that the activity and expression ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) of the Na^+/K^+ -ATPase in the aorta are increased by the treatment of rats fed with a normal diet. Controversly, for the rats receiving the high sodium diet, the expression of $\alpha 1$ was elevated but the activity of the pump remained unchanged. Furthermore, the sodium intake modified the effect of PST 2238 since answers from this group were not different from the ones of the control pregnant rats. To conclude, this set of results indicated that the combined alterations of the function and expression of the Na^+/K^+ -ATPase (especially $\alpha 1$ subunit) could be responsible for the modifications of the vascular function observed during pregnancy and gestational hypertension.

In the second part of the project, we evaluated the role of aldosterone in blood pressure and vascular changes associated with pregnancy. To do so, non pregnant and pregnant rats were treated with potassium canrenoate (an antagonist of mineralocorticoid receptor) during their last week of pregnancy. The treatment increased the drop of blood pressure caused by the pregnancy. Vascular reactivity was measured with modulators of calcium and potassium channels. Canrenoate increased the response of two vasoconstrictors in both groups of rats. In addition, it increased the effects of the ion channel modulators but

ABSTRACT

Pregnancy is associated with several hemodynamic changes. This includes decreased blood pressure, peripheral resistance and vascular reactivity, as well as increased activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), heart rate, plasma volume, and cardiac output. Our laboratory was able to lowered RAAS activity in rats by giving a high sodium intake; this resulted in the inhibition of the decrease in blood pressure and restoration of non-pregnant vascular reactivity. These rats are use has a model of experimental preeclampsia. This project is concerned with studies of systemic vascular reactivity and blood pressure during pregnancy and is divided in two parts. First, it is believed that membrane potential is involved in the vascular changes associated with pregnancy. Since Na^+/K^+ -ATPase is an important player in the control of membrane potential, we evaluated its activity and its expression in aorta of non pregnant, normal pregnant and pregnant rats receiving a high sodium intake, treated or not with PST 2238 (an antagonist of ouabain activity on Na^+/K^+ -ATPase). Treatments did not have any effect on blood pressure of pregnant rats. While sodium intake induced a decrease of RAAS activity, PST 2238 increased plasma renin activity. Our results demonstrated that the activity and expression ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) of the Na^+/K^+ -ATPase in the aorta are increased by the treatment of rats fed with a normal diet. Controversly, for the rats receiving the high sodium diet, the expression of $\alpha 1$ was elevated but the activity of the pump remained unchanged. Furthermore, the sodium intake modified the effect of PST 2238 since answers from this group were not different from the ones of the control pregnant rats. To conclude, this set of results indicated that the combined alterations of the function and expression of the Na^+/K^+ -ATPase (especially $\alpha 1$ subunit) could be responsible for the modifications of the vascular function observed during pregnancy and gestational hypertension.

In the second part of the project, we evaluated the role of aldosterone in blood pressure and vascular changes associated with pregnancy. To do so, non pregnant and pregnant rats were treated with potassium canrenoate (an antagonist of mineralocorticoid receptor) during their last week of pregnancy. The treatment increased the drop of blood pressure caused by the pregnancy. Vascular reactivity was measured with modulators of calcium and potassium channels. Canrenoate increased the response of two vasoconstrictors in both groups of rats. In addition, it increased the effects of the ion channel modulators but

in a more important way in the pregnant group. Those results suggest that mineralocorticoid receptors are implicated in mechanisms responsible for the decreases of blood pressure and vascular reactivity associated with pregnancy.

Keywords: Pregnancy, Experimental pregnancy-induced hypertension, Blood pressure, Vascular reactivity, Aorta, Renin-angiotensin-aldosterone system, Mineralocorticoids, Sodium pump (Na^+/K^+ -ATPase), Potassium canrenoate, PST 2238

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xv
I. INTRODUCTION	1
1. La Grossesse	1
1.1. Changements hormonaux.....	1
1.1.1. Les hormones de grossesse.....	1
1.1.2. Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	4
1.2. Changements hémodynamiques	9
1.2.1. La Volémie.....	9
1.2.2. Le Débit Cardiaque	9
1.2.3. Le Système Capacitif	12
1.2.4. La Pression Artérielle.....	12
1.2.5. La Réactivité Vasculaire	13
1.3. Hypertension gestationnelle	16
1.3.1. Caractéristiques de la prééclampsie.....	16
1.3.2. Les modèles animaux de prééclampsie.....	20
1.3.2.1. Toxémie	20
1.3.2.2. Système nerveux sympathique	22
1.3.2.3. Modèle de néphropathie par adriamycine.....	22
1.3.2.4. Inhibition des synthèses de NO	23
1.3.2.5. Modèles diététiques.....	23
1.3.2.6. Stress oxydatif.....	24
1.3.2.7. L'ischémie utéroplacentaire	25
1.3.2.8. Les modèles génétiques.....	26
1.3.2.9. Les modifications du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	27
2. Mécanismes de contraction et de relaxation des muscles lisses	29
2.1. Structure des vaisseaux	29

2.2.	La contraction	34
2.3.	La relaxation	35
2.4.	Les canaux ioniques	36
2.4.1.	Les canaux calciques	36
2.4.1.1.	Les canaux calciques dépendant du voltage (VDCC).....	36
2.4.1.1.1.	La structure.....	36
2.4.1.1.2.	La régulation	39
2.4.1.1.3.	Les bloqueurs	39
2.4.1.2.	Les canaux calciques indépendants du voltage.....	40
2.4.2.	Les canaux potassiques	42
2.4.2.1.	Les canaux potassiques activés par le voltage (K _v).....	42
2.4.2.2.	Les canaux à rectification rentrante (K _{IR}).....	43
2.4.2.3.	Les canaux potassiques activés par le calcium	43
2.4.2.4.	Les canaux sensibles à l'ATP (K _{ATP})	45
2.4.3.	La pompe à sodium (Na ⁺ /K ⁺ -ATPase)	46
2.4.3.1.	La structure.....	46
2.4.3.2.	Le mécanisme catalytique	48
2.4.3.3.	La régulation de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	49
2.4.3.4.	Les inhibiteurs de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	51
3.	Buts et Hypothèses	53
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		55
II. RÉSULTATS.....		62
1.	Partie 1: Animaux traités au PST 2238	62
1.1.	<i>Gain de poids maternel, consommation de nourriture et d'eau et paramètres fœtaux</i>	62
1.2.	<i>Poids des organes et ratio du poids des organes sur le poids corporel</i>	62
1.3.	<i>Paramètres sanguins</i>	62
1.4.	<i>Paramètres urinaires</i>	67
1.5.	<i>Pression artérielle systolique</i>	67
1.6.	<i>Effets de la gestation, de la diète supplémentée en sodium et du traitement au PST 2238 sur la relaxation vasculaire au KCl</i>	67
1.7.	<i>Expression de la Na⁺/K⁺-ATPase dans l'aorte</i>	75

2. Partie 2 : Animaux traités avec le canrénoate de potassium	75
2.1. Dose de canrénoate de potassium administrée	75
2.2. Données physiologiques	75
2.3. Pression artérielle systolique	77
2.4. Effets de la gestation et du traitement au canrénoate de potassium sur la réponse vasculaire à la phényléphrine	77
2.5. Effets de la gestation et du traitement au canrénoate de potassium sur la réponse vasculaire au KCl	78
IV. DISCUSSION.....	82
V. PERSPECTIVES.....	92
VI. BIBLIOGRAPHIE	94

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Profils hormonaux plasmatiques durant la grossesse chez la femme
- Figure 2** Représentation schématique du SRAA
- Figure 3** Changements du volume plasmatique, du volume des érythrocytes, de l'hématocrite et de la condition « fer » durant la grossesse
- Figure 4** Changements, en pourcentage, du rythme cardiaque, du volume d'éjection et du débit cardiaque mesurés en position latérale tout au long de la grossesse et comparés aux valeurs de non gestation
- Figure 5** Pression artérielle moyenne chez les femmes qui restent normotensives durant toute la grossesse, chez celles qui développent de la prééclampsie et chez celles qui manifestent une hypertension chronique
- Figure 6** Changements vasculaire durant la grossesse normale et la prééclampsie
- Figure 7** Effet d'une diète supplémentée en sodium (0.9% et 1.8% NaCl) sur la pression artérielle systolique des rates non gestantes (A) et gestantes (B)
- Figure 8** Structure des artères, des veines et des capillaires
- Figure 9** Structure d'un myocyte vasculaire basée sur la micrographie électronique
- Figure 10** Schématisation d'un myocyte vasculaire avec les canaux ioniques, pompes ioniques et échangeurs à la surface membranaire
- Figure 11** Structure des VDCC
- Figure 12** Topologie transmembranaire proposée pour les sous-unités formant les pores des canaux potassiques dans les muscles lisses
- Figure 13** Mécanisme catalytique de la Na^+/K^+ -ATPase
- Figure 14** Évaluation de l'aire sous la courbe d'un tracé de relaxation d'anneaux aortiques en réponse au KCl.
- Figure 15** Effets du traitement au canrénoate de potassium sur la pression artérielle des rates non gestantes (A) et gestantes (B)
- Figure 16** Courbes concentration-réponse à la PhE sur des anneaux aortiques de rates non gestantes (gauche) et gestantes (centre) qui sont soit non traitées (A) ou traitées au canrénoate de potassium (B)

- Figure 17** Courbes concentration-réponse au KCl sur des anneaux aortiques de rates non gestantes (gauche) et gestantes (centre) qui sont soit non traitées (A) ou traitées au canrénoate de potassium (B)
- Figure 18** Niveaux d'aldostérone et de corticostérone sériques et de PRA chez les rates recevant ou non du PST 2238 (A) avec ou sans supplément sodique de 0.9% (B)
- Figure 19** Effets de la diète sodique (0.9% NaCl) et du traitement au PST 2238 sur la pression artérielle des rates gestantes
- Figure 20** Courbes de relaxation au KCl, la réponse au KCl est exprimée en pourcentage de la contraction à la PhE, en présence de différentes doses de ouabaïne sur des anneaux d'aortes de rates non gestantes (A), gestantes recevant une diète normale (B) et gestantes recevant une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C)
- Figure 21** Histogrammes représentant l'aire sous la courbe de la relaxation au KCl des aortes, en l'absence ou présence de ouabaïne, chez des rates non gestantes (A), gestantes recevant une diète normale (B) et gestantes recevant une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C)
- Figure 22** Courbes de relaxation au KCl, en présence de différentes concentrations de ouabaïne sur des anneaux d'aortes de rates gestantes recevant une diète normale (A) et une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C) ainsi qu'un traitement au PST 2238 (B et D). La réponse au KCl est exprimée en pourcentage de la contraction à la PhE
- Figure 23** Histogrammes représentant l'aire sous la courbe de la relaxation au KCl des aortes, en l'absence ou présence de ouabaïne, chez des rates gestantes recevant une diète normale (A) et une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C) ainsi qu'un traitement au PST 2238 (B et D)
- Figure 24** Immunobuvardage de type western des sous-unités $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B) et $\beta 1$ (C) de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Effets du traitement avec le PST 2238 sur le gain de poids et la consommation de nourriture et d'eau chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium
- Tableau 2** Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres fœtaux chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium
- Tableau 3** Effets du traitement avec le PST 2238 sur le poids du cœur, du ventricule gauche, des reins et des surrénales chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium
- Tableau 4** Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium
- Tableau 5** Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres urinaires chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANG (1-7)	Angiotensine-(1-7)
ANG II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriuritique auriculaire
ATP	Adénosine triphosphate
AT1	Récepteur de l'angiotensine de type 1
AT2	Récepteur de l'angiotensine de type 2
BK_{Ca}	Canaux potassiques dépendants du calcium
Ca²⁺-ATPase	Pompe à calcium dépendante de l'ATP
CCC	canaux cationiques constitutivement actifs (constitutively active cation channels)
CGRP	Peptide relié au gene de la calcitonine (Calcitonin-gene-related peptide)
CRH	Hormone de relache de la corticotrophine
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHP	Dihydropyridine
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDLF	Facteur similaire aux digitalis endogènes
E_{max}	Asymptote maximale de la courbe concentration-réponse
GMPc	Guanylate monophosphate cyclique
H/K-ATPase	Pompe à protons dépendante de l'ATP
HCG	Hormone chorionique gonadotrophique
HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HPL	Hormone lactogène placentaire
IP₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
K_{ATP}	Canaux potassiques dépendants de l'ATP
KCl	Chlorure de potassium
K_d	Constante de dissociation
K_{IR}	Canaux potassiques à rectification rentrante
K_v	Canaux potassiques activés par le voltage
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester
MBG	Marinobufagénine
MHS	Rats milan hypertendus
MLCK	Kinase des chaînes légères de myosine
Na/K-ATPase	Pompe à sodium dépendante de l'ATP
NaCl	Chlorure de sodium
NCX₁	Échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺

NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
OE	Ouabaïne endogène
OLF	Facteur similaire à la ouabaïne
PGI₂	Prostacycline
PhE	Phényléphrine
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PRA	Activité rénine plasmatique
PST 2238	17 β -(3-furyl)-5 β -androstan-3 β ,14 β ,17 α -triol (Rostafuroxine)
RCIU	Restriction de croissance intrautérine
ROC	Canaux opérés par récepteur (receptor-operated channel)
RUPP	Pression de perfusion utérine réduite
SAC	canaux activés par l'étirement (stretch-activated channels)
sFlt1	Tyrosine kinase fms-like soluble dans le sérum
SHR	Rats spontanément hypertendus
SOC	canaux opérés par les réserves de calcium (store-operated channels)
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TRPC	Potentiel transitoire des récepteurs canonial (canonical transient receptor potential)
TXA₂	Thromboxane A ₂
VDCC	Canaux calciques dependants du voltage

REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à remercier ma mère pour tout le support et les encouragements qu'elle m'a apportés. Un merci également à ma tante Linda pour son appui et ses conseils. Sans elles, je ne serais pas la femme que je suis aujourd'hui. Je vous aime beaucoup toutes les deux et je suis très reconnaissante de ce que vous faites pour moi.

Un merci particulier à Jean, mon directeur de recherche, pour avoir accepté d'être mon mentor et me faire découvrir et apprécier le monde scientifique en me fournissant une excellente formation. Merci également à Michèle pour les conseils qu'elle m'a apporté.

Je tiens à remercier tous mes compagnons et compagnes de laboratoire. Je remercie spécialement Véronique, Pascale, Pierre-André et Benoit sans qui je n'aurais pas pu accomplir tout ce travail. Finalement, merci à Karine, Rebecca, Marie-Eve et Annie pour leur aide et leurs précieux conseils.

I. INTRODUCTION

1. La Grossesse

Durant les neuf mois de la grossesse, le corps féminin s'adapte pour être l'hôte d'une nouvelle vie. Il subira plusieurs changements anatomiques, physiologiques et métaboliques. Dans le présent ouvrage, il sera question des changements observés durant la grossesse normale et dans les conditions d'hypertension gestationnelle, et plus particulièrement des modifications hémodynamiques et de l'implication de l'aldostérone et de la pompe à sodium dépendante de l'ATP (Na^+/K^+ -ATPase) dans ces changements.

1.1. Changements hormonaux

1.1.1. Les hormones de grossesse

Le placenta synthétise des hormones qui influencent le déroulement de la grossesse. L'hormone chorionique gonadotrophique (HCG) est l'une des premières hormones à être sécrétée par le trophoblaste et atteint son taux maximum vers la 10^e semaine de grossesse, puis décroît ensuite jusqu'à la 20^e semaine et se maintient en plateau jusqu'à l'accouchement (Fig. 1). Dans la circulation maternelle, cette hormone est amenée jusqu'à l'ovaire où elle se lie aux récepteurs de l'hormone lutéinisante des cellules lutéales ce qui permet le maintien du corps jaune et sa transformation en corps jaune de gestation qui sécrète des stéroïdes en quantité importante, en augmentant la conversion du cholestérol maternel en prégnénolone et progestérone. Du côté fœtal, la concentration de HCG est de moins de 1% par rapport à celle retrouvée du côté maternel mais elle aurait un rôle important dans la régulation du développement des surrénales et gonades fœtales durant le premier trimestre (53; 104; 237). L'hormone lactogène placentaire (HPL) est également sécrétée par le syncytiotrophoblaste à partir de la 6^e semaine et jusqu'à la fin de la grossesse (Fig. 1), sa production étant proportionnelle à la masse du placenta. Son rôle physiologique pendant la grossesse est encore controversé mais l'on sait qu'elle est entre autre impliquée dans l'altération du métabolisme du glucose et l'action de l'insuline ainsi que dans la mobilisation des acides gras libres (53; 74; 237). D'autres hormones peptidiques sont reconnues comme étant sécrétées par le placenta, majoritairement des analogues des hormones hypophysaires et hypothalamiques, mais le rôle physiologique de ces hormones n'a pas encore été défini (74; 237).

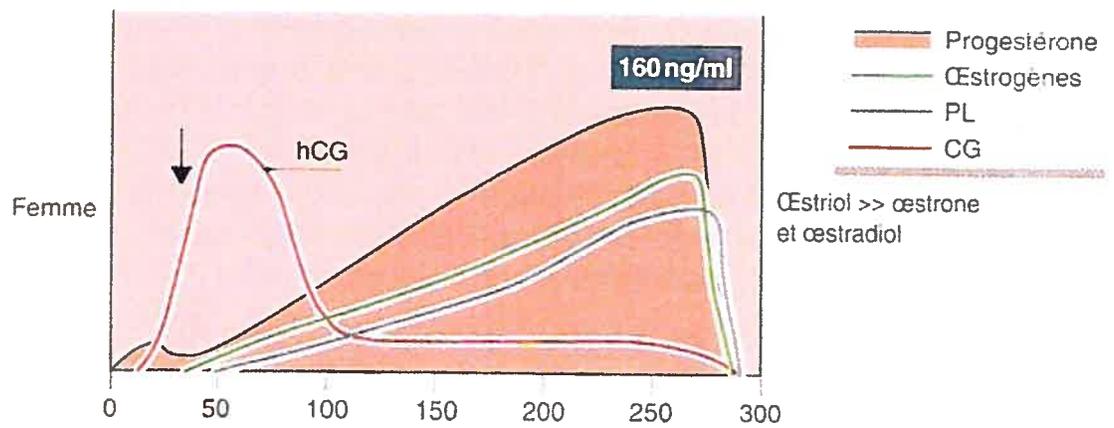


Figure 1 : Profils hormonaux plasmatiques durant la grossesse chez la femme
L'abscisse décrit les jours de grossesse. (Tiré de Johnson) (104)

Parmi les hormones stéroïdiennes, on note des augmentations de progestérone dès le début de la grossesse. Elle est initialement produite par le corps jaune de gestation, avec la 17 α -hydroxyprogestérone, jusqu'à ce que le placenta prenne le relai de sa production vers la 6^e-8^e semaine de grossesse. La progestérone est synthétisée principalement à partir du cholestérol maternel et sa concentration augmente jusqu'au terme de la grossesse (Fig. 1). Son rôle est essentiellement dans l'établissement et le maintien de la grossesse. On lui attribue, en association avec le monoxyde d'azote (NO), le maintien de la quiescence utérine durant la grossesse. De plus, la progestérone agirait comme agent immunosuppresseur dans certains systèmes et inhiberait le rejet tissulaire modulé par les cellules T, ce qui expliquerait la tolérance par l'utérus de l'invasion des tissus trophoblastiques de l'embryon. Finalement, elle agirait de façon à contrebalancer les effets des oestrogènes sur la vasculature utérine pour maintenir un flot sanguin adéquat au site d'implantation (53; 74; 104; 237). Les oestrogènes augmentent considérablement, eux aussi, tout au long de la grossesse (Fig. 1). Produits par les ovaires durant les 5 à 6 premières semaines, ils sont ensuite synthétisés par le placenta. Leur production par le placenta nécessite des précurseurs circulants provenant des côtés maternel et fœtal. La majorité des oestrogènes dérivent des androgènes fœtaux, principalement le déhydroépiandrostérone sulfate (DHEA sulfate) qui est produit par les surrénales fœtales. Le DHEA sulfate est transformé en DHEA libre puis en androstènedione et en testostérone au niveau fœtal puis, ils seront aromatisés en oestrone et oestradiol respectivement dans le placenta. L'action des oestrogènes est certainement importante mais encore mal connue. Parmi les fonctions qu'on leur accorde, les oestrogènes seraient responsables de la vasodilatation artérielle mais celle-ci semble variable en fonction du type de vaisseaux et prédominerait sur les capillaires et les petits troncs artériels. Au niveau de la paroi veineuse, ils seraient à l'origine d'une perméabilité capillaire par ouverture des shunts et d'un épaissement de l'endothélium (53). De plus, ils auraient un rôle dans le déclenchement de l'accouchement en augmentant la contractilité et la sensibilité à l'ocytocine du myomètre (53; 74; 104; 237). Toutes ces modifications hormonales sont d'une importance primordiale pour le maintien et le bon fonctionnement de la grossesse.

1.1.2. Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

Le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) (Fig. 2) est l'une des plus importantes structures régulatrices de l'organisme. Il agit en synergie avec le système nerveux sympathique et contrôle l'excrétion de Na^+ et d'eau, la volémie, la pression artérielle et le tonus vasculaire. La rénine est une enzyme sécrétée principalement par l'appareil juxtaglomérulaire du rein. Sa sécrétion est activée par plusieurs stimuli physiologiques telle une chute des concentrations sodiques, une diminution de la pression de perfusion du rein, des agonistes des récepteurs β -adrénergiques et la prostacycline (PGI_2). Elle est inhibée par l'Angiotensine II (Ang II), le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et l'augmentation de pression de perfusion rénale. La rénine est rapidement éliminée du plasma. Elle agit sur l'angiotensinogène, qui provient du foie, pour former l'angiotensine I. Cette dernière est transformée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, angiotensin converting enzyme) en Ang II. L'ACE est une enzyme liée à la membrane qu'on retrouve à la surface des cellules endothéliales. Elle est particulièrement présente au niveau des poumons mais on la retrouve aussi dans d'autres tissus vasculaires incluant le cœur, le cerveau, les muscles striés et le rein. Cela permet une formation locale d'Ang II qui procure un contrôle indépendant de l'Ang II circulante. Cette dernière est un octapeptide qui agit via sa liaison sur les récepteurs AT1 et AT2. Ses principales actions consistent en une vasoconstriction généralisée, une augmentation de la libération de noradrénaline, une stimulation de la réabsorption de Na^+ par le tubule proximal et la sécrétion d'aldostérone au niveau du cortex surrénal (194).

Durant la grossesse, le SRAA est stimulé à partir de la 8^e semaine et cette activation augmente progressivement jusqu'à terme (186). Les concentrations de rénine plasmatique augmentent ce qui fait également accroître l'activité rénine plasmatique (PRA, plasma renin activity). Toutefois, au moins 73% de la rénine produite en début de grossesse est inactive, le produit actif augmentant seulement en fin de grossesse (186). L'Ang II s'élève avec les augmentations de PRA et d'angiotensinogène tout au long de la gestation (31). Il y a également une production massive d'aldostérone par la zone glomérulée du cortex surrénal qui atteint son maximum vers la mi-gestation et se maintient jusqu'au terme (186; 237). Cette augmentation a pour but de remplir les besoins homéostatiques de la grossesse. La femme enceinte a besoin de retenir plus de sodium pour les demandes du fœtus et du placenta en développement ainsi que pour maintenir le

volume sanguin maternel. De plus, l'augmentation d'aldostérone prévient la perte de sodium urinaire due à l'augmentation de la filtration glomérulaire et à l'effet natriurétique des fortes concentrations de progestérone, puisque cette dernière est un antagoniste de l'aldostérone. L'effet de la progestérone apporterait d'ailleurs une explication à l'absence de kaliurèse qu'on s'attendrait à voir avec la hausse d'aldostérone (186). Le SRAA est sous un vaste contrôle hormonal durant la grossesse. L'hormone chorionique somatomammotrophique est impliqué dans la régulation de la sécrétion de l'aldostérone et l'HCG pourrait avoir un rôle dans la régulation du bilan de l'eau en abaissant les seuils de libération d'hormone antidiurétique (136). Les oestrogènes et la progestérone sont responsables de la surexpression du SRAA en augmentant l'angiotensinogène et la rénine tissulaires et circulantes (30; 53; 186). L'équipe de Brosnihan et al. (30) défend un concept qui stipule que les oestrogènes sont également responsables de modifications dans la voie de formation de l'angiotensine, d'une façon tissu spécifique. Ils induisent une diminution de la synthèse d'Ang II et augmentent celle d'angiotensine-(1-7) [Ang-(1-7)] chez les rats Sprague-Dawley et les rats transgéniques mRen2 (132) tandis que chez la femme l'Ang I, l'Ang II et l'Ang-(1-7) sont élevés durant la grossesse (30). L'Ang-(1-7) a des actions vasculaires opposées à celles de l'Ang II. Son action vasodilatatrice a été rapportée dans plusieurs lits vasculaires (85; 125) et implique la libération de NO, kinines et prostaglandines (85; 174). Finalement, des études sur les artères mésentériques ont démontré que l'Ang-(1-7) n'avait pas d'effet chez les rates non-gestantes mais qu'elle induisait une vasodilatation chez celles des rates gestantes (30). Cela laisse supposer que l'Ang-(1-7) pourrait être un contributeur important de la régulation de pression artérielle durant la grossesse.

En plus du RAAS principal au niveau rénal, il y a également durant la grossesse un système rénine angiotensine (SRA, renin angiotensin system) utéroplacentaire. Si l'on se fie aux origines cellulaires, il y a deux SRA dans le placenta, le premier dans les tissus fœto-placentaires et le deuxième dans les tissus placentaires maternels. Toutes les composantes du SRA sont présentes dans les tissus placentaires fœtaux (217). L'expression génique de la rénine et de l'angiotensinogène a été démontrée dans le placenta humain (96) ainsi que la présence de ACE et d'AT1 dans la vasculature (133). Toutes les composantes sont également présentes du côté maternel, plus particulièrement dans la décidua (217). Morgan et al (162) ont démontré l'expression, au premier trimestre,

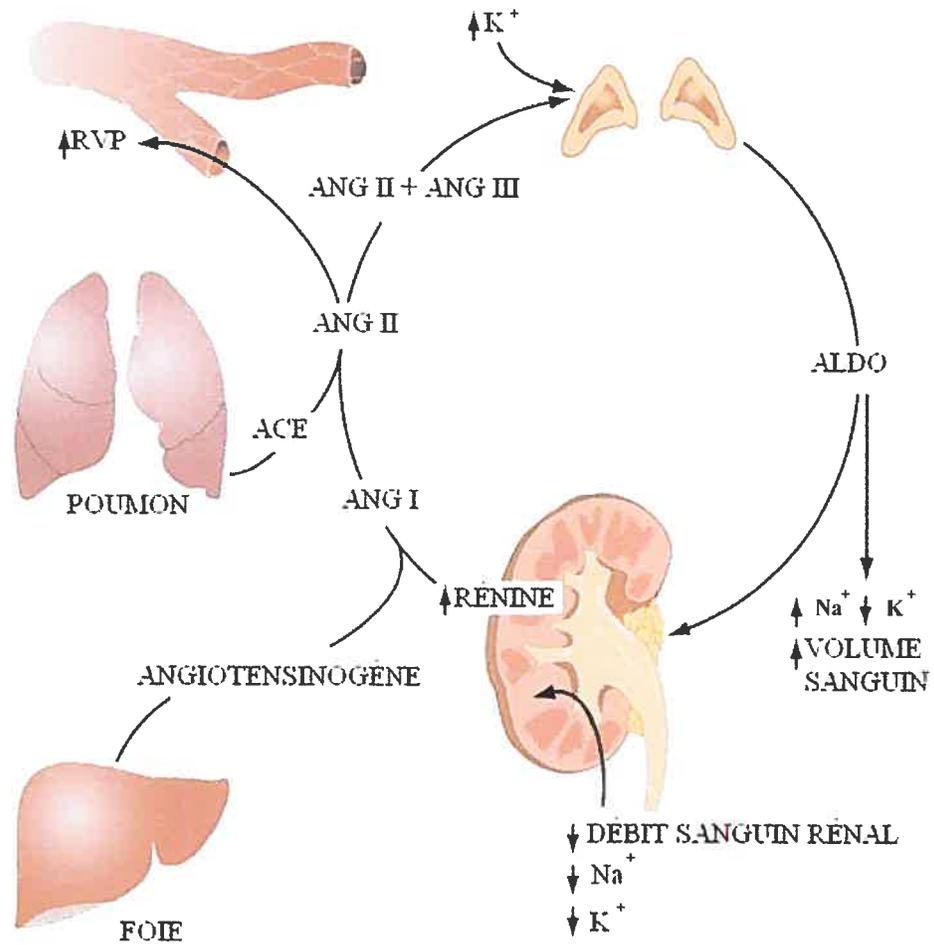


Figure 2: Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). La rénine, sécrétée par le rein, coupe l'angiotensinogène (produite par le foie) en angiotensine I (Ang I). Cette dernière est convertie en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), principalement retrouvé dans le poumon. L'Ang II augmente la résistance vasculaire périphérique (RVP) et avec l'Ang III, stimule la sécrétion d'aldostérone (ALDO) entraînant une rétention de sodium et une augmentation du volume plasmatique. (Adaptée de Guber HA et al) (87)

d'angiotensinogène, de rénine, d'ACE et d'AT1 à l'intérieur et autour des artères spiralées et d'autres ont démontré l'expression de rénine et d'angiotensinogène dans les cellules productrices de prolactine déciduales humaines au troisième trimestre (131). Il est suggéré que ce SRA utéroplacentaire soit modulé par les oestrogènes et la progestérone ainsi que par d'autres facteurs impliqués dans la décidualisation (131). On peut donc dire que durant la grossesse humaine il y a deux circulations productrices de rénine soit celle du rein, qui consiste en une sécrétion contrôlée avec un temps de réponse de quelques minutes, et la circulation utéroplacentaire, qui implique une sécrétion constitutive avec un temps de réponse en heures. On peut donc suggérer qu'un système de SRA complet au niveau utéroplacentaire est impliqué dans la régulation du flot sanguin régional maternel (168; 225).

Le SRAA est impliqué physiologiquement dans la régulation hémodynamique. Plusieurs médicaments ont donc été développés pour influencer l'hémodynamique dans l'hypertension. Par exemple, il est possible d'intervenir au niveau de l'Ang II avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEI) ou avec des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA). Les ACEI sont des molécules très sélectives, qui n'interagissent pas avec d'autres composantes du SRAA et dont le principal effet pharmacologique est l'inhibition de la synthèse d'Ang II. Ils sont généralement divisés en trois catégories selon leur structure : 1) ceux qui contiennent des sulfhydryl comme le captopril, 2) ceux qui contiennent des dicarboxyl comme l'énalapril et 3) ceux qui contiennent des groupements phosphorylés comme le fosinopril. Ils interfèrent tous avec les boucles de rétroaction de la relache de rénine, causant des augmentations de la PRA et de l'Ang I. Les ARA, quant à eux, inhibent l'action de l'Ang II en bloquant le récepteur AT1 avec une très forte affinité. Cette liaison de type compétitif demeure toutefois irréversible, i.e. que la réponse maximale à l'Ang II ne pourra pas être restaurée en présence d'un ARA même à de fortes concentrations d'Ang II. Contrairement aux ACEI, les ARA permettent une augmentation des niveaux plasmatiques d'Ang II (100). Toutefois, que l'on inhibe la formation ou l'action de l'Ang II, les niveaux d'aldostérone plasmatique restent élevés (207). C'est pourquoi, les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes, tels le spironolactone, le canrénoate de potassium et l'épléronone, sont très utilisés cliniquement.

Ces molécules inhibent les réponses à l'aldostérone tant sur les tissus épithéliaux que non épithéliaux. Le spironolactone a été le premier diurétique conçu pour inhiber le transport de Na^+ rénal en bloquant le récepteur des minéralocorticoïdes. Il est peu soluble en solution aqueuse mais on estime selon les formulations commerciales, qu'il a une absorption intestinale d'environ 80-90%. Une fois absorbé, il est très rapidement métabolisé, par les voies hépatiques, en canrénone et en 7α -méthylspironolactone, ses principaux métabolites actifs. Leur demi-vie respective est de 1.4h, 16.5h et 13.8h chez des volontaires sains. L'effet du spironolactone est relativement lent à apparaître et il atteint généralement son maximum 48h ou plus après la prise de la première dose. De plus, sa structure stéroïdienne lui attribue des effets indésirables dus à sa liaison aux récepteurs androgéniques, comme la gynécomastie, la diminution de libido, de l'hirsutisme et de l'irrégularité menstruelle (221). Pour ces raisons, d'autres composés sont également utilisés. Le canrénolate de potassium, par exemple, est moins antiandrogénique que le spironolactone (55). Il est soluble en solution aqueuse et est presque entièrement absorbé par la voie gastrointestinale, en plus d'éviter le premier passage hépatique. Il est également métabolisé en canrénone (203). De plus, il a été rapporté que le canrénolate de potassium, contrairement au spironolactone, avait la capacité d'inhiber les actions non génomiques de l'aldostérone dans les tissus cardiovasculaires (153). Pour toutes ces raisons, c'est le composé que nous avons choisi d'utiliser dans la présente étude pour bloquer les récepteurs des minéralocorticoïdes. On retrouve donc sur le marché maintenant l'épléronone, un antagoniste plus spécifique des récepteurs minéralocorticoïdes. Grâce à un changement au niveau de la structure du spironolactone, l'épléronone a une affinité de 10 à 20 fois plus faible pour le récepteur *in vitro* mais *in vivo* il est deux fois plus efficace pour l'inhiber, ce qui est probablement dû au fait qu'il se lie moins aux protéines plasmatiques que le spironolactone. Toutefois, la caractéristique qui rend l'épléronone si intéressant réside dans le fait qu'il a une affinité 500 fois moins importante que le spironolactone pour les récepteurs androgéniques, évitant les effets secondaires causés par ce dernier. De plus, il possède une bonne biodisponibilité et une demi-vie de 4 à 6h (221). Tous ces éléments en font un antagoniste très prometteur.

Le SRAA est un élément très important dans le contrôle de l'hémodynamique. D'autres facteurs ont toutefois des rôles importants dans cette régulation. Nous allons

donc décrire plus en détails les changements observés lors de la grossesse chez la femme mais que nous retrouvons chez d'autres mammifères tels le rat, la brebis, le lapin ou le babouin.

1.2. Changements hémodynamiques

1.2.1. La Volémie

Durant la grossesse, le volume sanguin commence à augmenter à la 6^e semaine pour atteindre un plateau vers la 32^e semaine avec une augmentation totale d'environ 40% (169; 243). Cette dernière est en grande partie due à la stimulation du SRAA qui occasionne une rétention hydrique et sodique (53; 205). Il existe, en plus de l'augmentation plasmatique, une élévation de la masse érythrocytaire de 20 à 30% durant la deuxième moitié de la grossesse (53; 169; 243). Cette dernière résulte de l'action de l'hormone chorionique somato-mammotrophique, de la prolactine et de la progestérone qui vont stimuler la synthèse d'érythropoïétine (136). L'augmentation du volume érythrocytaire étant plus lente et plus tardive que celle du plasma (Fig. 3), il en résulte un état d'anémie physiologique de la grossesse (93; 140; 243). Cette anémie par dilution se note par une diminution de l'hématocrite (93; 169; 243) et entraîne une diminution du transport d'oxygène qui est compensé par une hyperventilation et une augmentation du débit sanguin (53). On remarque également au niveau des composantes du sang, une diminution de 10 à 14% des protéines plasmatiques qui survient principalement durant le premier trimestre et une augmentation d'environ 40% des lipides; le cholestérol (précurseur des oestrogènes et de la progestérone) et les phospholipides (pour la croissance cellulaire maternelle et fœtale) (243). Finalement, les modifications des composantes plasmatiques entraîne un état d'hypercoagulabilité lié à un déséquilibre entre système de coagulation et fibrinolyse qui peut causer des épisodes thrombotiques (20; 21). Toutes ces modifications de la volémie permettent de subvenir aux besoins de la mère et du fœtus.

1.2.2. Le Débit Cardiaque

Le débit cardiaque augmente d'environ 50% au cours de la grossesse comme le montre la figure 4. Ce gain est observé à partir de la 8^e semaine jusqu'à la 25^e semaine puis se maintient en plateau jusqu'en fin de grossesse où le débit moyen est d'environ 6

L/min (53; 74; 169; 243). Le débit cardiaque est le produit du volume d'éjection systolique du ventricule gauche par la fréquence cardiaque, son augmentation est donc la résultante de leurs augmentations. Les changements de fréquence cardiaque débutent vers la 5^e semaine de gestation (243) et celle-ci augmente de 15-20 battements/min au repos (53). Le volume d'éjection du ventricule gauche, quant à lui, augmente d'environ 30%. Selon les lois de Starling, plus le volume de remplissage télédiastolique du ventricule augmente, plus importante sera l'énergie de la contraction du myocarde et plus important sera le volume de sang éjecté. Pour ce faire, on note l'apparition d'une hypertrophie concentrique du ventricule gauche avec augmentation de la masse myocardique ainsi qu'une dilatation des cavités cardiaques permettant une augmentation du volume télédiastolique du ventricule gauche et des oreillettes. Le tout se couple également à une augmentation des surfaces de section aortique, pulmonaire et mitrale. En revanche, les pressions de remplissage du cœur droit et gauche ne sont pas modifiées. Toutes ces modifications permettent de maintenir la fonction ventriculaire gauche tout en augmentant le volume d'éjection (53).

On note aussi que les augmentations de volémie et du débit cardiaque entraînent une élévation du flot sanguin dans la plupart des régions du corps qui se stabilise dès le début de la grossesse et maintient un flot constant. Au niveau de l'utérus, des reins, de la poitrine et de la peau, cette élévation de flot sanguin croît avec l'âge gestationnel. Au niveau des reins et de la peau, cette augmentation sert principalement à l'élimination : les reins pour les déchets métaboliques que l'on retrouve dans la circulation et la peau pour la chaleur (169). L'afflux à la poitrine, quant à lui, débute au début de la grossesse pour atteindre deux à trois fois les niveaux de flots sanguin d'avant la gestation près du terme (74; 169). Finalement, le flot utérin passe de 2% du débit cardiaque lorsque la femme n'est pas enceinte à 17% du débit cardiaque en fin de grossesse (74; 169). Cette augmentation est perceptible à partir de la 10^e semaine de grossesse. Le flot sanguin utérin est primordial pour les échanges nutritifs et gazeux avec le fœtus. C'est pourquoi, près du terme, 85% de la circulation utérine est dédiée au placenta tandis que le reste perfuse l'utérus. Il est donc impératif que le débit cardiaque soit maintenu constant durant la gestation pour assurer une irrigation adéquate de l'unité fœto-placentaire.(169)

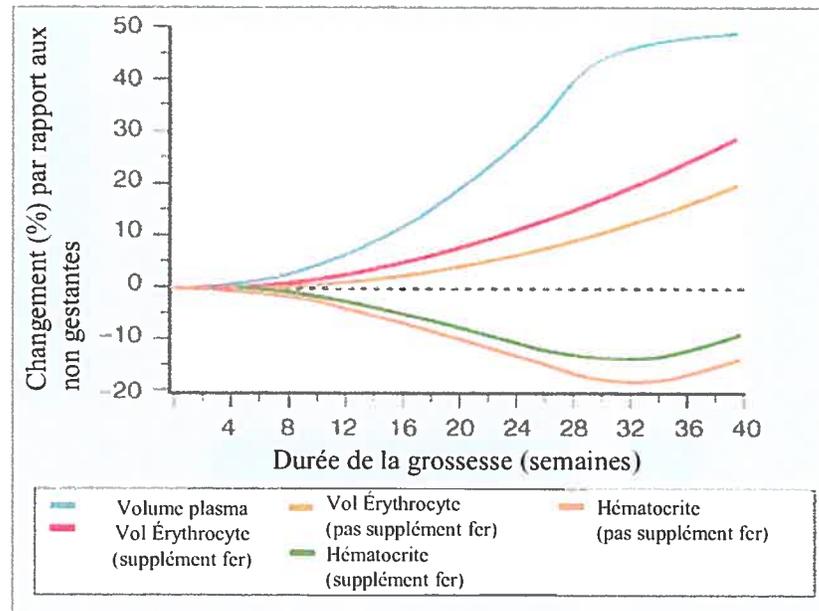


Figure 3 : Changements du volume plasmatique, du volume des érythrocytes, de l'hématocrite et de la condition « fer » durant la grossesse. (Adapté d'Elkayam) (59)

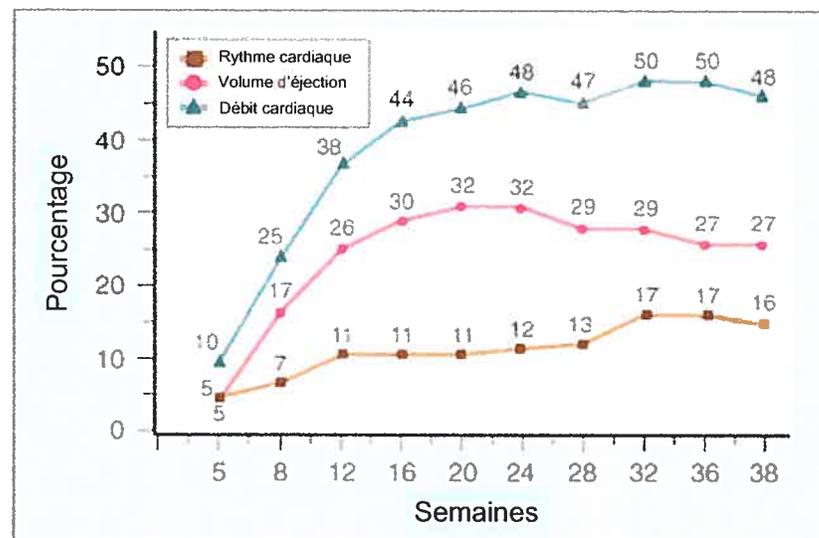


Figure 4 : Changements, en pourcentage, du rythme cardiaque, du volume d'éjection et du débit cardiaque mesurés en position latérale tout au long de la grossesse et comparés aux valeurs de non gestation. (Adapté d'Elkayam) (59)

1.2.3. Le Système Capacitif

La majorité du volume sanguin augmenté se répartit dans le système veineux ou capacitif. Il est suggéré que les changements des niveaux d'hormones stéroïdes circulantes (sexuelles et surrénaliennes) en combinaison avec les modifications de productions de prostaglandines vasodilatatrices, d'ANP, de NO et d'aldostérone affectent l'extensibilité veineuse et le tonus artériel (169). On constate une augmentation de la capacité veineuse par création de plexus veineux, ainsi que par la dilatation des gros troncs veineux qui résulte, entre autre, de la compression par l'utérus gravide. À la fin de la grossesse, une quantité importante de sang peut s'accumuler dans les membres inférieurs en raison de l'hyperpression veineuse et de l'extensibilité plus grande des parois veineuses. L'ensemble de ces modifications tend à favoriser le remplissage cardiaque sans entraîner d'augmentation de la sécrétion de facteurs natriurétiques auriculaires (53; 91). L'adaptation du système capacitif tend à 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 gestation.

1.2.4. La Pression Artérielle

Durant la grossesse, la pression artérielle diminue (la diastolique plus que la systolique) durant le premier trimestre pour atteindre son point le plus bas en milieu de grossesse et retrouver des valeurs près de la normale à terme (74; 142; 163). La pression artérielle est le produit du débit cardiaque et de la résistance vasculaire systémique. Durant la grossesse, le débit cardiaque augmente tandis que la résistance vasculaire diminue (53; 74; 243). Cela permet de contrôler la pression artérielle au repos, et de la maintenir stable malgré la rétention hydrosodée et l'augmentation de volémie. La sensibilité du baroréflexe est également accrue lors de la grossesse pour protéger la femme contre les variations du débit cardiaque en fonction de la position (53; 161). De plus, l'adaptation maternelle à l'effort module les modifications déjà existantes au repos (l'augmentation du débit cardiaque par augmentation de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique). En effet, l'exercice physique entraîne des augmentations de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique, qui résultent en une élévation du débit cardiaque. Avec la progression de la grossesse, l'augmentation du volume d'éjection du ventricule gauche n'est plus suffisante et la capacité à l'effort de la femme diminue. En agissant ainsi,

l'organisme se comporte comme protecteur de l'unité fœto-placentaire, la protégeant de chutes trop importantes dans l'apport de nutriments et d'oxygène, dues à une diminution du débit sanguin (53).

1.2.5. La Réactivité Vasculaire

La résistance vasculaire systémique 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) (243). Durant la grossesse, on note une diminution de la résistance vasculaire qui s'accompagne d'une résistance à l'effet presseur de plusieurs agents vasoconstricteurs (184; 186; 243). 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 (229). 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 (176), le babouin (179), le lapin (111) et la brebis (245). Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer les baisses de pression artérielle et de réactivité vasculaire : 1) des modifications au niveau des récepteurs vasculaires soit par une diminution du nombre de récepteurs ou de leur affinité pour les agents vasoconstricteurs ou encore une occupation des récepteurs par des molécules endogènes qui empêche l'action des vasoconstricteurs exogènes, 2) une augmentation de la libération de vasodilatateurs endogènes, tel le NO et les prostaglandines, 3) une diminution générale de la capacité des muscles lisses vasculaires à réagir au stimuli presseurs (229).

Plusieurs études sur les propriétés des muscles lisses vasculaires ont été effectuées pour déterminer leur implication dans les changements hémodynamiques de la grossesse. Des données durant la grossesse, autant chez les animaux que chez l'humain, suggèrent que la diminution du tonus vasomoteur ainsi que le remodelage des artères de résistance participent à la diminution de la post-charge cardiaque (40; 147; 150). De plus, 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 grosses artères sont également altérées (57; 90; 183; 223; 228; 241). Des études histologiques sur l'aorte maternelle chez le lapin (47) et chez l'humain (144)

durant la gestation ont clairement démontré des changements structuraux importants tel une rupture des lamelles élastiques, une diminution des protéoglycans ainsi qu'une hypertrophie et une hyperplasie des muscles lisses vasculaires. Les mécanismes impliqués dans l'adaptation des grosses artères durant la gestation sont toutefois peu étudiés. Edouard et al (57) ont néanmoins démontré qu'en plus d'une augmentation de la compliance et du diamètre de l'aorte, on pouvait noter chez la femme enceinte une diminution de la distensibilité et des composantes viscoélastique des veines des membres inférieurs. Ces diminutions n'étaient cependant pas observées au niveau des membres supérieurs. Ces changements faciliteraient la fonction cardiaque jusqu'à l'accouchement. Il reste néanmoins encore beaucoup de travail à effectuer avant de pouvoir conclure sur la part exacte qu'occupent les modifications physiques des vaisseaux dans la diminution de la réactivité vasculaire lors de la grossesse.

L'hypothèse sur les modifications des récepteurs vasculaires est plus controversée. Le plus étudié est probablement le récepteur de l'Ang II, AT_1 . Il a été démontré que chez la brebis, l'expression de ce récepteur est augmentée de 8 fois dans l'endothélium de la vasculature utérine et de 2 fois au niveau systémique à différentes périodes de la gestation. AT_1 a également été détecté dans les muscles lisses vasculaires mais aucun changement significatif n'a été noté durant la gestation (19). D'autres suggèrent qu'une hétérodimérisation entre AT_1 et B_2 (le récepteur de la bradykinine) serait impliqué dans la régulation de la réponse à l'Ang II et qu'une augmentation de ce dimère serait responsable de l'augmentation de sensibilité à l'Ang II durant la prééclampsie (1; 192). D'autres équipes se sont également intéressées aux récepteurs adrénergiques. Puisqu'il est établi que les β -adrénergiques sont modulés par les hormones stéroïdes (glucocorticoïdes et stéroïdes sexuels), il est logique de croire que leurs variations durant la grossesse influencent l'expression des récepteurs adrénergiques (116; 224; 248). Dans des conditions normales, les récepteurs β_2 adrénergique sont impliqués dans la vasodilatation via l'activation de l'enzyme adénylate cyclase et l'augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire. À l'opposé, les récepteurs α -adrénergiques influencent la résistance vasculaire par vasoconstriction. Les récepteurs α_2 diminuent l'AMPc en inhibant l'adénylate cyclase tandis que les récepteurs α_1 active la phospholipase C qui forme l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol résultant en une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et un activation des protéines kinases C

(PKC), deux mécanismes qui favorisent la contraction du muscle lisse vasculaire (224). Encore une fois, plusieurs données controversantes sont connues au sujet de ces récepteurs durant la grossesse. Chez la brebis, le récepteur adrénérgique α_1 diminue de 25% dans l'aorte en fin de gestation mais on ne note aucune différence dans la vasculature pulmonaire (218). Tandis qu'au niveau des vaisseaux utérins, chez le porc, on ne voit pas de différence d' α_1 mais une diminution d' α_2 (88) et chez le cobaye on remarque une augmentation d' α_1 (62). Toutes ces observations nous démontrent que les modifications des récepteurs des vaisseaux sont très variables entre les espèces et entre les différentes périodes de la grossesse et donc nous laisse supposer qu'elles ne sont pas la cause principale de la diminution de réponse aux agents vasopresseurs de la grossesse.

Finalement, l'hypothèse que la diminution de réponse aux vasoconstricteurs durant la grossesse soit due à une augmentation de la libération de prostaglandines et de NO est encore le sujet de multiples études. Il est certain que durant la grossesse, la synthèse de PGI_2 est augmentée (73), mais elle n'est toutefois pas suffisante pour agir comme hormone circulante et doit donc agir de façon locale (186). L'augmentation de sa sécrétion est donc spécifique pour certains lits vasculaires, particulièrement celui de l'utérus (143). Dernièrement, l'intérêt s'est donc détourné vers le NO. Il est rapporté que l'expression et l'activité des NO synthases (NOS) sont élevées durant la grossesse ainsi que le niveau plasmatique et l'excrétion urinaire de guanylate monophosphate cyclique (GMPc), le second messager du NO (86). Comme les études chez la femme sont difficiles à réaliser, on se fie en grande partie aux études animales. Chez le rat, on observe également des augmentations des niveaux plasmatique et urinaire de NO_2 et NO_3 (produits du métabolisme du NO) ainsi que du GMPc (42). Chez le cobaye l'activité de la NOS constitutive est augmentée de 4 fois au niveau des artères utérines (256). Bien que de nombreuses études ont démontré que les composantes dérivées de l'endothélium, PGI_2 et NO, aient un rôle à jouer dans la diminution de réponse aux vasoconstricteurs, ils ne peuvent être les seuls facteurs impliqués puisque cet effet a également été démontré dans des vaisseaux dénudés de leur endothélium (12; 33; 177; 200).

Toutefois, il a été démontré que l'entrée de calcium via les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC) est altérée dans l'aorte et les vaisseaux mésentériques durant la gestation (199; 230). De plus, les canaux potassiques dépendants du calcium (BK_{Ca}) et ceux dépendants de l'adénosine triphosphate (ATP) (K_{ATP}) sont activés durant la

grossesse (33; 113; 152). Ces résultats suggèrent qu'une altération du potentiel de membrane pourrait être responsable de la diminution de réponses aux agents presseurs. Meyer et al (152) ont rapporté que la grossesse entraîne une augmentation (hyperpolarisation) du potentiel de membrane dans les artères mésentériques. Cette avenue reste également à explorer afin de déterminer les mécanismes responsables de la diminution de résistance vasculaire.

1.3. Hypertension gestationnelle

Malheureusement, toutes les grossesses ne se déroulent pas sans complication. La prééclampsie est l'une des pathologies les plus fréquentes puisqu'elle affecte ~5 à 10% des grossesses (15). Toutefois, l'étiologie et la pathogenèse sont encore inconnues et aucun traitement, à l'exception de l'accouchement prématuré, ni aucune méthode de prédiction ne sont encore établis. Plusieurs études sont toutefois entreprises pour connaître les fondements de cette pathologie.

1.3.1. Caractéristiques de la prééclampsie

Le syndrome de prééclampsie est caractérisé par une élévation de la pression artérielle (140/90 mmHg ou plus), l'apparition d'une protéinurie (plus de 0.3g/24h) et des œdèmes (74). Chez les femmes qui vont éventuellement développer une prééclampsie, on observe une pression artérielle plus élevée dès le début de la grossesse et cette tendance va se maintenir jusqu'à terme comme le démontre la figure 5 (163). La prééclampsie est souvent accompagnée d'une restriction de croissance intrautérine (RCIU). Malgré l'absence de traitement, plusieurs études s'intéressent au dépistage de la prééclampsie et de la RCIU en utilisant des tests cliniques, des marqueurs dans le sérum maternel et des analyses par échographie (doppler) du flot dans l'artère utérine. Au niveau clinique, il est important de mesurer les risques de prééclampsie en considérant l'historique familial, s'il y a déjà eu des cas de prééclampsie dans la famille, et l'historique de la patiente, s'il y a eu de la prééclampsie dans une grossesse précédente, car les risques sont plus élevés.

En attendant d'avoir un moyen efficace de détecter la prééclampsie, la majorité des études essaient d'en déterminer les mécanismes impliqués dans la pathogenèse. La plupart des études s'entendent pour dire que le placenta a un rôle dans le développement de cette maladie puisqu'elle se développe durant la grossesse et se rétablit dans la période post-

partum. Une des hypothèses suggère que, dans la première phase de développement de la maladie, s'installerait une mauvaise implantation du placenta. Lors de la grossesse normale, les cytotrophoblastes envahissent les artères spiralées de l'utérus et remplacent progressivement les cellules endothéliales vasculaires, le tissu élastique de la média, la couche de muscles lisses et le tissu neuronal. À la fin du second trimestre, les artères spiralées sont remplacées par des tubes dilatés tapissés de cytotrophoblastes, ce qui forme le système artériel de faible résistance de l'utérus nécessaire à l'apport sanguin du fœtus (115). Plusieurs études soutiennent que durant la prééclampsie, l'expression anormale des molécules d'intégrine par les cytotrophoblastes ainsi que la quantité importante d'apoptose retrouvée chez les cytotrophoblastes invasifs résultent en un envahissement des artères spiralées limité aux couches supérieures de la décidua (54; 77; 115; 265). Ainsi, le remodelage inadéquat des artères spiralées ne satisfait pas les demandes de flot sanguin et de nutrition du fœtus et peut entraîner un RCIU ainsi que l'ischémie du placenta qui peut entraîner une cascade d'événements qui amènera des changements important au niveau de la circulation maternelle (115).

Il est également suggéré que la deuxième phase du développement de la prééclampsie corresponde à la phase d'apparition des signes cliniques. Il est proposé que l'ischémie/hypoxie utéroplacentaire de la grossesse seraient la cause de l'augmentation de résistance vasculaire et de pression artérielle observées durant la prééclampsie via les mécanismes impliqués dans la diminution de relaxation vasculaire et l'augmentation de réactivité vasculaire des vaisseaux systémiques (45; 115; 139). Une des hypothèses à ce sujet propose que cela résulterait de la relâche par le placenta de facteurs circulants qui vont endommager ou activer l'endothélium vasculaire ou les cellules des muscles lisses maternels (115). Bien que ces facteurs circulants n'aient pas encore été pleinement caractérisés, plusieurs facteurs ont été suggérés. Parmi ceux-là, on retrouve les cytokines plasmatiques (43), le stress oxydatif et ses radicaux libres (198), le facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF) (193), l'homocystéine (187) et la leptine (148) plasmatique ainsi que la neurokinine B (175) et les cytokératine-18 et -19 (92). Toutefois, leur rôle et leur mécanisme d'action dans cette pathologie sont inégalement documentés et doivent encore être approfondis.

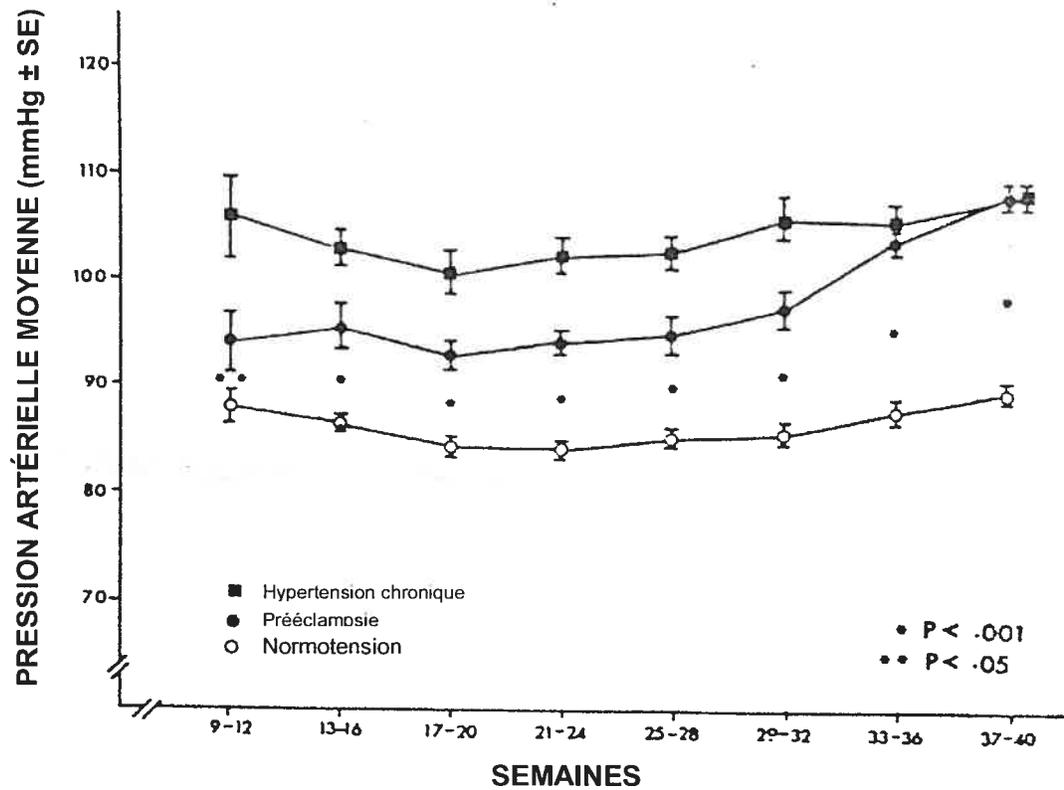


Figure 5 : Pression artérielle moyenne chez les femmes qui restent normotensives durant toute la grossesse, chez celles qui développent de la prééclampsie et chez celles qui manifestent une hypertension chronique (Adapté de Moutquin) (163)

Il a aussi été suggéré que l'augmentation de réactivité vasculaire aux vasoconstricteurs pourrait être due à la diminution des mécanismes de relaxation liés à l'endothélium vasculaire et/ou aux mécanismes amplifiés de contraction des muscles lisses vasculaires. La figure 6 montre les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse qui induisent les changements vasculaires durant la grossesse normale et la prééclampsie. L'augmentation de la production de NO durant la grossesse normale a poussé plusieurs chercheurs à émettre l'hypothèse qu'une baisse de la production de NO serait impliquée dans la régulation des symptômes cliniques de la prééclampsie. Pour soutenir cette hypothèse, des changements dans la production de NO ont été observés chez les femmes prééclamptiques (215) et une inhibition des NOS par de la N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) chez les rates en fin de gestation a induit des changements pathologiques similaires à ceux observés durant la prééclampsie (114; 260). Toutefois, dans les mêmes conditions, des changements similaires sont observés chez les rates nullipares. Toutefois, bien qu'il soit reconnu que les changements dans la production de NO peuvent jouer un rôle dans certaines parties de la régulation de la circulation maternelle, plusieurs résultats suggèrent des mécanismes additionnels indépendants du NO. Parmi ceux-là, on retrouve la prostaglandine vasorelaxante dérivée de l'endothélium, la PGI₂, qui peut contribuer à la régulation hémodynamique observée durant la gestation et la prééclampsie (Fig. 6). Des changements au niveau de sa production ont d'ailleurs été rapportés chez les femmes souffrant de prééclampsie (71; 115; 261). On peut également inclure le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) (Fig. 6). Il est suggéré que sa relâche serait modifiée durant la grossesse mais son implication dans la prééclampsie reste à être étudiée (78; 115). L'endothéline serait également impliquée puisque sa production par les cellules endothéliales (Fig. 6) est augmentée chez les femmes atteintes et elle serait associée aux vasospasmes de la prééclampsie. Toutefois, puisque les concentrations d'endothéline plasmatique sont plus élevées vers la fin de la grossesse, on suppose que son implication serait dans la progression de la pathologie plutôt que dans son initiation (238). Finalement, la thromboxane A₂ (TXA₂) (Fig. 6), un autre facteur contractile dérivé des plaquettes, contribuerait à l'augmentation de réactivité vasculaire puisque sa synthèse est augmentée durant la prééclampsie en comparaison avec une grossesse normale (72).

Malgré cela, les mécanismes liés à l'endothélium ne seraient pas les seuls responsables de l'augmentation de réponse aux vasoconstricteurs. Comme le démontre une étude de Khalil et al (115), la réponse contractile à la phényléphrine (PhE) d'aorte, avec ou sans endothélium, est plus importante dans le modèle de rat avec hypertension de grossesse (RUPP) que chez les rates gestantes normales. D'autre part, ces études effectuées sur un modèle de prééclampsie de rats recevant du L-NAME ont démontré que la relâche de calcium des réserves intracellulaires par la voie IP_3 ou encore par l'augmentation du calcium intracellulaire n'était pas altérée. Toutefois, la réponse contractile à la dépolarisation membranaire, en grande partie due à l'entrée de calcium extracellulaire par les canaux voltage-dépendants, est augmenté chez ce même modèle (114). Les canaux potassiques pourraient également être impliqués puisqu'ils sont en grande partie responsable du contrôle du potentiel de membrane (33). Il reste cependant beaucoup de points à éclaircir dans l'implication des canaux ioniques dans la prééclampsie et d'autres études seront nécessaires pour y arriver.

Comme la prééclampsie est une maladie propre à l'humain, les études cliniques sur les femmes enceintes souffrant d'hypertension ainsi que les échantillons de plasma, de fluides corporels et de placentas post-partum ont été très utiles pour identifier les mécanismes possibles de cette maladie. Toutefois, les études sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'hypertension de grossesse peuvent être difficiles et coûteuses. Pour ces raisons, de nombreux investigateurs ont donc choisi d'utiliser des modèles animaux d'hypertension de grossesse.

1.3.2. Les modèles animaux de prééclampsie

1.3.2.1. Toxémie

Ce modèle consiste en l'injection de très faibles doses d'endotoxine via la veine jugulaire chez la rate gestante consciente. Les rates reçoivent une infusion de $1\mu\text{g/kg}$ sur une période d'une heure au jour 14 de la grossesse. Elles développent par la suite une augmentation de la pression artérielle et de l'excrétion d'albumine urinaire ainsi que de la coagulopathie plaquettaire. De plus, des dépôts de fibrinogène au niveau du glomérule sont détectés (61). Ce modèle a été proposé pour étudier la prééclampsie puisqu'il reproduit plusieurs composantes importantes de la maladie. Toutefois, Sakawi et al n'ont

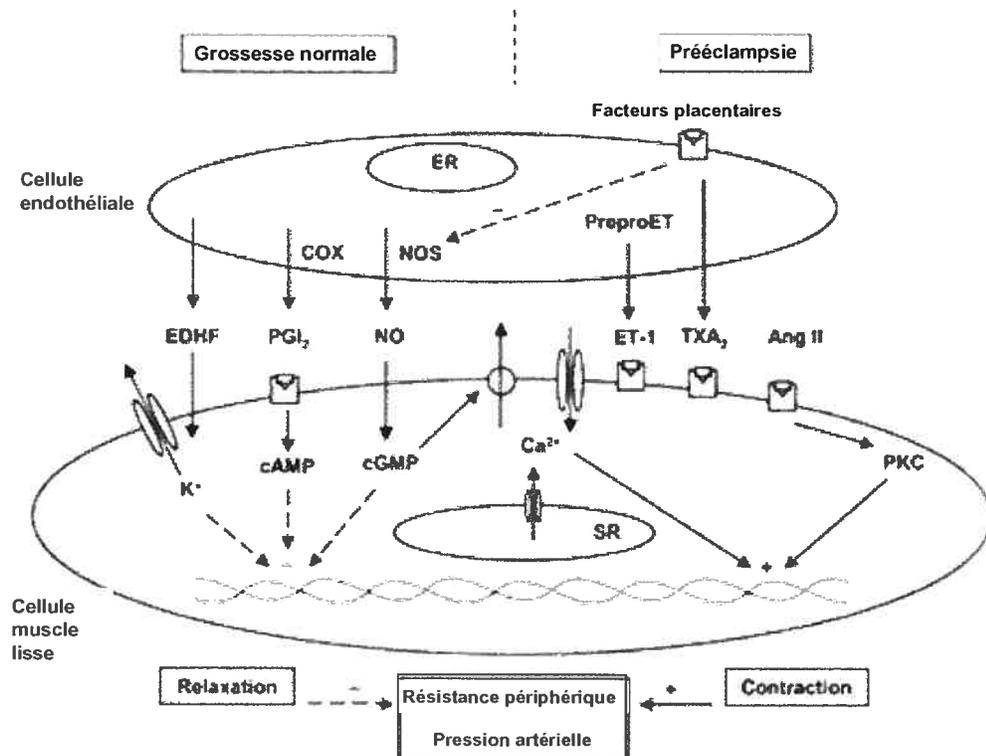


Figure 6 : Changements vasculaires durant la grossesse normale et la prééclampsie. Les cellules endothéliales libèrent différentes substances qui influencent la contraction ou la relaxation des cellules musculaires lisses. Ces dernières contrôlent la résistance périphérique et la pression artérielle. Lors de la prééclampsie, les substances libérées favorisent l'élévation de résistance périphérique et de pression artérielle. (Adapté de Khalil) (115)

pas réussi à reproduire le modèle. Même avec des doses de 10µg/kg ils n'ont pas observé d'hypertension bien que les rates souffraient de protéinurie et de thrombocytopénie (204).

1.3.2.2. Système nerveux sympathique

Chez les femmes souffrant de prééclampsie, l'activité du système nerveux sympathique est augmentée (180; 209). Pour vérifier l'implication de celui-ci dans la pathologie, un modèle de rat a été développé en exposant les rates gestantes à un plancher maintenu à 0°C à partir du 5^e jour de gestation. Ces animaux souffrent d'hypertension et de protéinurie et ont des niveaux de noradrénaline plasmatique élevés. De plus, on note une diminution de l'invasion trophoblastique et une augmentation de la RCIU et de la mort fœtale (108). Ce modèle partage plusieurs signes cliniques de la prééclampsie mais comme les rates non-gestantes placées dans les mêmes conditions montrent les mêmes symptômes, on ne peut l'associer à la prééclampsie (108).

1.3.2.3. Modèle de néphropathie par adriamycine

On peut, chez les rats, induire une néphropathie avec une seule dose d'adriamycine, un antibiotique de type anthracycline qui est utilisé en clinique comme agent anti-tumoral. Ces animaux développent de la protéinurie, de l'hypertension et une insuffisance rénale chronique. Ce modèle correspond aux maladies glomérulaires chroniques de l'humain et les maladies rénales chez la femme sont un facteur de risque important de prééclampsie. Une faible dose d'adriamycine (3 mg/kg i.v.), ayant peu d'effet sur la pression artérielle et la fonction rénale, est administrée à des rates nullipares. Puis les rates sont accouplées 2 semaines après le traitement et étudiées à terme. L'augmentation de la pression artérielle qui en résulte est associée avec une protéinurie importante, une diminution de la filtration glomérulaire et une augmentation du ratio glomérulaire thromboxane B2/prostaglandine E2. Ces rates gestantes ont donc un profil clinique d'atteinte rénale avec une prééclampsie ajoutée même si l'histologie placentaire et rénale demeure normale. De plus, les symptômes observés disparaissent après la grossesse et on retrouve des valeurs similaires à celles des non-gestantes traitées avec l'adriamycine. Une altération des NOS est également observé dans ce modèle puisque la production totale de NO est diminuée. Ainsi, la production de NO est importante dans le

développement de l'hypertension de grossesse dans les animaux qui, toutefois, représentent d'abord un modèle de néphropathie (180; 182).

1.3.2.4. Inhibition des synthèses de NO

La production de NO endothéliale est continue et est sous régulation principale par les forces de cisaillement (121). Le NO contrôle le tonus vasculaire et la pression artérielle par son action vasodilatatrice et en antagonisant l'effet presseur des vasoconstricteurs (180). Lorsqu'on traite des rates gestantes, à partir du 17^e jour de grossesse jusqu'à terme, avec des infusions sous-cutanées de 25 et 50 mg de L-NAME, on observe de l'hypertension, de la protéinurie, de la RCIU et de la mortalité fœtale proportionnelles à la dose (260). De plus, la résistance périphérique, la résistance vasculaire rénale, les niveaux plasmatiques d'angiotensine et d'endothéline 1 de même que la réponse vasculaire à l'ANG II sont augmentés tandis que le rythme cardiaque, la volémie ainsi que la perfusion sanguine du cœur, des reins, des poumons, du foie, du diaphragme et des muscles squelettiques sont diminués (58; 110; 160). Tous ces symptômes sont très ressemblants à la pathologie et indiquent que la synthèse de NO serait l'un des facteurs responsable de cette maladie. Toutefois, le traitement au L-NAME affecte également plusieurs de ces paramètres chez les rates non gestantes, démontrant que cette condition n'est pas spécifique à la grossesse et sa pathologie. On peut quand même utiliser ce modèle puisqu'il induit clairement des changements spécifiques à la prééclampsie pour l'étude de l'étiologie et de la pathogenèse et il pourra également servir pour tester différentes stratégies thérapeutiques.

1.3.2.5. Modèles diététiques

Chez la brebis, il est possible de créer un modèle d'hypertension de grossesse par un jeûne de 72h en fin de grossesse. La nourriture leur est enlevée au 142^e jour sur 150 jours de gestation. Les brebis vont par la suite développer des augmentations de la pression artérielle moyenne et de la résistance périphérique tandis que le débit cardiaque, le débit sanguin de l'artère utérine gauche et la filtration glomérulaire diminuent (239). Toutefois certains auteurs doutent de ce modèle de jeûne puisque l'hypertension n'est pas toujours présente chez la brebis et le cochon d'inde et qu'il n'est pas possible d'induire la prééclampsie chez la femme par le jeûne (180).

Un autre modèle nutritionnel a essayé de percer en recherche. Une déficience en calcium chez la rate (18) et la brebis (188) gestantes avait réussi à induire une augmentation de la pression artérielle mais une étude supportée par le National Institute of Health n'a montré aucun effet protecteur contre les symptômes de la prééclampsie chez des femmes recevant un supplément de calcium (220) ce qui a réduit l'intérêt pour ce modèle.

Finalement, puisque les femmes prééclamptiques montrent des signes d'hyperinsulinémie, un modèle de cette condition a été créé pour voir les effets sur la grossesse. Des rates se sont vues implantées des pompes à libération prolongée d'insuline à deux occasions : une semaine avant le début de la grossesse et au 7^e jour de la gestation. Ces rates ont par la suite développées, près du terme, une hypertension, une légère diminution des niveaux de glucose sérique, une hypertriglycéridémie et des diminutions de l'excrétion de sodium et de la production de NO. Les composantes hémodynamiques rénales sont restées inchangées. Les auteurs croient que ce modèle est très prometteur puisqu'il procure un autre modèle de rat avec une dysfonction endothéliale, de l'hypertension, aucune augmentation de filtration glomérulaire liée à la gestation et une RCIU. En plus de fournir un modèle avec plusieurs caractéristiques de la prééclampsie, il pourra servir à étudier le rôle pathologique de l'hyperinsulinémie dans le développement de RCIU sévères (180; 181).

1.3.2.6. Stress oxydatif

Plusieurs hypothèses suggèrent que le stress oxydatif serait un joueur important dans la prééclampsie puisque des marqueurs de ce dernier sont présents dans le placenta et dans la circulation maternelle des femmes atteintes. Afin de déterminer cette hypothèse, une étude clinique randomisée ayant pour objectif de supplémenter des femmes enceintes de vitamines C et E a été réalisée. Malheureusement, le traitement ne diminue pas le taux de prééclampsie chez les femmes à risque mais il augmente le nombre de naissance de bébés de petits poids. L'étude a donc été arrêtée (185).

Un autre modèle consiste à faire une injection intrapéritonéale de Suramin, un inhibiteur de l'angiogenèse, dans le but d'altérer la placentation. Cette expérience a été réalisée dans deux souches de rats Sprague-Dawley. Ces deux souches ont été utilisées pour évaluer si les différences génétiques de ces animaux influenceraient le traitement et

son effet sur la gestation. Il a été démontré dans une étude précédente que les rats d'une mère de la première souche, rendue diabétique avant la grossesse, avaient plus de chance de souffrir d'une augmentation de la réabsorption et de malformations osseuses que ceux de la deuxième souche (60). Dans le traitement au suramin, on note qu'à la fin de la gestation, dans les deux souches, le traitement induit une diminution du flot sanguin placentaire et de la RCIU ainsi qu'une augmentation de la concentration d'isoprostanes placentaires, un indicateur du stress oxydatif, au niveau du placenta. De plus, dans la première souche, on voit une augmentation de la pression artérielle et une réduction du flot sanguin rénal ainsi qu'une élévation des niveaux d'endothéline-1. Cette étude démontre que le suramin induit un état d'insuffisance placentaire qui ressemble à la prééclampsie et que l'induction de cette condition est en partie modulée par le stress oxydatif et qu'elle est sujette à une grande variabilité génétique (165).

1.3.2.7.L'ischémie utéroplacentaire

Selon plusieurs auteurs, l'ischémie utéroplacentaire serait un des événements principaux de l'augmentation de pression observée durant la prééclampsie. Selon la revue de Podjarny et al (180), ce sont Ogden E, Hildebrand GJ et Page EW, en 1939, qui furent les premiers à essayer de tester l'hypothèse de Young émise en 1914, qui suggérait que l'ischémie utéroplacentaire pouvait induire une hypertension chez les animaux en gestation. Ils ont induit une ischémie placentaire avec des clamps métalliques chez des chiennes gestantes anesthésiées. Depuis, plusieurs variantes de la technique ont été utilisées. Généralement, les clamps métalliques sont placées sur l'aorte sous les artères rénales ou encore autour des artères utérines (180). Le tout est fait dans le but de réduire l'apport sanguin, donc celui de l'oxygène et des nutriments, à la circulation placentaire. Chez le babouin (36; 37), le singe rhésus (41), le cochon d'inde (83), le lapin (139), le chien (180), la brebis (180) et le rat (115), il a été possible d'observer un état hypertensif similaire à celui des femmes souffrant de prééclampsie incluant la protéinurie, la diminution de la filtration glomérulaire et du débit cardiaque, l'augmentation de résistance périphérique et la RCIU. Cependant, il existe des différences entre les techniques utilisées pour clamer la circulation utérine puisque certaines espèces répondent mieux à une technique plutôt qu'à une autre.(180). On ne connaît toutefois pas encore tous les mécanismes reliant l'ischémie placentaire et l'élévation de pression observée chez la

femme prééclampsique ou dans les modèles animaux d'hypertension de grossesse. Des études sur un modèle de rat de pression de perfusion utérine réduite (RUPP) ont suggéré des changements dans la fonction rénale comme cause de l'hypertension tandis que d'autres études se concentrent sur les mécanismes vasculaires et cellulaires (115). La route est encore longue avant de pouvoir déterminer les causes exactes mais ce modèle est très prometteur. L'aspect négatif de ces modèles est qu'il s'accompagne souvent de mortalité fœtale *in utero*.

1.3.2.8. Les modèles génétiques

La comparaison de trois modèles de souris génétiquement modifiées suggère que la prééclampsie peut être initiée par au moins trois mécanismes : une hypertension maternelle préexistante qui est exacerbée par la grossesse, une pathologie placentaire et des niveaux élevés d'Ang II dans la circulation maternelle dus à une surproduction de rénine par le placenta.

Le modèle de souris BPH/5 est à l'origine une souris avec des valeurs limite de pression, obtenue par le croisement de plusieurs générations de frères et sœurs de la souche de souris hypertendue BPH/2 (49), qui en fin de gestation montre un état très similaire à celui de la prééclampsie, avec une hypertension. Elle développe également de la protéinurie et montre des signes histologiques de glomérulosclérose rénale. Bien que les gènes impliqués dans ce modèle ne soient pas connus, il reste intéressant à étudier puisque l'hypertension familiale est un facteur de risque de la prééclampsie. Ce modèle suggère également qu'une prédisposition à l'hypertension pourrait être suffisante pour entraîner le début de la prééclampsie (46).

Un autre modèle murin est celui de la déficience en $p57^{Kip2}$, un inhibiteur de plusieurs complexes de kinases dépendantes des interactions cycline/cycline (CDK) qui régularisent le cycle cellulaire (107). Chez les mères hétérozygotes, on observe en plus de l'hypertension gestationnelle et des lésions rénales, des changements dans le placenta tel qu'une prolifération anormale des trophoblastes. L'implication du placenta est encore plus marquée lorsqu'on constate qu'une mère avec un génotype normal qui porte des petits déficients $p57^{Kip2-}$ montre les symptômes de prééclampsie. De plus, que la mère soit wild-type ou hétérozygote, elle manifestera les symptômes de prééclampsie même si seulement quelques membres de la portée sont atteints de la déficience. On note également que la

progéniture mutante souffre souvent de restriction de croissance et d'un mauvais développement du placenta (46; 107).

Finalement, l'implication du SRAA dans l'hypertension maternelle est reflétée dans un modèle de souris (236) et de rats (23) qui code les gènes de la rénine et de l'angiotensinogène humaine. Les SRAA des rongeurs et de l'humain n'interagissent pas entre eux, ce qui permet d'évaluer la fonction de la rénine humaine, exprimée par le placenta, sur l'angiotensinogène humaine, retrouvée dans la circulation maternelle, et vice-versa. Les rats qui expriment respectivement le transgène AGT (angiotensinogène) et ceux qui portent le transgène REN (rénine humaine) sont normotendus. Lorsque des femelles portant le transgène AGT sont accouplées avec un mâle portant le transgène REN, elles développent de l'hypertension gestationnelle ainsi qu'une augmentation du rythme cardiaque. Elles souffrent également de protéinurie et de glomérulosclérose. On peut noter chez ces femelles une augmentation des concentrations plasmatiques de rénine, qui provient du placenta et disparaît après l'accouchement. L'angiotensinogène humaine exprimée en excès chez ces animaux est donc transformée en angiotensine I (puis en angiotensine II) tant à un niveau local qu'en circulation. Il faut noter que lorsque c'est la femelle qui porte le gène de la rénine et le mâle celui de l'angiotensinogène on observe plutôt une baisse de pression. Ceci est dû au fait que le placenta ne produit pas suffisamment d'angiotensinogène humaine pour qu'elle soit détectable dans la circulation ou qu'elle ait un effet sur la pression artérielle (23). Ce modèle permet de démontrer l'implication du SRAA dans l'hypertension gestationnelle.

1.3.2.9. Les modifications du système rénine-angiotensine-aldostérone

En suivant cette même logique d'une modification de l'activité du SRAA, nous savons qu'il est possible d'augmenter considérablement l'activité du SRAA chez les rates gestantes en comparaison avec les non gestantes en diminuant de façon importante l'ingestion de sodium. Cette manœuvre, effectuée durant les 7 derniers jours de gestation chez la rate, contrairement à ce qui était attendu, ne modifie pas la diminution de la pression artérielle de la fin de gestation mais induit des augmentations des niveaux plasmatiques de PRA et d'aldostérone (201). À l'opposé, la réduction du SRAA avec une diète élevée en sodium (saline 0.9% et 1.8% comme eau de breuvage) prévient la baisse de pression (0.9% NaCl) ou provoque une augmentation de celle-ci (1.8% NaCl) en fin de

gestation chez la rate (Fig. 7) (15). Durant la gestation, les niveaux de la PRA et de l'aldostérone plasmatique sont augmentés, mais avec les traitements aux suppléments sodiques, ils sont diminués, allant même jusqu'à des niveaux presque équivalents à ceux des rates non gestantes. De plus, la prise du supplément sodique de 1.8% entraîne de la protéinurie (15).

On retrouve également chez les rates gestantes supplémentées en sodium, une augmentation de la réponse vasculaire des anneaux aortiques aux agents vasoconstricteurs tels que la phényléphrine, le KCl et la vasopressine. De plus, on observe chez ces animaux que les effets inhibiteurs de différents modulateurs de canaux ioniques sont modifiés. En effet, la cromakalim ($1\mu\text{M}$), un activateur des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), induit une plus grande inhibition chez les rates non gestantes que gestantes sous diète normale, alors qu'il a un effet similaire dans les deux groupes lorsque ceux-ci reçoivent un supplément sodique. Une diète de 0.9% NaCl élève aussi l'effet inhibiteur du NS-1619 ($10\mu\text{M}$), un activateur des canaux potassiques dépendants du calcium (BK_{Ca}), chez les rates gestantes. Finalement, la nifédipine ($0.1\mu\text{M}$), un inhibiteur des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), cause une plus grande inhibition de la réponse contractile chez les rates gestantes recevant le supplément sodique que chez celles qui reçoivent une diète normale (12).

Ces résultats démontrent que ces rates présentent des manifestations de la prééclampsie (hypertension, protéinurie et réactivité vasculaire augmentée). Les rates non gestantes similairement traitées ne manifestent aucun de ces changements. D'autres groupes utilisent un modèle similaire en donnant aux rates gestantes un supplément sodique de 0.9% avec du désoxycorticostérone acétate (un minéralocorticoïde puissant qui empêche l'excrétion de l'excès de sel). Ils ont démontré, en plus des caractéristiques usuelles de la prééclampsie, dans leur modèle des modifications dans les niveaux de marinobufagénine (MBG), un inhibiteur endogène de la Na/K-ATPase (189). Cela concorde avec ce qui est observé chez la femme puisque des augmentations des composés similaires à la ouabaïne et à la MBG ont été observés dans le plasma de femmes prééclamptiques (137).

Pour conclure, bien que la prééclampsie soit une condition spécifique à la femme, il est possible d'en reproduire les symptômes en affectant différents paramètres chez les animaux durant la gestation. Cela laisse croire que plus d'une composante seraient

impliquées dans le développement de cette maladie. Il me semble que le modèle génétique de la femelle surexprimant le gène de l'angiotensinogène couplée au mâle surexprimant le gène de la rénine humaine et le modèle de supplément sodique suggèrent fortement une implication du SRAA dans la pathogénèse de la maladie, comme le proposent les travaux de Salas et collaborateurs (206). C'est pourquoi dans notre laboratoire, nous avons décidé d'évaluer plus précisément les différentes composantes du SRAA qui pourraient être impliquées et leurs effets sur les changements hémodynamiques observés. Nous allons donc décrire succinctement le fonctionnement des vaisseaux sanguins avant d'entrer dans les résultats de notre étude.

2. Mécanismes de contraction et de relaxation des muscles lisses

Afin d'étudier les différents changements hémodynamiques observés durant la grossesse, nous étudions, entre autre, la réactivité des vaisseaux sanguins. Comme la pression artérielle est la résultante du débit cardiaque et de la résistance périphérique, nous obtenons également un indice de sa modulation en évaluant la réactivité vasculaire des vaisseaux systémiques.

2.1. Structure des vaisseaux

Les parois des artères et des veines sont composés de trois tuniques qui entourent la lumière, où le sang circule. La tunique interne est formée d'endothélium, un épithélium simple squameux qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux et qui repose sur une couche de tissu élastique appelée limitante élastique interne. La tunique moyenne, ou média, comprend principalement les cellules musculaires lisses disposées en anneaux et les fibres élastiques (élastine). Finalement, la tunique externe est composée principalement de fibres élastiques et de fibres de collagène qui protègent les vaisseaux et les encrent aux tissus environnant (145; 244). Les trois couches sont toujours présentes, à l'exception des capillaires, mais l'épaisseur varie selon le type de vaisseau et sa fonction. On retrouve donc 5 grandes classes de vaisseaux sanguins : les artères élastiques, les artères de conductance, les vaisseaux de résistance, les vaisseaux d'échange et les vaisseaux de capacitance (129). Les artères élastiques possèdent le plus grand diamètre et portent leur nom car leur tunique moyenne contient une forte proportion d'élastine. L'élastine est une protéine extracellulaire qui permet aux artères de s'étirer d'environ 10% à chaque

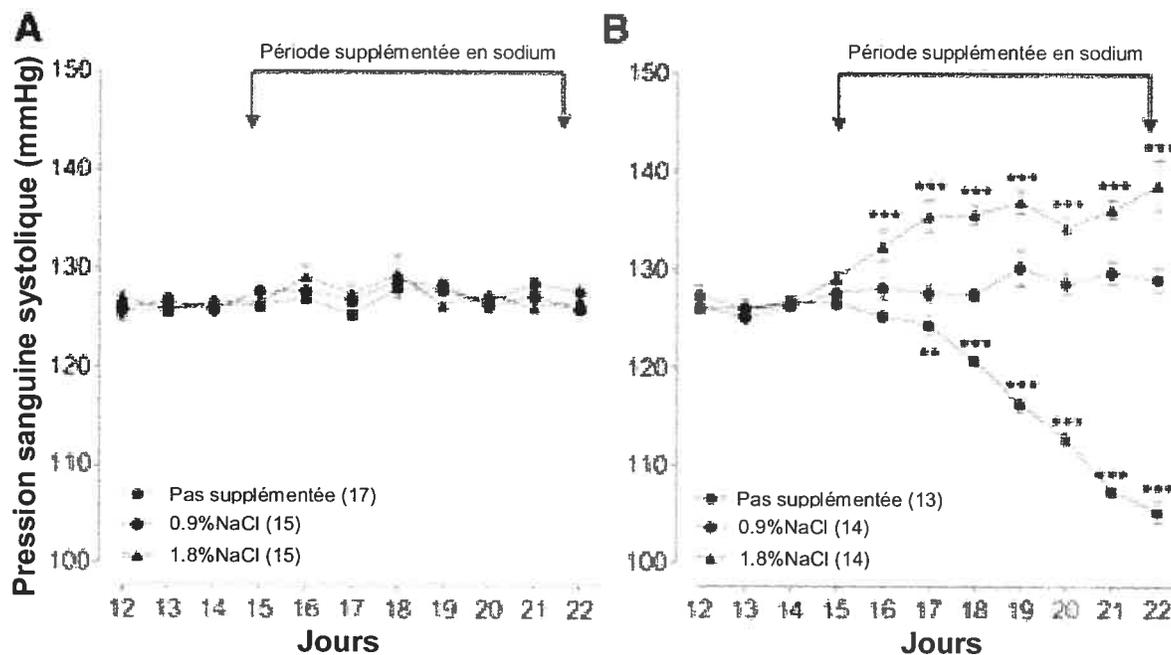


Figure 7 : Effet d'une diète supplémentée en sodium (0.9% et 1.8% NaCl) sur la pression artérielle systolique des rates non gestantes (A) et gestantes (B). Les flèches indiquent la période de traitement. Les nombres entre parenthèses désignent le nombre de rats utilisés dans chaque groupe. Les points représentent les moyennes avec l'erreur standard. $**P < 0.01$ et $P < 0.001$ en comparaison avec la période de prétraitement. (Adapté de Beauséjour et al) (15)

battement cardiaque (129). En reprenant leur forme, les artères élastiques favorisent la propulsion du sang lors de la diastole (129; 145; 244). Afin de prévenir un trop grand étirement des vaisseaux, on retrouve aussi du collagène, une autre protéine extracellulaire mais qui est 100 fois plus rigide que l'élastine (129). Les artères de conductance, aussi appelées artères musculaires, portent leur nom car leur tunique moyenne est composée principalement de muscle lisse et d'une plus faible proportion de fibres élastiques. Leur grande capacité de vasoconstriction et vasodilatation leur permet de contrôler la vitesse de l'écoulement sanguin (145; 244). Les vaisseaux de résistance agissent comme régulateurs du flot vers les capillaires (129). Leurs tuniques sont donc plus épaisses lorsqu'elles sont plus près des artères musculaires et s'amincissent pour devenir un anneau de cellules endothéliales entouré de quelques fibres musculaires lisses éparses lorsqu'on approche des capillaires. Ces derniers constitués d'une simple couche d'endothélium et d'une membrane basale permettent les échanges gazeux et de métabolites (145; 244). Finalement, les vaisseaux de capacitance sont les vaisseaux veineux qui agissent comme réservoirs de sang. En effet, puisque les veines sont plus nombreuses que les artères et que leur lumière est plus grande, elles contiennent environ deux tiers du volume circulant (129). Elles possèdent les mêmes trois couches que les artères mais dans des proportions différentes. Les tuniques interne et moyenne sont beaucoup plus minces tandis que la tunique externe est plus épaisse, renfermant plus de fibres de collagène et d'élastine (145; 244). Ces différences n'empêchent toutefois pas un contrôle actif du volume qui est bien assuré par les mécanismes de vasodilatation et vasoconstriction (129; 145; 244). (Fig. 8)

Si l'on se consacre plus précisément à la structure du myocyte vasculaire (Fig. 9), on constate que trois structures sont particulièrement importantes pour la contraction de la cellule : les unités contractiles, les réserves de calcium et les jonctions intercellulaires. Les unités contractiles sont composées de filaments d'actine et de myosine qui sont regroupés en bandes denses sur la surface interne de la cellule ou en corps denses dans le cytoplasme. Des filaments intermédiaires, composés des protéines desmine et vimentine, agissent comme cytosquelette en reliant toutes les zones denses ce qui permet à la cellule de se contracter en une seule unité. Le réticulum endoplasmique des muscles lisses vasculaires, le réticulum sarcoplasmique, contient les réserves de calcium intracellulaire. Malheureusement, le réticulum n'est pas très développé, représentant seulement 1 à 4 % du volume cellulaire, ce qui rend les réserves d'ions calcium faibles et fait dépendre les

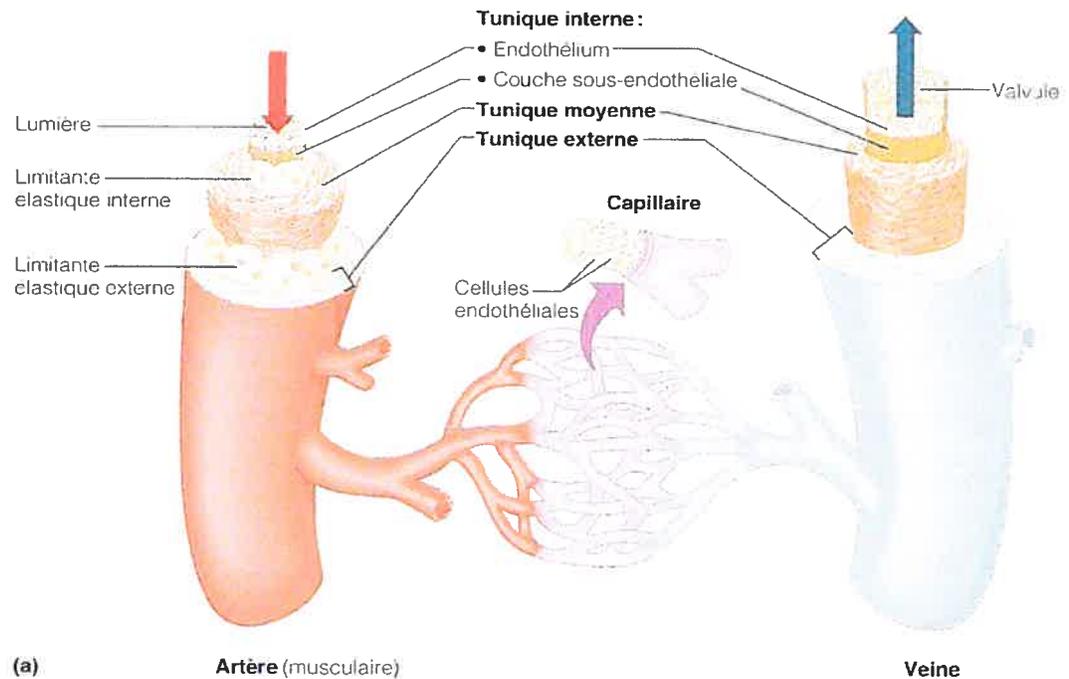


Figure 8 : Structure des artères, des veines et des capillaires. Les parois des artères et des veines sont composées de trois tuniques (interne, moyenne et externe). Les capillaires, qui forment un réseau intermédiaire entre les artères et les veines pour assurer l'apport de nutriments et d'oxygène à toutes les cellules, ne sont composés que d'un endothélium et d'une lame basale. (Tiré de Marieb) (145)

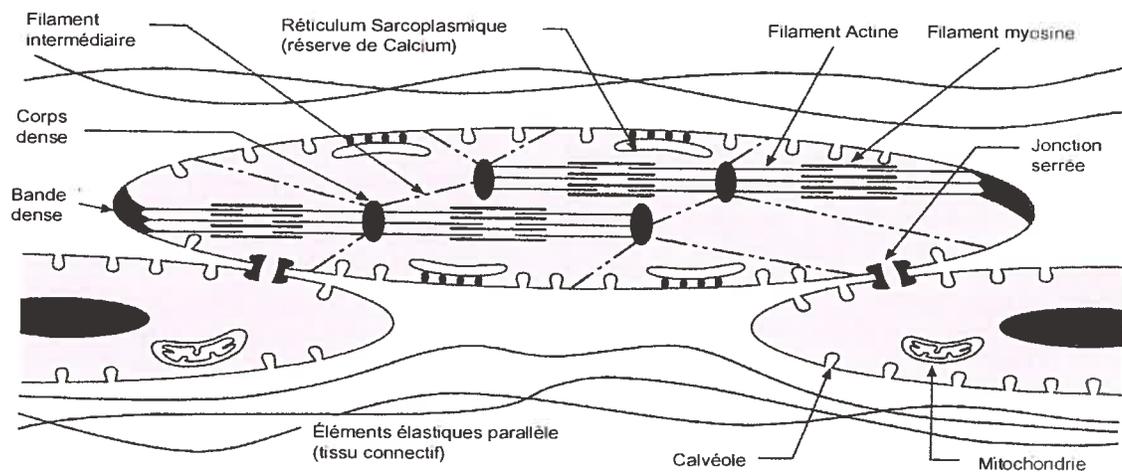


Figure 9 : Structure d'un myocyte vasculaire basée sur la micrographie électronique. Les unités contractiles (filaments d'actine, de myosine et les filaments intermédiaires), les réserves de calcium et les jonctions intercellulaires sont les éléments importants pour la contraction de la cellule. (Adapté de Levick) (128)

muscles lisses de l'entrée de calcium extracellulaire pour la contraction, et ce particulièrement dans les artères de résistance. Pour favoriser la contraction, les myocytes sont reliés entre eux par des jonctions serrées qui 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 (128). Maintenant que les composantes structurales principalement responsables de la contraction et de la relaxation des vaisseaux ont été déterminées, nous allons en définir les mécanismes.

2.2. La contraction

Les artères sont continuellement dans un état de contraction partiel qu'on appelle le tonus vasculaire. Ce sont les mécanismes qui augmentent (vasoconstriction) ou diminuent (vasodilatation) ce tonus de base qui affectent le débit sanguin dans leur segment donné de la vasculature. C'est aussi ce tonus que nous tentons d'évaluer en mesurant la réactivité vasculaire. La contraction peut être engendrée par des augmentations de l'activité des nerfs vasomoteurs sympathiques, des hormones circulantes et des substances paracrines. Tous ces mécanismes visent à faire augmenter la concentration de calcium intracellulaire pour induire la contraction. Cette concentration est déterminée par la balance de trois procédés : l'entrée de calcium via les VDCC et/ou les canaux opérés par récepteur (ROC; receptor-operated channel); la relâche des réserves du réticulum sarcoplasmique et le retrait du calcium par les pompes Ca^{2+} -ATPase.

La contraction du muscle lisse se fait en deux phases. La phase d'activation initiale dure de 30 à 60 secondes et commence par la liaison d'un agoniste à son récepteur. Celle-ci entraîne l'augmentation de calcium cytosolique qui sera lié à la calmoduline. Le complexe Ca^{2+} -calmoduline va ensuite activer la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK; myosin light chain kinase) qui a pour rôle de phosphoryler les chaînes de myosine. Celles-ci se lieront par la suite aux filaments d'actines pour engendrer la contraction de la cellule. La deuxième phase consiste à maintenir la contraction malgré que les niveaux de calcium diminuent. Pour ce faire, des mécanismes de sensibilisation au calcium des filaments sont engendrés par des kinases. La principale responsable de cette

sensibilisation est la rhoA kinase qui inhibe la phosphatase des chaînes légères de myosine, une enzyme qui entraîne une dissociation de l'actine et de la myosine en déphosphorylant cette dernière. La protéine kinase C- α , est également impliquée dans la sensibilisation puisqu'elle active la protéine CPI-17, qui inactive également la phosphatase des chaînes légères de myosine. Finalement, d'autres évidences démontrent que certaines protéines kinases induisent une phosphorylation de la caldesmone, une protéine régulatrice des filaments d'actine, ce qui réduit ces 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 (128).

2.3. La relaxation

La vasodilatation consiste en une réduction du tonus contractile. La relaxation peut être produite par trois routes différentes qui convergent toutes 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. La deuxième voie correspond à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase, suite à la liaison d'un agoniste vasodilatateur (adrénaline, prostacycline, histamine,...) sur un récepteur couplé à une protéine G, qui entraîne une augmentation de l'AMPc. Cette dernière active la protéine kinase A (PKA) qui cause une relaxation vasculaire en phosphorylant divers éléments de la cellule. Par exemple, elle agit sur le phospholamban, un régulateur de la pompe Ca^{2+} -ATPase, pour que celle-ci expulse à l'extérieur de la cellule et séquestre dans les réticulums sarcoplasmique plus de calcium. La PKA induit également une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux potassiques (K_{ATP} et BK_{Ca}), ce qui induit une hyperpolarisation et une diminution de la probabilité d'ouverture des VDCC. De plus, elle induit une phosphorylation des MLCK, ce qui les inhibe et réduit la sensibilité au calcium. Finalement, la dernière voie consiste en une augmentation du GMPc, souvent induite par le NO ou l'ANP. Le GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui va, à son tour, induire une phosphorylation du phospholamban et diminuer la sensibilité au calcium. Tous ces mécanismes entraînent la relaxation des muscles lisses vasculaires (128).

2.4. Les canaux ioniques

Lorsque les niveaux de calcium intracellulaire augmentent, on observe une contraction tandis que lorsqu'ils diminuent, on voit une relaxation. Un des facteurs primordiaux dans la régulation de l'ouverture des canaux ioniques est le potentiel de membrane. Celui-ci se maintient aux alentours de -50mV à -60mV dans les vaisseaux artériels pressurisés (152). Pour arriver à contrôler son potentiel, la cellule dépend de plusieurs canaux ioniques, pompes, échangeurs et co-transporteurs comme le montre la figure 10 (128). Nous allons donc en étudier quelques-uns plus en détail.

2.4.1. Les canaux calciques

2.4.1.1. Les canaux calciques dépendant du voltage (VDCC)

2.4.1.1.1. La structure

Les VDCC sont exprimés par trois grandes familles de gènes : Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3 . Six types de canaux (L, T, R, N, P/Q), classés selon leur type de courant, sont exprimés. Toutefois, dans les vaisseaux on ne retrouve que les types L (pour « long-lasting » ou large conductance) (25 pS) et T (pour « transcient » ou « tiny ») (8pS) (196; 246). Les différents types de VDCC ont une structure moléculaire similaire et ce sont les différentes isoformes des sous-unités qui les différencient. Ils sont composés de cinq sous-unités : $\alpha1$, $\beta1$, $\alpha2/\delta$ et $\gamma1$ (Fig. 11). La sous-unité $\alpha1$ est une protéine de 190kDa, qui forme le pore pour l'entrée des ions. Elle est composée de quatre domaines (Fig. 11B) qui sont constitués de six segments transmembranaires (S1-S6) et d'une boucle associée à la membrane entre S5 et S6 (Fig. 11A). Le segment S4 détecte les changements de voltage qui entraînent l'activation du canal et le S6 forme le site pour les antagonistes spécifiques aux canaux de type L. La sous-unité $\beta1$, quant à elle, est une protéine de 55 kDa intracellulaire qui est composée d'hélices alpha tandis que $\alpha2/\delta$ est un dimère de 170 kDa lié par des ponts disulfures, la région δ étant transmembranaire et $\alpha2$ extracellulaire (Fig. 11). Finalement, la sous-unité γ , de 33 kDa, est une glycoprotéine à quatre segments transmembranaires (35) (Fig. 11). Du point de vue fonctionnel, les sous-unités β et $\alpha2/\delta$ sont impliqués dans l'expression et le transport de $\alpha1$ à la membrane ainsi que dans la modulation de la cinétique du canal. Le rôle de γ est assez peu documenté (10; 35; 120).

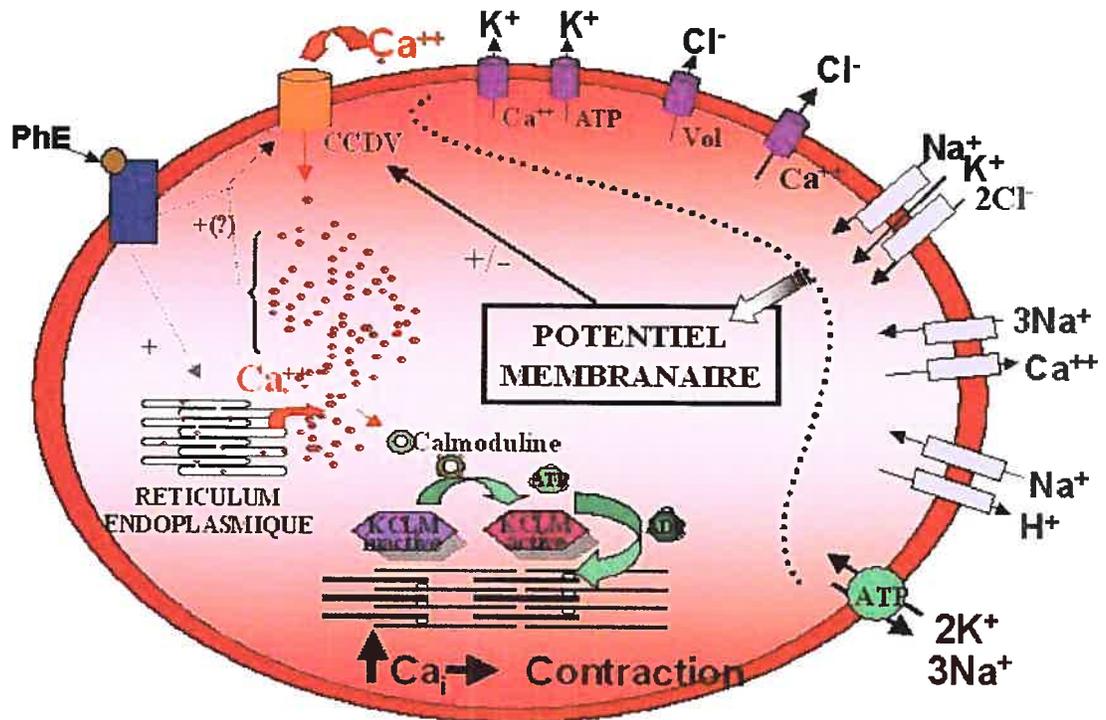


Figure 10 : Schématisation d'un myocyte vasculaire avec les canaux ioniques, pompes ioniques et échangeurs à la surface membranaire. Ces derniers contrôlent le potentiel de membrane qui influence la libération de calcium dans le cytosol. L'augmentation de calcium est responsable de la contraction de la cellule. (Empruntée de Poterek et St-Louis avec permission)

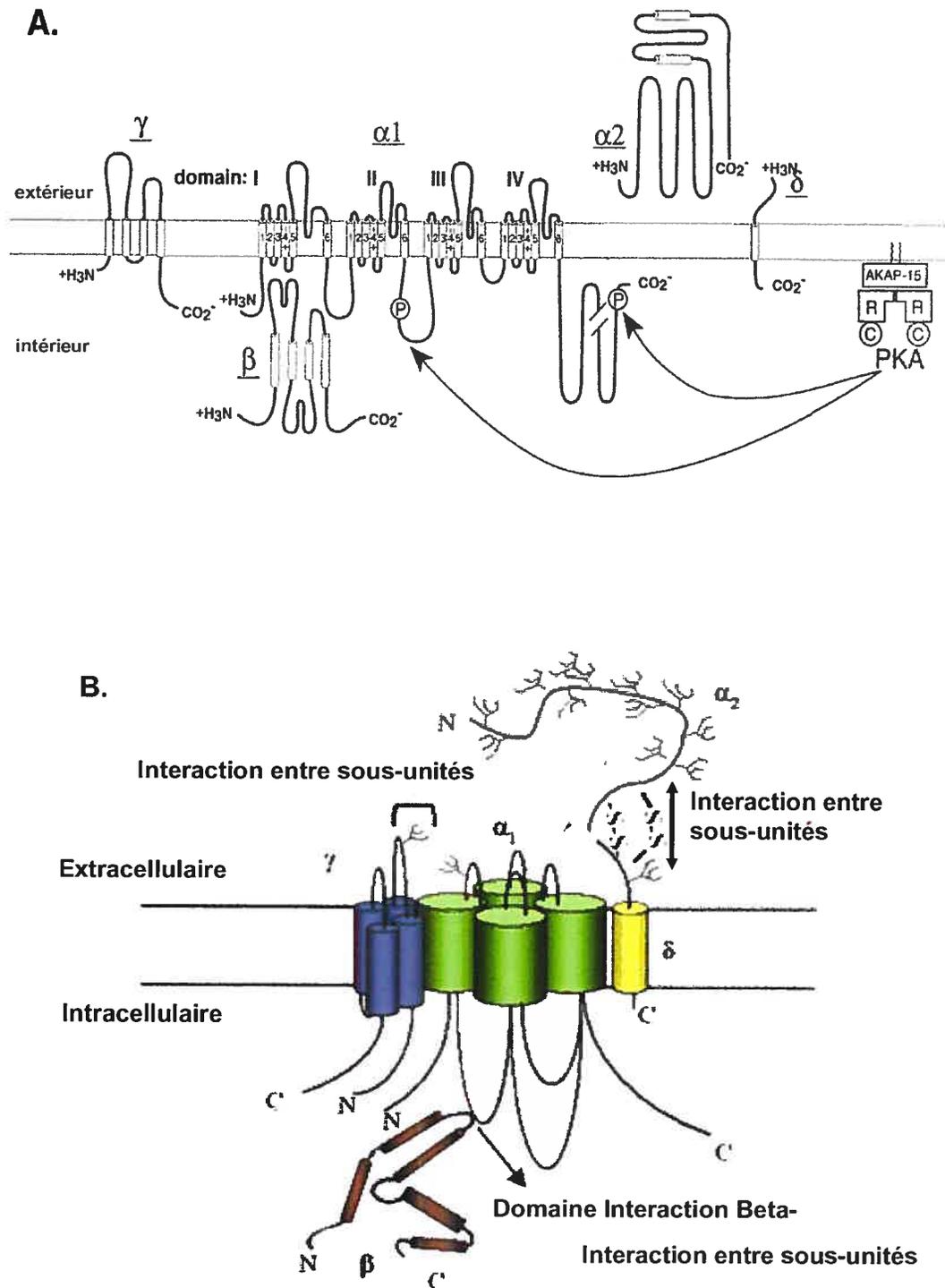


Figure 11 : Structure des VDCC. A) Schématisation de la composition des sous-unités (Adapté de Catterall) (35) B) Modèle 3D d'interactions entre les sous-unités des VDCC. (Adapté de Arikath) (10)

2.4.1.1.2. La régulation

On retrouve les canaux 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 (247). Les canaux calciques de type T sont activés à des potentiels de membrane plus négatifs que ceux de type L (-60 mV vs -40mV). De plus, leur courant atteint son maximum au environ de -30mV tandis que ceux des canaux de type L vont jusqu'à +10 ou +15 mV. Ils sont par la suite inactivés beaucoup plus lentement que les canaux de type L (1-10 msec vs <0.5msec) (246). 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 les débalancements des gradients de calcium, 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 (232). Il n'est donc pas surprenant de constater que les VDCC peuvent être inactivés par plusieurs procédés. Par exemple, on note que les canaux de type L subissent une inactivation plus rapide en réponse à l'augmentation des concentrations calciques intracellulaires (178) tandis que les canaux de type T ne sont pas sensibles aux concentrations de calcium mais ils sont inactivés par une dépolarisation prolongée de la membrane (232). De plus, certains bloqueurs des VDCC ont plus d'affinité pour les canaux en phase inactive (232). Nous allons donc voir de façon plus approfondie les différents antagonistes.

2.4.1.1.3. Les bloqueurs

Une percée dans le traitement des maladies cardiovasculaire est arrivée avec 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 (112). Depuis, trois grandes classes d'antagonistes sont connues : les phenylalkylamines (verapamil), les benzothiazepines (diltiazem) et les dihydropyridines (DHP) (nifedipine). Tous les bloqueurs de VDCC se lient à la sous-unité α_1 du canal (112; 196). Les phenylalkylamines se lient au segment 6 du domaine 4 tandis que les benzothiazepines

reconnaissent un site de liaison sur la boucle cytoplasmique entre les domaines 3 et 4 et finalement les DHP s'attachent aux segments transmembranaires 6 des domaines 3 et 4. Bien que les trois bloqueurs lient des sites différents, ils sont toutefois joints allostériquement et leur liaison est stéréospécifique et réversible. Les DHP sont des vasodilatateurs plus puissants, autant *in vitro* qu'*in vivo*, que le verapamil qui est elle-même plus puissante que le diltiazem (112). Les DHP ne sont pas équivalents en termes de puissance et de nature des effets. Cela peut être dû aux différences structurales des multiples isoformes des canaux. Une autre possibilité inclut que les DHP ciblent d'autres canaux que ceux reconnus comme sensibles aux DHP, les canaux de type L. En effet, il a été reporté que les canaux de type T des cellules artérielles sont également sensibles aux DHP (167; 196). Cela pourrait expliquer que la nifédipine induit une dilatation artérielle à des doses qui ne sont pas suffisamment élevées pour avoir des effets significatifs sur le cœur. Cela explique que donnée *in vivo*, la nifédipine diminue 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. Tout cela en fait un bon traitement pour l'hypertension (112).

2.4.1.2. Les canaux calciques indépendants du voltage

Les canaux cationiques non sélectifs qui sont perméables au calcium ont soulevé un grand intérêt récemment puisqu'ils sont impliqués dans la régulation de la contractilité vasculaire. L'entrée calcique produite en présence d'un agoniste constricteur est similaire à celle observée dans les cellules non excitables, i.e. qu'elle est constituée d'une augmentation du calcium intracellulaire rapide mais transitoire, suivie d'une augmentation qui est plus petite mais soutenue, dépendante du calcium extracellulaire. Cet influx jumelé au phénomène de sensibilisation au calcium permet d'activer la contraction à des niveaux faibles de calcium intracellulaire et de maintenir un tonus sur une grande période de temps en présence d'agoniste (149). Bien que l'activation de ces canaux se fait de façon indépendante du voltage, il ne faut pas négliger l'interaction avec les VDCC puisque la dépolarisation produite par l'entrée de calcium peut occasionner l'ouverture de ceux-ci (4; 149). Contrairement aux VDCC, peu d'information est connue sur les courants ioniques de ces canaux. Les données qu'on possède suggèrent une conductance d'environ 25 pS à des potentiels membranaires près du potentiel de repos et dans des conditions ioniques

physiologiques. De plus, des expériences de « patch-clamp » sur cellule entière ont démontré que ces courants pouvaient être augmentés par plusieurs voies de signalisation intracellulaire (149). Les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la régulation de ces canaux ne sont pas encore complètement déterminés et sont le sujet de plusieurs investigations. On sait toutefois qu'ils sont contrôlés par des voies de transduction classiques où le diacylglycérol a un rôle primordial dans la régulation de l'activité des canaux via des mécanismes PKC indépendants et dépendants. De plus, la production de diacylglycérol provient de plusieurs cascades de signalisation différentes (4). Pour l'instant, les canaux calciques indépendants du voltage sont divisés en quatre grandes classes selon leurs stimuli physiologiques principaux. On retrouve les canaux opérés par un récepteur (ROC; receptor-operated channels) qui sont activés par des vasoconstricteurs tel la noradrénaline (4; 124; 149), les canaux opérés par les réserves de calcium (SOC; store-operated channels) qui sont activés par la déplétion des réserves internes de calcium (4; 5; 149), les canaux cationiques constitutivement actifs (CCC; constitutively active cation channels) qui contribuent au potentiel membranaire de repos et à l'influx basal de calcium (4; 6), et les canaux activés par l'étirement (SAC; stretch-activated channels) qui contribuent à la vasoconstriction myogénique (4; 211).

Plusieurs études récentes démontrent que ces canaux sont formés de protéines de la famille TRPC (transient receptor potential-canonical), protéines à 6 domaines transmembranaires avec une région pore entre les domaines 5 et 6 et dont les N- et C-terminaux sont du côté cytoplasmique (4; 149; 250). À ce jour, on connaît sept membres dans cette famille (TRPC1 à TRPC7) mais le rôle précis de chacun n'est pas encore complètement déterminé (250). Des études montrent que les protéines similaires à TRCP6 seraient responsables de la formation des ROC (4; 98; 106) tandis que les SOC seraient composés de TRPC1 dans les muscles lisses vasculaires (4; 259). Il est également connu que les CCC appartiennent à la sous-famille TRCP3, 6 et 7 et il est suggéré que c'est le TRCP3 qui serait responsable de la formation de ce canal au niveau des vaisseaux (4). Finalement, les SAC seraient composés de TRPC6 (4; 257) mais d'autres études suggèrent également la participation de TRPC1 (4; 146), TRPM4 (4; 56) et TRPV2 (4; 164). Toutes les protéines TRPC possèdent plusieurs motifs d'interaction protéine-protéine qui permettent leur régulation. Il est connu que plusieurs d'entre elles sont activées par une liaison avec IP_3 ou DAG (250). Bien que beaucoup reste à faire dans la caractérisation de

ces canaux, les connaissances actuelles nous permettent de mieux comprendre l'implication des canaux ioniques dans les mécanismes de contraction vasculaire.

2.4.2. Les canaux potassiques

Les myocytes vasculaires expriment environ 50 000 canaux K^+ parmi lesquels une fraction est ouverte à tout moment (128). Leur activité est donc primordiale dans le contrôle du potentiel de membrane. Les variations de potentiel membranaire sont responsables de l'ouverture et/ou de la fermeture des canaux ioniques qui contrôle l'entrée de calcium extracellulaire et la relâche de calcium intracellulaire ainsi que la force contractile des cellules musculaires lisses. L'activité des canaux K^+ est donc directement liée au tonus contractile des cellules et donc aussi à la régulation de la résistance vasculaire, du débit sanguin et de pression artérielle (102; 231). Les cellules des muscles lisses vasculaires expriment quatre types de canaux potassiques que nous allons voir plus en détails.

2.4.2.1. 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 comprend six segments transmembranaires encodés par les gènes de la famille Kv (Fig. 12). Ces sous-unités sont jumelées à des sous-unités β pour former un canal fonctionnel et bien contrôlé (231; 242). Les Kv sont activés par la dépolarisation de la membrane lorsque celle-ci atteint un potentiel d'environ -30 mV (101). La relation entre l'ouverture du canal et le potentiel de membrane augmente exponentiellement jusqu'à ce que la valeur limite soit atteinte. Le courant qui passe dans ces canaux se classe selon deux types de conductance dans des conditions de gradients de potassium physiologiques : petite conductance ($\approx 5-8$ pS) et une plus grande conductance à canal unique (≈ 60 pS) (166). Ils sont inactivés par une dépolarisation soutenue mais la vitesse d'inactivation dépend du type de canal. Certains sont inactivés très lentement, les canaux « delayed rectifier », produisant un courant sortant de K^+ soutenu tandis que d'autres sont inactivés rapidement ce qui occasionne des courants transitoires. Plusieurs études montrent que dans les muscles lisses vasculaires plusieurs types de Kv sont exprimés (231). Les Kv participent à la régulation du potentiel de repos et au maintien du tonus vasculaire. Ils sont

aussi impliqués dans la réponse des vasoconstricteurs et des vasodilatateurs : les vasodilatateurs qui agissent via la cascade de signalisation de l'AMPc, ouvrent ces canaux (3; 101) tandis que les vasoconstricteurs les ferment par des mécanismes qui impliquent une augmentation du calcium intracellulaire (44; 101) et des PKC (2; 101). Ces canaux peuvent également être inhibés par des agents pharmacologiques tels le 4-aminopyridine (101; 166), le correolide et l'agitotoxin-2 (38; 39).

2.4.2.2. Les canaux à rectification rentrante (K_{IR})

Les K_{IR} sont des tétramères de sous-unités qui ne possèdent que deux segments transmembranaires (Fig. 12) (231). Ceux-ci sont encodés par les gènes de la famille K_{IR} et l'isoforme exprimé dans les muscles lisses est le K_{IR} 2.1 (28; 231). La présence de courants entrants n'a toutefois été décrite que dans les muscles lisses des artères et artérioles et ces canaux seraient préférentiellement exprimés dans les petites artères plutôt que les grosses (231). Les K_{IR} sont activés par une hyperpolarisation et une augmentation des concentrations de K^+ extracellulaire et laissent entrer les ions K^+ dans la cellule. Cependant, quand le potentiel est plus positif que celui de repos, les canaux laissent sortir le K^+ mais de façon limitée (102; 166; 191). Une augmentation modérée de K^+ extracellulaire (comme celle qui se produit lorsqu'un muscle est en exercice) cause une hyperpolarisation et une vasodilatation tandis que des doses pharmacologiques plus élevées dépolarisent les myocytes et entraînent une contraction (128). D'autres facteurs qui activeraient les K_{IR} ont été suggérés. Parmi ceux-là on retrouve la bradikinine (197), et le NO (210). Quant au barium, il agit comme bloqueur des K_{IR} (102; 191).

2.4.2.3. Les canaux potassiques activés par le calcium

Les canaux dominants dans les muscles lisses vasculaires sont ceux de large conductance (Big), les BK_{Ca} , qui ont une conductance d'environ 250 pS (102; 166). Ils sont composés de sous-unités α , encodés par le gène Slo, qui forment le pore du canal. Chacune des sous-unités contient 11 domaines hydrophobiques dont les 7 premiers (S0-S6) forment la région transmembranaire et les 4 derniers forment la queue cytoplasmique (figure 12). De façon similaire aux canaux calciques dépendants du voltage, mentionnés précédemment, le segment transmembranaire S4 représente la région sensible au voltage et l'on retrouve en plus une région sensible au Ca^{2+} dans la section cytosolique de la

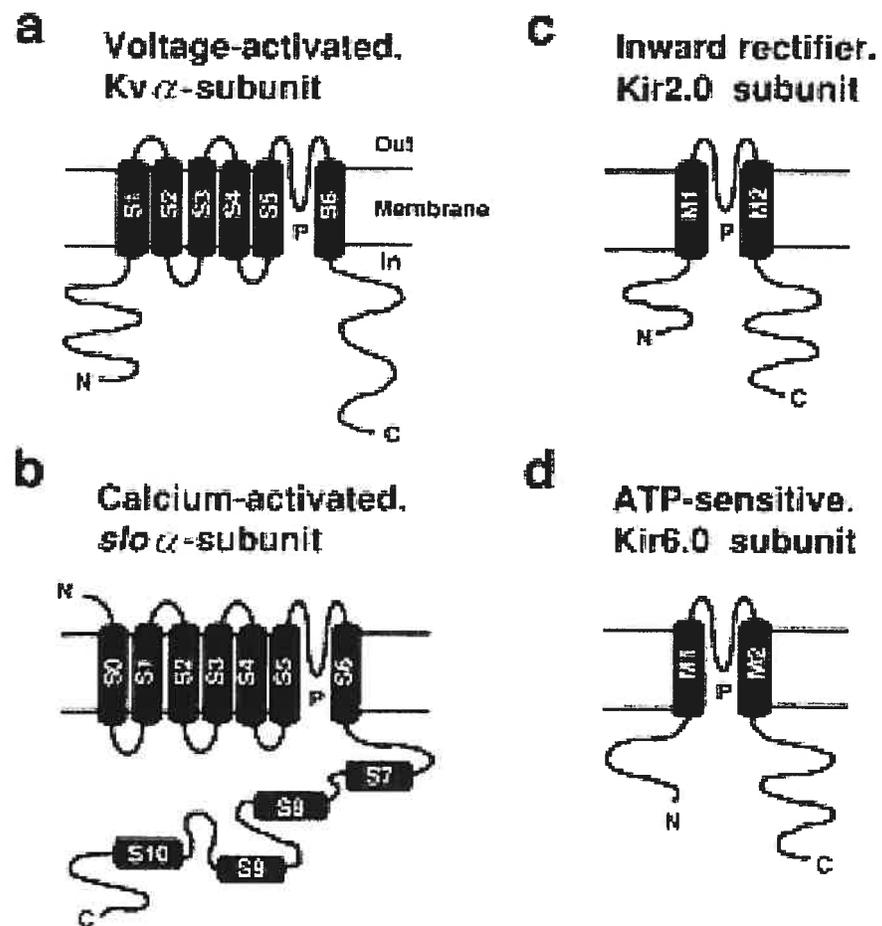


Figure 12 : Topologie transmembranaire proposée pour les sous-unités formant les pores des canaux potassiques dans les muscles lisses. a) Canaux activés par le voltage (Kv), b) canaux activé par le calcium (BK_{Ca}), c) Canaux à rectification entrante (K_{IR}), d) Canaux sensibles à l'ATP. (Adapté de Standen et Quayle) (231)

protéine. Pour être complet, le tétramère de sous-unités α est accompagné de sous-unités β qui sont composées de 2 segments transmembranaires et d'un long segment extracellulaire et qui modulent le canal en augmentant sa sensibilité au voltage et au calcium (14; 118; 231). Ces canaux sont activés par la dépolarisation des membranes et par les augmentations de calcium intracellulaire et ont pour fonction le contrôle de l'excitation électrique des myocytes (101; 128; 166; 231). Ils jouent un rôle important dans la régulation du tonus myogène en balançant, avec l'efflux de K^+ suivant leur ouverture, la dépolarisation et la constriction induites par la pression et les vasoconstricteurs (166). Plusieurs facteurs modulent leur probabilité d'ouverture. Ils peuvent être phosphorylés par plusieurs kinases, incluant PKA, PKG-I et PKC, ce qui entraîne des modulations de leur sensibilité au voltage et au calcium (212). Dans la majorité des cas, PKA et PKG-I activent les BK_{Ca} en augmentant leur probabilité d'ouverture (7; 155). De l'autre côté, la phosphorylation par PKC inhibe les BK_{Ca} dans les muscles lisses (126; 213). Plusieurs agents pharmacologiques sont également impliqués dans la régulation de ces canaux. Parmi les bloqueurs on retrouve le tetraethylammonium (126; 231), des toxines de scorpions tel que la charybdotoxin (154) et l'ibériotoxine (75) et des indoles comme le penitrem A et la paxilline (119). Des activateurs sont également disponibles. Parmi ceux-là, le NS-1619 (166; 173), que nous allons utiliser dans la présente étude, et les oestrogènes qui, à fortes concentrations, se lient à la sous-unité β pour réguler l'expression et la fonction du canal (122; 249). Plusieurs vasodilatateurs comme le NO, le monoxyde de carbone et les époxydes de l'acide arachidonique seraient également responsable de l'activation des BK_{Ca} (102).

2.4.2.4. Les canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP})

Les K_{ATP} sont des hétéro-octamères de quatre sous-unités, n'ayant que deux passages transmembranaires (Fig. 12), encodées par les gènes de la famille Kir 6.0, qui forment un pore avec quatre sous-unités de récepteurs sulphonylurées appartenant à la famille de protéines des cassettes de liaison à l'ATP (102; 231). Il existe une grande diversité dans la conductance de ces canaux et on peut les classifier en deux groupes : les petites à immédiates conductances (15-50 pS) et les larges conductances (130 pS) (166). Ces canaux se ferment avec les augmentations d'ATP intracellulaire, ce qui leur confère leur nom (101; 102; 128; 191; 231). Toutefois, dans les muscles lisses, les niveaux d'ATP

sont très bien contrôlés, diminuant seulement dans des conditions métaboliques sévères (128; 231). La liaison de l'ATP aux canaux peut donc être vue comme un médiateur de la probabilité d'ouverture des canaux, auquel d'autres facteurs répondent pour contrôler l'activité du canal (231). Ils sont également modulés par des signaux intracellulaires comme l'ADP, les H^+ et le Ca^{2+} (191). Les K_{ATP} sont aussi impliqués dans les mécanismes d'action des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs. Plusieurs études ont démontré qu'ils peuvent être activés par les PKA et les protéines kinases dépendantes du GMPc et ils sont donc impliqués dans les vasodilatations induites par l'adénosine (48; 103), le PGI_2 (103), le CGRP (166) et le NO (166). De façon contraire, l'activation des PKC (166) et l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (258) par des vasoconstricteurs comme la norépinéphrine (102), la vasopressine (251), l'endothéline (158) et l'angiotensine II (157) ferment les K_{ATP} . Plusieurs agents pharmacologiques sont également utilisés pour étudier les fonctions de ces canaux tel que la glibenclamide, un bloqueur qui induit une dépolarisation partielle et une vasoconstriction, ainsi que la cromakalim et la pinacidil, des activateurs qui engendrent une hyperpolarisation et une vasodilatation (101; 102; 128; 166; 191).

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. Dans la présente étude, nous avons utilisé le NS-1619 et la cromakalim pour évaluer l'implication des BK_{Ca} et des K_{ATP} dans la réactivité vasculaire de l'aorte de nos modèles. Toutefois, comme la majorité des canaux potassiques font sortir le K^+ des cellules, un autre élément est nécessaire au contrôle du potentiel de membrane. C'est la Na^+/K^+ -ATPase qui est responsable de rétablir les concentrations intracellulaires de K^+ . Nous allons maintenant examiner plus en détail cette pompe électrogénique.

2.4.3. La pompe à sodium (Na^+/K^+ -ATPase)

2.4.3.1. La structure

La Na^+/K^+ -ATPase fait partie de la famille des ATPases de type P, des enzymes qui deviennent autophosphorylé par le phosphate gamma de la molécule d'ATP qu'ils hydrolysent (109; 138; 208). La Na^+/K^+ -ATPase et sa cousine la H^+/K^+ -ATPase gastrique

sont les seuls membres de la famille à être composé de plus d'une sous-unité (109; 208). Ces protéines hétérodimériques sont constituées d'une sous-unité α et une β dans un rapport stoechiométrique de 1 :1. La sous-unité α , qui a la fonction catalytique, est une protéine d'environ 110 kDa. Elle traverse la membrane cellulaire 10 fois au niveau des domaines transmembranaires M1-M10 qui participent à la formation du canal par lequel les ions traversent la membrane (109; 134; 138; 208); les domaines N- et C-terminaux sont tous les deux du côté cytoplasmique ce qui forme un large domaine cytoplasmique (8; 109; 138; 208). Plusieurs études ont démontré que les sites de liaison de l'ATP et des ions se trouvaient dans cette sous-unité (109; 134; 138; 208; 219). Il existe au moins quatre isoformes de la sous-unité α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) et chacune a une distribution tissulaire spécifique (109; 138; 208; 219). $\alpha 1$ est la plus répandue ce qui lui suggère un rôle général de maintien des concentrations cellulaires de Na^+ et K^+ , d'où son nom de « housekeeping ». Les autres isoformes ont une localisation plus spécifique pour certains tissus et sont sujets à plus de changements développementaux; ce qui suggère qu'ils ont des rôles plus spécifiques (109; 219). Par exemple, dans les cellules des muscles lisses vasculaires, on retrouve principalement $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La première sous-unité est reconnue pour sa fonction de « housekeeping » tandis que $\alpha 2$ est associée plus particulièrement aux voies de contraction-relaxation (219). De plus, des études démontrent que dans les muscles lisses vasculaires, il existerait une forme tronquée de $\alpha 1$ qui augmenterait les niveaux de complexité de la régulation de l'expression et du transport d'ions par la Na^+/K^+ -ATPase (151). La régulation de la sous-unité α se fait également en partie par la sous-unité β . C'est une protéine membranaire de type II, c'est-à-dire avec un seul segment transmembranaire, d'environ 55 kDa. Un petit segment N-terminal est situé dans le cytoplasme tandis que la plus grande partie de la protéine est située du côté extracellulaire (109; 138; 159; 208). Dans cette partie on retrouve trois ponts disulfures, nécessaire à l'activité de l'enzyme (117; 141), 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 (17; 263). Des acides aminés près de la région C-terminal de même que le segment transmembranaire sont responsables de la liaison avec la sous-unité α (16; 127). Cette liaison avec la sous-unité α est responsable du transport de la protéine du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (76). 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 la ouabaïne (208). Il existe aussi plusieurs isoformes de cette sous-unité ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) (138; 208) ce qui augmente la variété des isoenzymes de la Na^+/K^+ -ATPase, résultant en plusieurs protéines qui ont des propriétés cinétiques différentes (22) et qui sont distribués selon différents patrons à travers les tissus ou même à l'intérieur d'un même tissu (159).

2.4.3.2. 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 ou la ouabaïne. La figure 13 montre les différentes étapes du mécanisme catalytique de la pompe. La première étape de la réaction est la liaison du Na^+ et de l'ATP, avec une grande affinité, à la conformation E1 (Fig 12, étape 1). En même temps l'enzyme est phosphorylée via le transfert d'un phosphate γ de l'ATP, une étape qui nécessite du Mg^{2+} (Fig 12, étape 2). Puis les trois ions Na^+ sont séquestrés bien que l'enzyme demeure phosphorylée. Cela amène à la formation E2-P3Na^+ et l'enzyme perd de l'affinité pour le Na^+ et en gagne pour K^+ . Il y a donc libération des ions Na^+ du côté extracellulaire (Fig 12, étape 3) et liaison des ions K^+ (Fig 12, étape 4). La liaison du K^+ entraîne une déphosphorylation spontanée de la conformation E2-P, ce qui induit la séquestration des ions K^+ et forme la conformation $\text{E2}(2\text{K}^+)$ (Fig 12, étape 5). La liaison de l'ATP intracellulaire entraîne la relâche de K^+ à l'intérieur de la cellule et le retour à la conformation E1ATPNa (Fig 12, étape 6). Ce qui complète le cycle catalytique de la Na^+/K^+ -ATPase (82; 109; 208). On réfère souvent à ce modèle sous le nom du schéma Albers-Post (82). 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. Toutefois, les preuves ne sont pas suffisamment imposantes pour démontrer l'existence de deux sites de liaison de l'ATP et ne permet pas l'établissement du diprotomère $(\alpha\beta)_2$ comme unité de base fonctionnelle de la Na^+/K^+ -ATPase (208). En attendant des preuves suffisantes pour pouvoir conclure au mécanisme catalytique exact de la Na^+/K^+ -ATPase, nous allons nous tourner vers les mécanismes qui régulent son activité.

2.4.3.3. La régulation de la Na^+/K^+ -ATPase

En plus de la sous-unité β qui module l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, les protéines de la famille FXYD interagissent avec la pompe pour modifier ses propriétés de transport d'une manière spécifique au tissu et à l'isoforme (51). Ce sont des petites protéines membranaires caractérisées par une signature contenant le motif FXYD, deux glycines et une sérine conservées (234). Chez les mammifères, sept membres sont connus dont six interagissent avec la Na^+/K^+ -ATPase et modulent sa fonction. Parmi ces protéines on retrouve la sous-unité γ (FXYD2), un facteur régulateur de la pompe souvent mentionné par la littérature (51). En plus de la régulation par les interactions des différentes protéines avec la Na^+/K^+ -ATPase, il existe également 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. Parmi les hormones qui affectent l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, celles pour qui les effets sont les mieux compris incluent les catécholamines, les hormones peptidiques et les hormones stéroïdes (240). Parmi ces dernières, la plus étudiée est certainement l'aldostérone. Elle a des effets régulateurs à long et court termes sur la Na^+/K^+ -ATPase. À long terme, elle entraîne une augmentation de l'expression de la protéine dans plusieurs tissus incluant les cellules des muscles lisses vasculaires (172; 240). Tandis qu'à court terme, les effets sont contrôlés par des récepteurs spécifiques liés à la membrane (255) qui induisent une augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase (240). Parmi les hormones qui induisent une activation de la pompe on retrouve également l'adrénaline et la noradrénaline (9; 252), l'insuline (235) et l'angiotensine II (32; 97). Du côté de celles qui ont une activité inhibitrice, on note la dopamine (13; 195) et la parathormone (52). D'autres peptides modulent l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase parmi lesquelles on note le facteur de croissance de l'insuline, le facteur de croissance épithéliale, la vasopressine, l'ANP, l'interleukine-1 et l'endothéline (240). Toutes ces hormones contrôlent l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase via les mécanismes de signalisation de leur récepteur qui modulent l'activité de groupes de protéines kinases, phospholipases et phosphatases. Par exemple, la PKA est reconnue pour activer les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ et inhiber la sous-unité $\alpha 2$ tandis que l'effet de PKG sur la

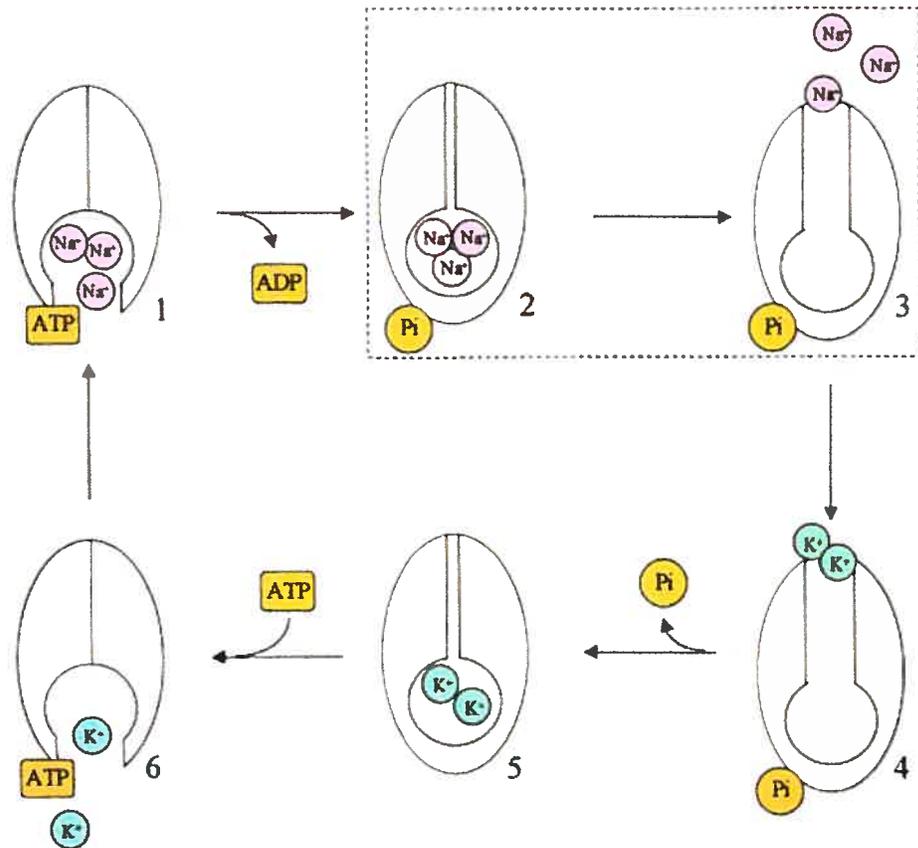


Figure 13 : Mécanisme catalytique de la Na⁺/K⁺-ATPase. (Tiré de Scheiner-Bobis) (208)

Na^+/K^+ -ATPase varie en fonction du tissu. Des hypothèses suggèrent que la PKC agirait plutôt en influençant l'endocytose et l'exocytose de la pompe. Le mécanisme exact de ces modulations n'est pas encore connu mais on sait qu'elles se font de façon spécifique aux tissus et aussi dépendamment de l'espèce étudiée (138; 240).

2.4.3.4. Les inhibiteurs de la Na^+/K^+ -ATPase

Possiblement à cause de sa fonction importante dans la physiologie cellulaire et pour l'organisme entier, la Na^+/K^+ -ATPase est la cible de plusieurs toxines produites par des plantes et des animaux. Son activité de pompe ionique est inhibée par une série de stéroïdes naturels, les glycosides cardiaques, qui incluent la ouabaïne et les digitaliques (208). La ouabaïne est probablement l'inhibiteur le plus étudié et le plus utilisé pour évaluer les fonctions de la Na^+/K^+ -ATPase. Elle lie la sous-unité α de la protéine du côté extracellulaire et inhibe l'hydrolyse de l'ATP et le transport d'ions. Elle se lie à la protéine lorsqu'elle est en conformation E2-P (109; 208). La sensibilité de la Na^+/K^+ -ATPase pour ces inhibiteurs diffère entre les espèces animales et aussi en fonction du type de sous-unité α présente dans la pompe (138). Cela a été démontré en comparant les effets vasoconstricteurs de la ouabaïne avec ceux de la MBG, un facteur endogène similaire à la digitale (EDLF; endogenous digitalis-like factor), dans des aortes de rats. La ouabaïne affecte la contractilité en se liant préférentiellement aux α_3 des fractions contenant les terminaisons nerveuses tandis que la MBG se lie plus efficacement aux α_1 des sarcolemmes du muscle lisse vasculaire (63). D'un point de vue thérapeutique, ces molécules sont très utiles dans les traitements de l'insuffisance cardiaque et de l'hypertension (109; 138; 208). Toutefois, une nouvelle molécule vient de faire son apparition sur le marché, la 17β -(3-furyl)- 5β -androstane- $3\beta,14\beta,17\alpha$ -triol (PST 2238 ou Rostafuroxin) (69). C'est un dérivé digitoxigénique (190) qui antagonise la liaison de la ouabaïne sur la Na^+/K^+ -ATPase. *In vitro*, il déplace la ouabaïne marqué au ^3H de la Na^+/K^+ -ATPase des reins de chien avec un IC_{50} de $2 \times 10^{-6}\text{M}$ et en affecte l'activité enzymatique à 10^{-5}M . De plus, Zhang et al (264) ont démontré que le PST 2238 inhibe l'augmentation de tonus myogène des artères mésentériques de souris causée par une exposition *in vitro* à la ouabaïne. Un avantage de cette molécule réside dans le fait qu'elle serait spécifique pour la Na^+/K^+ -ATPase et n'interagirait pas avec d'autres récepteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle (70). Il a été démontré *in vivo* que le

PST 2238 diminue la pression artérielle, sans modifier le rythme cardiaque, dans des modèles animaux d'hypertension dépendante de la ouabaïne (69; 70) et chez des rats Milans hypertendus (un modèle de mutant pour la protéine adducin) (68; 69). Toutefois, chez les animaux normotendus, il n'induit aucune modification de pression ni de modification de l'activité Na^+/K^+ -ATPase rénale (68-70). Sa capacité à corriger la fonction altérée de la Na^+/K^+ -ATPase rénale sans inhiber les transporteurs physiologiques de sodium lui procure l'avantage de ne pas avoir d'effets diurétiques et natriurétiques. Il n'induit donc pas les effets secondaires que les autres diurétiques causent comme l'activation du SRAA, l'hypokaliémie et des altérations des profils lipidique et glucidique (65; 69). Le PST 2238 inhibe également les effets de la ouabaïne sur la signalisation cellulaire, supprimant la croissance et la prolifération cellulaires, qui se traduisent par l'hypertrophie cardiaque et rénale dans l'hypertension dépendante de la ouabaïne (65; 69). Comme l'un des objectifs de la présente étude est d'évaluer l'implication de la Na^+/K^+ -ATPase dans la grossesse et dans notre modèle d'hypertension gestationnelle, chez lequel nous suspectons l'implication d'un facteur EDLF, nous avons choisi d'utiliser le PST 2238 pour évaluer ces effets *in vivo* dans nos animaux.

3. Buts et Hypothèses

Un des intérêts de notre laboratoire est de caractériser les modifications de la pression artérielle et du tonus vasculaire (comme marqueur de la résistance périphérique diminuée) durant la grossesse et dans l'hypertension gestationnelle. Des travaux précédents ont démontrés qu'une inactivation du SRAA, par un supplément sodique de 0.9% ou 1.8% durant la dernière semaine de gestation, entraînait des hausses de la pression artérielle (15) et des modifications de la réactivité vasculaire de l'aorte chez des rates gestantes, ce qui s'apparente expérimentalement à l'hypertension gestationnelle (12). Pour poursuivre ces investigations, nous allons traiter de deux approches dans le présent mémoire.

Dans un premier temps, nous croyons que les modifications de la réactivité vasculaire observées durant la grossesse normale et hypertendue sont dues, en partie, à une modification de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase par son rôle dans la gestion du potentiel membranaire, dans les muscles lisses vasculaires en particulier. De plus, l'activité de la pompe pourrait être modulée par la présence d'un facteur analogue à la ouabaine endogène (OLF; ouabain-like factor). Pour déterminer l'implication de la Na^+/K^+ -ATPase dans les modifications de réactivité vasculaires observées dans notre modèle d'hypertension gestationnelle (12), des rates gestantes recevant un supplément sodique de 0.9% ont été traitées avec du PST 2238, un antagoniste de la ouabaine sur la Na^+/K^+ -ATPase, pendant la dernière semaine de gestation. Pour vérifier les effets de ce traitement plusieurs paramètres ont été mesurés : 1) les données physiologiques des animaux (poids, consommation de nourriture et d'eau), 2) les électrolytes plasmatiques et urinaire, 3) les hormones du SRAA, 4) La pression artérielle, 5) l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase dans des anneaux d'aorte dénudés d'endothélium et 6) l'expression des différentes isoformes de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte. Si la Na^+/K^+ -ATPase est impliqué dans la mise en place de l'hypertension gestationnelle, le traitement avec le PST 2238 devrait renverser les observations précédentes (12; 15) sur la pression artérielle et la réactivité vasculaire.

Dans un deuxième temps, j'ai collaboré avec Véronique Houde, une étudiante du Dre Michèle Brochu, dans le but d'isoler une des composantes du SRAA, l'activité minéralocorticoïde (aldostérone) et d'en vérifier le rôle dans les altérations de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire durant la gestation et l'hypertension gestationnelle

expérimentale. Nous avons inhibé l'action de l'aldostérone en donnant à des rates non gestantes et gestantes, un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes, le canrénoate de potassium, pendant la dernière semaine de gestation. Puis nous avons évalué la pression artérielle et la réactivité vasculaire sur l'aorte, à l'aide de différents agents pharmacologiques. Nous émettons l'hypothèse que le traitement au canrénoate de potassium devrait induire une réponse similaire à celle que l'on observe avec le modèle supplémenté en sodium, si l'aldostérone est en partie responsable des phénomènes observés dans le modèle d'hypertension gestationnelle.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits utilisés

Tous les produits utilisés sous forme de sels (tampons, solution de Krebs, etc.) proviennent de Fisher Scientific et Bio-Rad. La phényléphrine, le carbachol, le NS1619, la cromakalim, la nifédipine et la ouabaine utilisés pour les essais dans les bains d'organes isolés proviennent de Sigma-RBI. Nous nous sommes procurés les anticorps pour les dosages hormonaux chez Peninsula Laboratories (PRA), Intermedico (aldostérone) et Medicorp (corticostérone) tandis que ceux utilisés pour les immunobuvardages de type western de la Na/K-ATPase, ainsi que le contrôle positif utilisé, proviennent de Upstate Biotechnologies. Finalement, le canrénoate de potassium pour le traitement des animaux provient de Sigma et le PST 2238 a été gracieusement fourni par le laboratoire Prassis Instituto di Recherche Sigma-tau spa, Italie (Dr Patrizia Ferrari).

Animaux

Des femelles Sprague-Dawley (Charles River Canada; St-Constant, Qc), pesant 225-250 g, ont été croisées avec des mâles fertiles du même âge. Le jour 1 de la grossesse est déterminé par la présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal du matin. Des rates non gestantes ont été choisies au hasard durant le cycle œstral pour servir de témoins aux rates gestantes. Tous les animaux sont hébergés dans des conditions de lumière (6AM-6PM) et de température ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) contrôlées et reçoivent de la nourriture contenant 0.23% NaCl (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad; Montreal, Qc) et de l'eau du robinet *ad libitum*.

Les animaux participant à la première partie des protocoles expérimentaux recevaient de l'eau supplémenté en sodium (0.9% NaCl) durant la dernière semaine de gestation ainsi que du PST 2238 (1mg/kg/jour sous-cutané). La dose de PST 2238 à administrer a été déterminée après discussion avec Dr Ferrari du laboratoire Prassis Instituto di Recherche Sigma-tau spa, Italie (propriétaire du brevet). Des expériences dans leur laboratoire ont permis de déterminer que le produit n'avait pas d'effet tératogène jusqu'à des doses de 135mg/kg. Contrairement à eux, nous administrons le produit sur une courte période (7jours) tandis qu'ils l'administrent pendant plusieurs semaines. Notre dose est donc 10 fois plus élevée que la leur et nous avons décidé de l'administrer de façon

sous-cutanée plutôt que *per os* puisque notre laboratoire possède de l'expérience dans l'administration des substances stéroïdes par cette voie. Parmi les groupes contrôles, un recevait la diète supplémentée en sodium et le véhicule d'injection tandis que l'autre a reçu de l'eau du robinet et le véhicule. Ceux participant à la deuxième partie du projet (gestantes et non gestantes) ont reçu du potassium de canrénoate (20mg/kg/jour) dans l'eau de breuvage des jours 15 à 22 de la gestation. Cette dose a été choisie puisqu'il a été rapporté qu'elle inhibe complètement les effets de l'aldostérone au niveau cardiovasculaire, sans avoir d'effets diurétique, natriurétique et kaliurétique qui peuvent influencer les fonctions hémodynamiques (26). Les animaux contrôles ont reçu de l'eau du robinet. À la fin de la période de traitement (jour 22 de la gestation; terme jour 23), les animaux ont été euthanasiés par décapitation (9h-9h30 AM) et des échantillons de sang ont été recueillis pour des analyses d'hormones et d'électrolytes. Ces études ont été approuvées par le comité local des soins pour les animaux, qui est accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux.

Mesures physiologiques

La pression artérielle a été mesurée par une méthode de mesure indirecte (Non-invasive Blood Pressure System for Rats and Mice RTBP 2000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) sur des animaux conscients. Les rats ont été acclimatés au système de prise de pression des jours 7 à 11 de l'expérience et la pression a été enregistrée des jours 12 à 22. Le poids corporel des animaux a été mesuré au jour 1 ainsi que quotidiennement des jours 15 à 22 de la gestation. La prise de nourriture et d'eau a également été notée quotidiennement des jours 15 à 22. Les paramètres fœtaux (poids des bébés, des placentas et de l'unité fœto-placentaire) ont été mesurés au jour 22.

Collecte et Analyse des échantillons

Au sacrifice, le premier échantillon de sang (0.5ml) a été recueilli dans un tube vacutainer K2 EDTA (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA), et un aliquot a également été prélevé pour mesurer l'hématocrite. Après une centrifugation à 4°C à 1500 g pendant 20 min, le plasma a été entreposé à -80°C pour les mesures de PRA. Le deuxième échantillon a été récupéré dans un tube vacutainer sans revêtement et après centrifugation, le sérum a été conservé à -80°C pour les mesures d'aldostérone et de

corticostérone. Le troisième échantillon a été recueilli dans un tube vacutainer lithium héparine, et après centrifugation, a été utilisé pour déterminer les électrolytes (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), l'urée et la créatinine plasmatiques. Le sodium et le potassium ont été dosés avec des électrodes spécifiques, le calcium total par réaction colorimétrique, l'urée via une électrode de conductibilité et la créatinine par un test enzymatique colorimétrique.

Au jour 20 de l'expérience, les rats ont été placés dans une cage métabolique individuelle pour 24h afin de pouvoir recueillir leur urine. Le volume urinaire a été mesuré et un aliquot a été prélevé pour mesurer le sodium, le potassium, le calcium total, l'urée et la créatinine excrétés en 24h.

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 (89). L'aldostérone et la corticostérone sériques ont été mesurés 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 $<0.007\%$.

Expériences dans les bains d'organes isolés

La réactivité vasculaire a été mesurée dans des anneaux d'aorte thoracique des différents groupes comme décrit précédemment (12). Après la décapitation, l'aorte thoracique a été prélevée rapidement et placée dans une solution froide de Krebs-bicarbonate, nettoyée des tissus adipeux et conjonctifs, puis quatre anneaux consécutifs (2-3mm) sont préparés. L'endothélium de chaque anneau a délicatement été enlevé en frottant la lumière avec une aiguille de calibre 18. Les anneaux ont été installés dans des bains d'organes isolés (15 ml; Radnotti Glass; Monrovia, CA, USA) maintenus à 37°C et ils ont été laissés à équilibrer pendant 1h sous 2 g de tension passive avec des lavages fréquents et des ajustements de la tension. Les tissus baignaient dans une solution de Krebs-bicarbonate de composition suivante (en mM) : 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO_3 , 2.5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.18 KH_2PO_4 , 1.18 MgSO_4 and 5.5 dextrose. La solution était oxygénée avec un mélange 95% O_2 -5% CO_2 ; pH 7.4. Après 1h d'équilibration, les tissus ont été stimulés avec $1\mu\text{M}$ phényléphrine puis au plateau de la réponse, du carbachol (1 mM) a

été ajouté pour vérifier que l'endothélium avait été enlevé. La tension a été mesurée à l'aide de transducteur de force (Kent Scientific Corporation) et a été enregistrée sur ordinateur par un système d'acquisition de données (DATAQ INSTRUMENTS; Akron, OH, USA).

La première partie du projet consiste à évaluer la réactivité vasculaire des animaux traités avec le PST 2238. Le protocole expérimental consiste à obtenir des courbes de relaxation concentration-réponse au KCl (0.1-10 mmol/l) après une contraction à la PhE (10^{-6} M). Les anneaux sont incubés dans une solution physiologique de Krebs-bicarbonate sans potassium. Un anneau de chaque groupe a servi de contrôle tandis que les autres ont été pré-incubés avec différentes doses de ouabaine (0.01, 0.03 et $0.1\mu\text{M}$) 10 min avant le début de la courbe.

La deuxième portion du protocole consiste à évaluer la réactivité vasculaire des animaux traités avec le canrénoate de potassium. Le protocole expérimental consiste à mesurer des courbes concentration-réponse à la PhE (10^{-9} à 10^{-4} mol/l) et au KCl (2-100 mmol/l, en solution hypertonique). Les deux courbes ont été séparées par des lavages fréquents et ont été réalisées 1h après que la tension soit retournée à la ligne de base suite aux opérations précédentes. Un anneau de chaque groupe a servi de contrôle tandis que les autres anneaux ont été pré-incubés avec de la nifédipine ($0.1\mu\text{mol/l}$), du NS-1619 ($30\mu\text{mol/l}$) ou de la cromakalim ($1\mu\text{mol/l}$) ajoutés 10 min avant l'application de la première concentration des stimulants. Les concentrations des différents agents ont été déterminées à partir de travaux précédents (12; 33; 199). Chaque anneau a été exposé au même inhibiteur ou activateur durant l'expérience et celle-ci se sont déroulées sous des lampes à sodium pour éviter la photo inactivation de la nifédipine et du NS-1619.

Immunobuvardage de type Western de la Na/K-ATPase

Un regroupement de trois aortes de chaque groupe traité au PST 2238 ainsi que de leur contrôle ont été prélevées, congelées dans l'azote liquide et pulvérisées. Les tissus ont été ensuite homogénéisés dans du tampon froid ($20\mu\text{M}$ Hepes, 1% NP-40 Alternative pH 7,4, 10% du cocktail d'inhibiteurs de protéase (Complete Mini, EDTA-free; Roche Diagnostics, USA)). Les homogénats ont été centrifugés à 3000 rpm (Sorval RMC14)

mélangés avec du Laemmli dans une proportion 1 :4 (volume : volume) et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Des microsomes de cerveau de rat ont été utilisés comme contrôle positif pour les trois isoformes de la Na/K-ATPase ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$). Les échantillons d'intérêt ont été chauffés à 100°C dans l'eau bouillante pendant 5 minutes pour les dénaturer. Ensuite, 30µg de protéines pour les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et 75µg pour la sous-unité $\beta 1$ en plus du contrôle positif et du standard de poids moléculaire ont été déposés dans les puits d'une cellule d'électrophorèse mini-protean II de Bio-Rad puis ils ont été séparés sur un gel de polyacrylamide (7% pour α et 15% pour β) avec un tampon d'électrophorèse (Tris-base 0.25M, glycine 1.92M, SDS 1%). Les protéines ont par la suite été transférées sur des membranes de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences) dans le kit de transfert mini Trans-Blot Transfer Cell System (BioRad) à l'aide du tampon de transfert qui contient (en mM) : Tris-base-50, glycine-380, méthanol 20%. Pour $\alpha 2$, le transfert a eu lieu toute la nuit tandis qu'il est de deux heures pour les deux autres sous-unités. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant une heure à la température de la pièce dans une solution de TBS-Tween (tris-base 50mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5) avec 5% de lait en poudre. Après, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire à 4°C toute la nuit pour $\alpha 1$, anticorps monoclonal de souris IgG (Upstate Biotechnologie) 1 :4000, et $\beta 1$, anticorps monoclonal de souris IgG clone C464.8 (Upstate Biotechnologie) 1 :200. $\alpha 2$ a été incubée une heure à température de la pièce avec l'antisérum de lapin (Upstate Biotechnologie) 1 :1000. Les dilutions d'anticorps ont été effectuées pour maximiser le signal et minimiser l'arrière-plan. Après les lavages dans le TBS-Tween (6x5min), les membranes ont été incubées 30 min avec l'anticorps secondaire anti-souris IgG provenant du mouton et conjugué à une peroxydase Raifort (horseradish) (Amersham Bioscience) 1 :2000 ou avec l'anti-lapin IgG provenant de l'âne et conjugué à une peroxydase Raifort (horseradish) (Amersham Bioscience) 1 :2000. Les membranes ont été lavées une deuxième fois avec le TBS-Tween (6x5min) et puis les bandes ont été visualisées avec le kit de détection par chemiluminescence (Amersham Biosciences) après exposition sur des films ECL. La quantification des protéines d'intérêt a été effectuée en mesurant la densité des bandes à l'aide du logiciel Alpha Imager (Alpha Innotech Inc). L'expression de la β -actine est évaluée pour chaque échantillon et sert à standardiser la quantité de protéines dans chaque puits.

Analyse des données

Les pressions artérielles systoliques ont été comparées dans chaque groupe avec des valeurs stables de prétraitement par un ANOVA pour mesures répétées (Prism 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les paramètres physiologiques (données plasmatiques, urinaires et hormonales, le poids des organes et les données fœtales) et les immunobuvardages de type western ont été comparés par analyse de variance (ANOVA) avec un post test de Bonferroni. Le test de comparaisons multiples de Bonferroni a été effectué groupe par groupe (diète normale sans traitement vs diète sodée sans traitement, diète normale sans traitement vs traitement au PST 2238, diète sodée sans traitement vs traitement au PST 2238) pour pouvoir observer les impacts de la diète en sel et du traitement au PST 2238 (Prism 4.0). Pour les études de la partie canrénoate dans les bains d'organes isolés, toutes les courbes concentration-réponse ont été analysées par une équation logistique à quatre paramètres générées par ordinateur (Prism 4.0) pour évaluer l'asymptote maximale de la courbe (E_{max}) et la concentration requise pour obtenir 50% du E_{max} (EC_{50}). Les différentes courbes du même protocole ont été comparées par ANOVA à simple facteur et les colonnes qui comparent les E_{max} sont analysées avec le test T de Student (Fig 14 et 15, panneaux de droite). Dans la section du traitement au PST 2238, pour faciliter l'analyser des courbes biphasiques de relaxation au KCl, l'aire sous la courbe nette a été calculée à l'aide du logiciel Prism 4.0. Cette dernière représente l'aire sous la courbe positive moins l'aire sous la courbe négative. La région désignant l'aire sous la courbe est indiquée à la figure 14. Les aires sous la courbe sont comparées par un ANOVA simple facteur suivi d'un post test de Dunnett (Prism 4.0) (Fig 18-21). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne avec l'erreur standard de la moyenne (ESM), les nombres entre parenthèses correspondant au nombre d'animaux étudiés. Une différence significative est considérée pour les valeurs de $p < 0.05$.

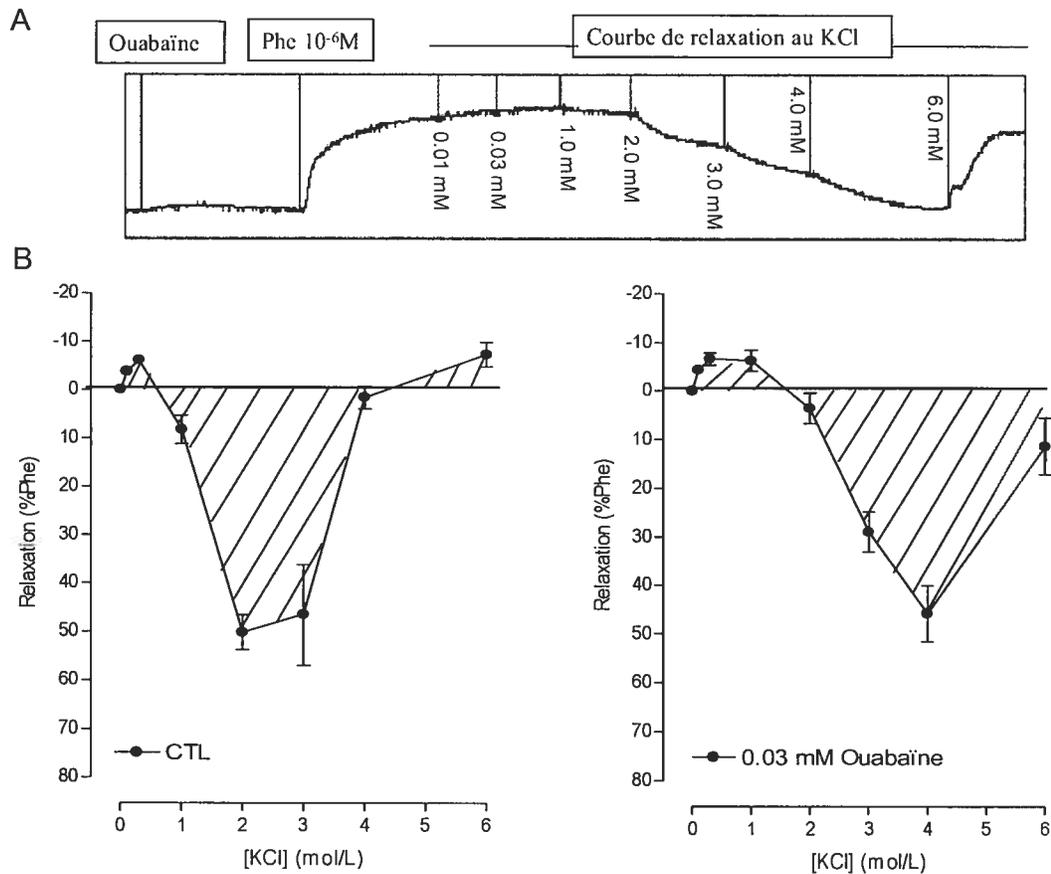


Figure 14 : Évaluation de l'aire sous la courbe d'un tracé de relaxation d'anneaux aortiques en réponse au KCl. A) Tracé expérimental de la réponse d'un anneau d'aorte à une courbe de relaxation au KCl en présence de ouabaine. B) Courbe de relaxation au KCl, exprimé en pourcentage de la contraction à la phényléphrine, pour des anneaux aortiques de rates non gestantes, en absence (gauche) ou en présence de ouabaine (droite). La zone hachurée représente l'aire sous la courbe. La surface sous le niveau zéro est considérée comme positive (effet recherché), alors que celle au-dessus représente la partie négative.

II. RÉSULTATS

1. Partie 1: Animaux traités au PST 2238

1.1. Gain de poids maternel, consommation de nourriture et d'eau et paramètres fœtaux

Durant les 14 premiers jours de la gestation, tous les animaux ont reçu de la nourriture et de l'eau du robinet *ad libitum*. Des jours 15 à 22, les animaux ont reçu de l'eau supplémentée en sodium (0.9%) ou ont été traités avec le PST 2238 (1mg/kg/j s.c.) ou ont eu les deux. Durant cette période, le gain de poids des rates gestantes de tous les groupes a été similaire de même que leur consommation de nourriture. Le supplément sodique a entraîné une augmentation significative de la consommation d'eau (Tableau 1). De plus, on note que les traitements n'ont eu aucun impact sur les paramètres fœtaux (poids des placentas, des bébés, de l'unité fœto-placentaire et nombre de rejetons dans la portée) (Tableau 2).

1.2. Poids des organes et ratio du poids des organes sur le poids corporel

Le poids du cœur, du ventricule gauche, des reins et des surrénales a été mesurés pour s'assurer que les traitements n'affectaient pas les principaux systèmes impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Aucun changement n'a été noté dans les différents groupes (Tableau 3).

1.3. Paramètres sanguins

Comme le montre le tableau 4, ni la diète élevée en sodium ou le traitement avec le PST 2238 n'ont affecté les électrolytes plasmatiques (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), l'urée, la créatinine, l'osmolalité ou l'hématocrite. Par contre, lorsque chaque groupe est évalué individuellement par un ANOVA, on remarque une diminution significative de l'aldostérone dans le groupe recevant le supplément sodique et une augmentation de la PRA chez les rates recevant une diète normale et le traitement au PST 2238 (Tableau 4). Toutefois, quand chaque traitement est évalué individuellement, c'est-à-dire que tous les animaux recevant ou non un traitement sont regroupés indépendamment de la seconde condition, on peut évaluer l'effet global de ce traitement et vérifier s'il y a une interaction entre les deux traitements par une analyse factorielle. Cela nous permet de voir que la diète supplémentée en sodium entraîne des diminutions de l'aldostérone, de la corticostérone et de la PRA. De plus, on constate que la PRA est augmenté chez les rates

Tableau 1 : Effets du traitement avec le PST 2238 sur le gain de poids et la consommation de nourriture et d'eau chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium

	Diète normale		Diète supplémentée en sodium	
	Non traité	PST 2238	Non traité	PST 2238
Gain de poids (g)	69.2 ± 4.3 (10)	59.0 ± 6.9 (10)	76.2 ± 5.1 (10)	74.1 ± 2.9 (10)
Consommation nourriture (g)	160 ± 10 (9)	142 ± 12 (9)	148 ± 6 (10)	151 ± 3 (10)
Consommation eau (ml)	329 ± 33 (9)	281 ± 28 (9)	448 ± 41 (10)*	473 ± 26 (10)

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux.

* $p < 0.05$ vs diète normale.

Tableau 2 : Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres fœtaux chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium.

	Diète normale		Diète supplémentée en sodium	
	Non traité	PST 2238	Non traité	PST 2238
Poids moyen des placentas (g)	0.476 ± 0.016 (9)	0.494 ± 0.014 (8)	0.461 ± 0.015 (10)	0.467 ± 0.013 (9)
Poids moyen des bébés (g)	4.94 ± 0.05 (9)	4.98 ± 0.20 (8)	5.22 ± 0.10 (10)	5.18 ± 0.11 (9)
Poids des placentas/Poids des bébés	9.48 ± 0.25 (9)	9.46 ± 0.32 (7)	8.68 ± 0.14 (9)	9.09 ± 0.26 (10)
Poids de l'unité feto-placentaire (g)	86.3 ± 2.9 (9)	78.0 ± 3.6 (8)	87.4 ± 3.7 (10)	79.3 ± 5.0 (10)
Nombre de bébés	15.8 ± 0.6 (9)	14.4 ± 0.7 (8)	15.5 ± 0.8 (10)	13.9 ± 1.1 (10)

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux.

Tableau 3 : Effets du traitement avec le PST 2238 sur le poids du cœur, du ventricule gauche, des reins et des surrénales chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium

Poids (g)	Diète normale		Diète supplémentée en sodium	
	Non traité	PST 2238	Non traité	PST 2238
Cœur	0.894 ± 0.035 (10)	0.818 ± 0.034 (10)	0.861 ± 0.029 (10)	0.856 ± 0.028 (10)
Ventricule gauche	0.600 ± 0.022 (10)	0.553 ± 0.023 (10)	0.574 ± 0.020 (10)	0.589 ± 0.016 (10)
Reins	1.60 ± 0.07 (10)	1.51 ± 0.05 (10)	1.58 ± 0.05 (10)	1.61 ± 0.04 (10)
Surrénales	0.081 ± 0.002 (9)	0.083 ± 0.004 (10)	0.072 ± 0.003 (10)	0.074 ± 0.004 (10)
Cœur/poids corporel	0.232 ± 0.006 (10)	0.221 ± 0.005 (10)	0.219 ± 0.005 (10)	0.222 ± 0.005 (10)
Ventricule gauche/poids corporel	0.153 ± 0.002 (10)	0.149 ± 0.003 (10)	0.146 ± 0.004 (10)	0.152 ± 0.003 (10)
Reins/poids corporel	0.414 ± 0.012 (10)	0.399 ± 0.007 (10)	0.401 ± 0.006 (10)	0.411 ± 0.008 (10)
Surrénales/poids corporel	0.024 ± 0.001 (9)	0.023 ± 0.002 (10)	0.019 ± 0.001 (9)	0.019 ± 0.001 (10)

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux.

Tableau 4 : Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium

	Diète normale		Diète supplémentée en sodium	
	Non traité	PST 2238	Non traité	PST 2238
Sodium (mmol/L)	137 ± 1 (10)	136 ± 1 (17)	138 ± 1 (9)	137 ± 1 (17)
Potassium (mmol/L)	6.46 ± 0.25 (10)	6.51 ± 0.13 (18)	6.22 ± 0.15 (10)	6.15 ± 0.12 (19)
Urée (mmol/L)	4.72 ± 0.19 (9)	5.29 ± 0.35 (17)	5.33 ± 0.38 (10)	4.79 ± 0.18 (19)
Créatinine (µmol/L)	46.9 ± 1.8 (9)	48.6 ± 1.1 (18)	49.7 ± 1.7 (9)	46.2 ± 1.4 (19)
Calcium total (mmol/L)	2.12 ± 0.07 (10)	2.12 ± 0.08 (18)	2.11 ± 0.07 (10)	2.24 ± 0.056 (19)
Osmolalité (mOsmol/kg H ₂ O)	293 ± 3 (10)	288 ± 3 (17)	294 ± 4 (10)	295 ± 3 (19)
Hématocrite (%)	38.5 ± 0.9 (10)	39.8 ± 0.6 (20)	36.7 ± 1.0 (8)	38.7 ± 0.5 (18)
Aldostérone (pmol/ml)	2.49 ± 0.50 (5)	2.53 ± 0.17 (7)	0.96 ± 0.19 (9)*	0.40 ± 0.08 (15)
Corticotérone (nmol/ml)	2.16 ± 0.18 (10)	1.94 ± 0.13 (19)	1.82 ± 0.26 (10)	1.36 ± 0.13 (20)
Activité rénine plasmatique (pmol/ANGI/ml/h)	1.79 ± 0.44 (8)	4.30 ± 0.70 (16)*	0.85 ± 0.12 (9)	1.29 ± 0.18 (19)

Les valeurs représentent les moyennes ± ES des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux. * p<0.05 vs non traitée, diète normale.

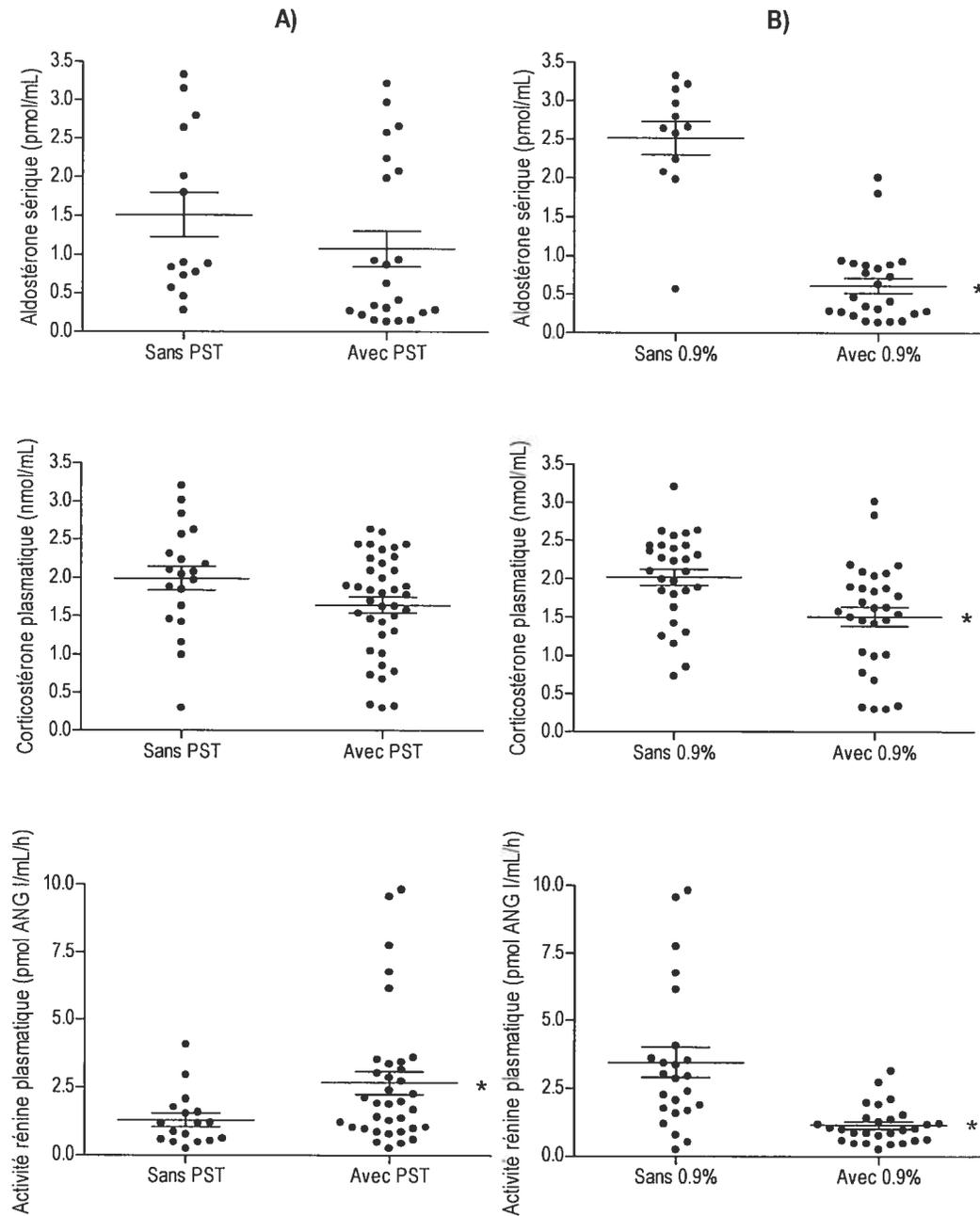


Figure 18: Niveaux d'aldostérone et de corticostérone sériques et de PRA chez les rates recevant ou non du PST 2238 (A) avec ou sans supplément sodique de 0.9% (B). Chaque traitement est évalué individuellement, c'est-à-dire que tous les animaux recevant ou non un traitement sont regroupés indépendamment de la seconde condition. * différence significative à $p < 0.05$.

traitées avec le PST 2238. Il y a donc interaction chez les rates gestantes entre le supplément sodique et le traitement au PST 2238 (Fig. 18) pour ce paramètre.

1.4. Paramètres urinaires

L'urine de 24h a été collectée pour analyse (Tableau 5). La consommation d'eau, le volume urinaire et l'excrétion de sodium sont modifiés par le supplément sodique (0.9%) comparativement à la diète normale. Les autres éléments mesurés incluant la balance en eau, le potassium, le calcium total, l'urée, la créatinine et les protéines ne sont pas modifiés par la diète. Le PST 2238 n'a eu aucun effet significatif sur les paramètres urinaires.

1.5. Pression artérielle systolique

La Figure 19 montre l'effet de la diète supplémentée en sodium et du traitement au PST 2238 sur la pression artérielle systolique des jours 12 à 22 de la gestation. Avant les traitements, les pressions sont similaires dans tous les groupes. On peut également voir la baisse de pression entraînée par la gestation dans tous les groupes. L'inhibition de cette baisse de pression par la diète supplémentée en sodium, démontrée précédemment dans notre laboratoire, n'est plus reproductible dans cette série d'expériences. De plus, on remarque que le traitement au PST 2238 n'a aucun effet sur la pression artérielle.

1.6. Effets de la gestation, de la diète supplémentée en sodium et du traitement au PST 2238 sur la relaxation vasculaire au KCl

Une première série d'expérience a été réalisé pour vérifier l'impact de la gestation et de la diète supplémentée en sodium sur l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase des anneaux aortiques (Fig. 20). La courbe de relaxation au KCl des aortes placées dans un milieu physiologique sans K^+ et en présence de différentes concentrations de ouabaine est proportionnelle à l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase (253). La relaxation est évaluée en pourcentage du niveau de contraction induit par la phényléphrine. Ainsi ces contractions sont statistiquement similaires chez les trois groupes (NG : 1.92 ± 0.18 g; G : 1.84 ± 0.10 g; G0.9%NaCl : 2.15 ± 0.16 g N=10). Les courbes de la Figure 20 sont difficiles à analyser à cause de leur composante biphasique, c'est pourquoi nous avons calculé l'aire sous la courbe, pour toutes les concentrations de ouabaine. Ces résultats sont rapportés sous forme

Tableau 5 : Effets du traitement avec le PST 2238 sur les paramètres urinaires chez des rates gestantes recevant une diète normale ou une diète supplémentée en sodium

	Diète normale		Diète supplémentée en sodium	
	Non traité	PST 2238	Non traité	PST 2238
Consommation d'eau (ml/24h)	36.7 ± 3.9 (9)	37.3 ± 5.4 (9)	55.4 ± 5.0 (10) *	61.0 ± 4.9 (10)
Volume urinaire (ml/24h)	11.1 ± 2.1 (9)	12.3 ± 2.4 (10)	24.1 ± 3.7 (8) *	30.6 ± 1.9 (9)
Balance en eau (ml/24h)	26.2 ± 2.4 (10)	21.2 ± 2.0 (8)	31.0 ± 3.2 (9)	32.8 ± 2.8 (10)
Sodium (mmol/24h)	0.422 ± 0.053 (8)	0.487 ± 0.074 (9)	4.831 ± 0.972 (8)*	6.115 ± 1.052 (9)
Potassium (mmol/24h)	1.95 ± 0.23 (10)	1.73 ± 0.33 (9)	2.09 ± 0.11(7)	2.47 ± 0.09 (8)
Urée (mmol/24h)	4.36 ± 0.53 (9)	5.32 ± 1.09 (9)	5.65 ± 0.63 (8)	5.93 ± 0.51 (8)
Créatinine (µmol/24h)	0.072 ± 0.006 (10)	0.067 ± 0.006 (9)	0.078 ± 0.003 (8)	0.081 ± 0.003 (8)
Calcium total (mmol/24h)	0.083 ± 0.015 (10)	0.082 ± 0.024 (9)	0.095 ± 0.015 (8)	0.162 ± 0.028 (8)
Protéines (mg/24h)	7.76 ± 1.04 (10)	8.24 ± 1.03 (7)	11.05 ± 0.86 (8)	11.90 ± 0.87 (10)

Les valeurs représentent les moyennes ± ES des jours 15 à 22. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux. * p<0.05 vs non traitée, diète normale.

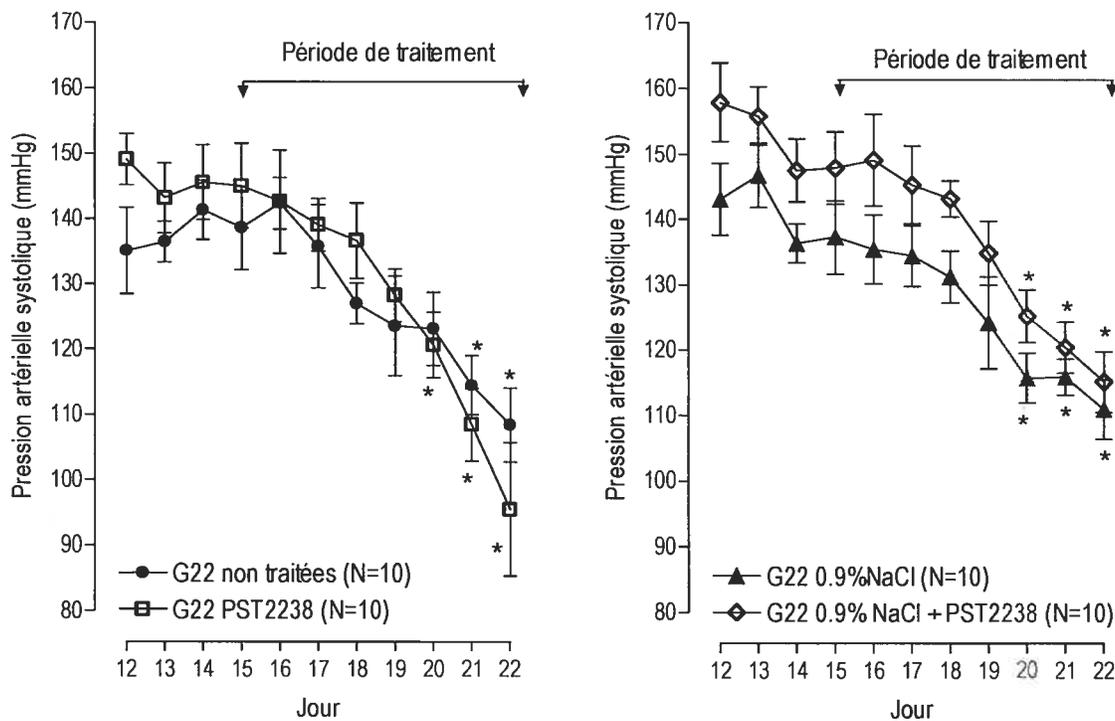


Figure 19 : Effets du traitement au PST 2238 sur la pression artérielle des rates gestantes recevant une diète normale (A) ou la diète sodique (0.9% NaCl) (B). Les flèches indiquent la période de traitement. Entre parenthèses, on retrouve le nombre de rats utilisés. Les points représentent les moyennes et les barres d'erreurs, l'ESM. *, significativement différent par comparaison à la période de prétraitement

d'un histogramme (Fig. 21) pour faciliter l'analyse. On constate que la relaxation est moins importante chez les 2 groupes de gestantes, en comparaison avec les non gestantes; mais qu'elle est similaire dans les 2 groupes de gestantes. De plus, l'effet inhibiteur de la ouabaïne est moins important chez les gestantes mais similaire entre les deux autres groupes.

Nous avons reproduit le même protocole en utilisant des rates gestantes seulement. Nous voulions observer l'effet du PST 2238 chez des rates recevant une diète normale et la diète 0.9% NaCl. La Figure 22 montre les courbes de relaxation au KCl, exprimées en pourcentage de contraction à la PhE, pour les quatre groupes. Encore une fois, les contractions induites par la phényléphrine ont été quantifiées pour s'assurer que les courbes étaient comparables entre elles (GNT : 2.29 ± 0.13 g; GPST 2238 : 1.77 ± 0.18 g; G0.9%NaCl : 2.55 ± 0.16 g; G0.9%NaCl+PST 2238 : 2.28 ± 0.16 g N=10). Sur la Figure 22, on peut constater que les aortes du groupe traité au PST 2238 relaxent significativement plus que celles du groupe de gestantes contrôles, l'aire sous la courbe de ces résultats est décrite (Fig. 23). Comme dans la première série d'expériences, on voit que les anneaux aortiques contrôles des groupes ne recevant pas le traitement au PST 2238 ont un niveau de relaxation équivalent. Toutefois, on remarque que le traitement au PST 2238, dans le groupe sous diète normale, est accompagné d'une augmentation importante de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, qui se reflète par une relaxation plus importante, qui est presque six fois plus élevée que celle observée dans le groupe non traité. Cette augmentation n'est toutefois pas présente dans le groupe traité recevant la diète 0.9% NaCl, ce qui indique que le supplément sodique affecte l'effet du PST 2238 sur l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase de l'aorte. Lorsqu'on analyse la réponse inhibitrice de la ouabaïne, on s'aperçoit que dans le groupe sous diète normale recevant le PST 2238, l'inhibition est plus importante que chez les autres gestantes puisque qu'elle est significatrice à la plus faible concentration de ouabaïne. On peut donc conclure que la liaison *in vivo* du PST 2238 à la Na^+/K^+ -ATPase durant la gestation normale de la rate affecte la réactivité vasculaire. Un effet qui est contrecarré par une augmentation de l'ingestion de sodium durant la même période de traitement.

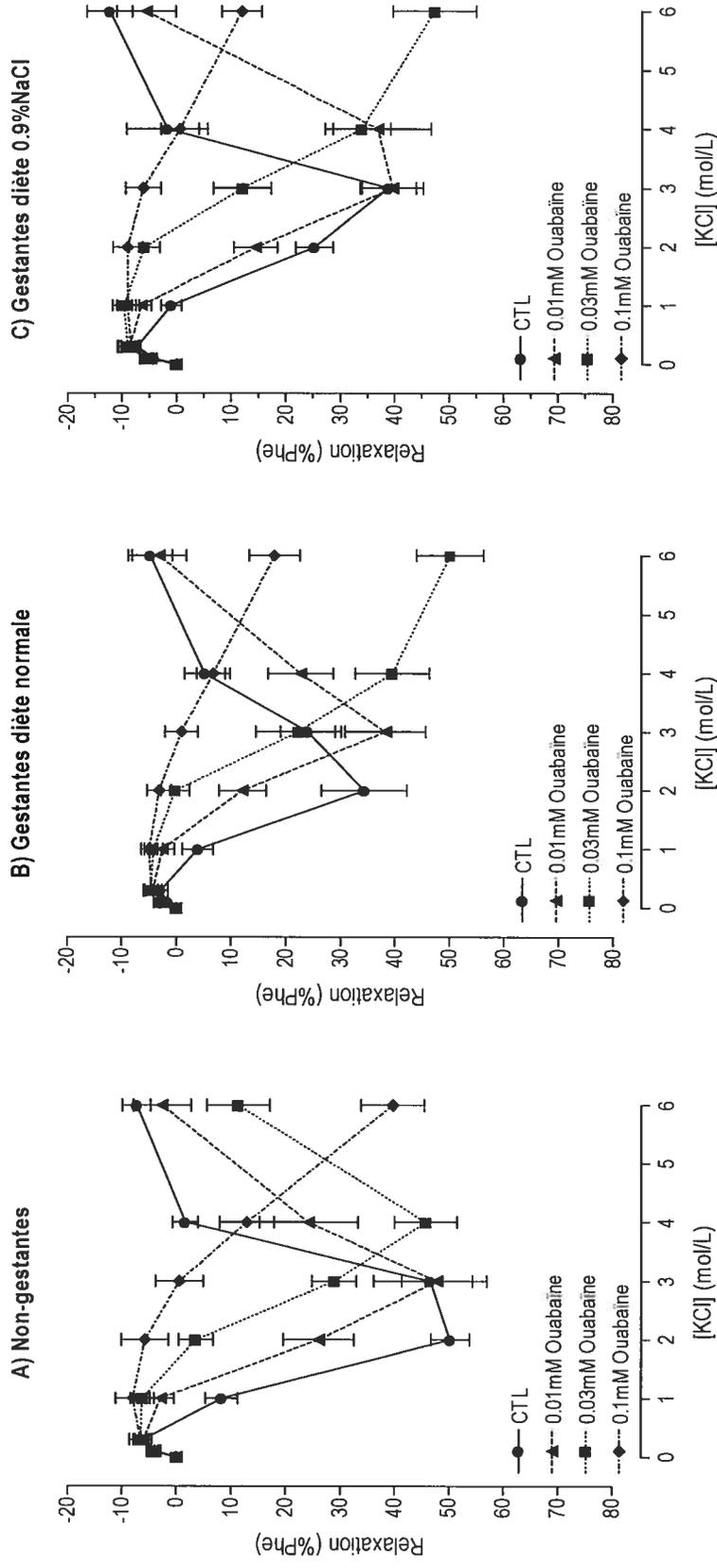


Figure 20: Courbes de relaxation au KCl, la réponse au KCl est exprimée en pourcentage de la contraction à la PhE, en présence de différentes concentrations de ouabaine sur des anneaux d'aorte de rates non gestantes (A), gestantes recevant une diète normale (B) et gestantes recevant une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C).

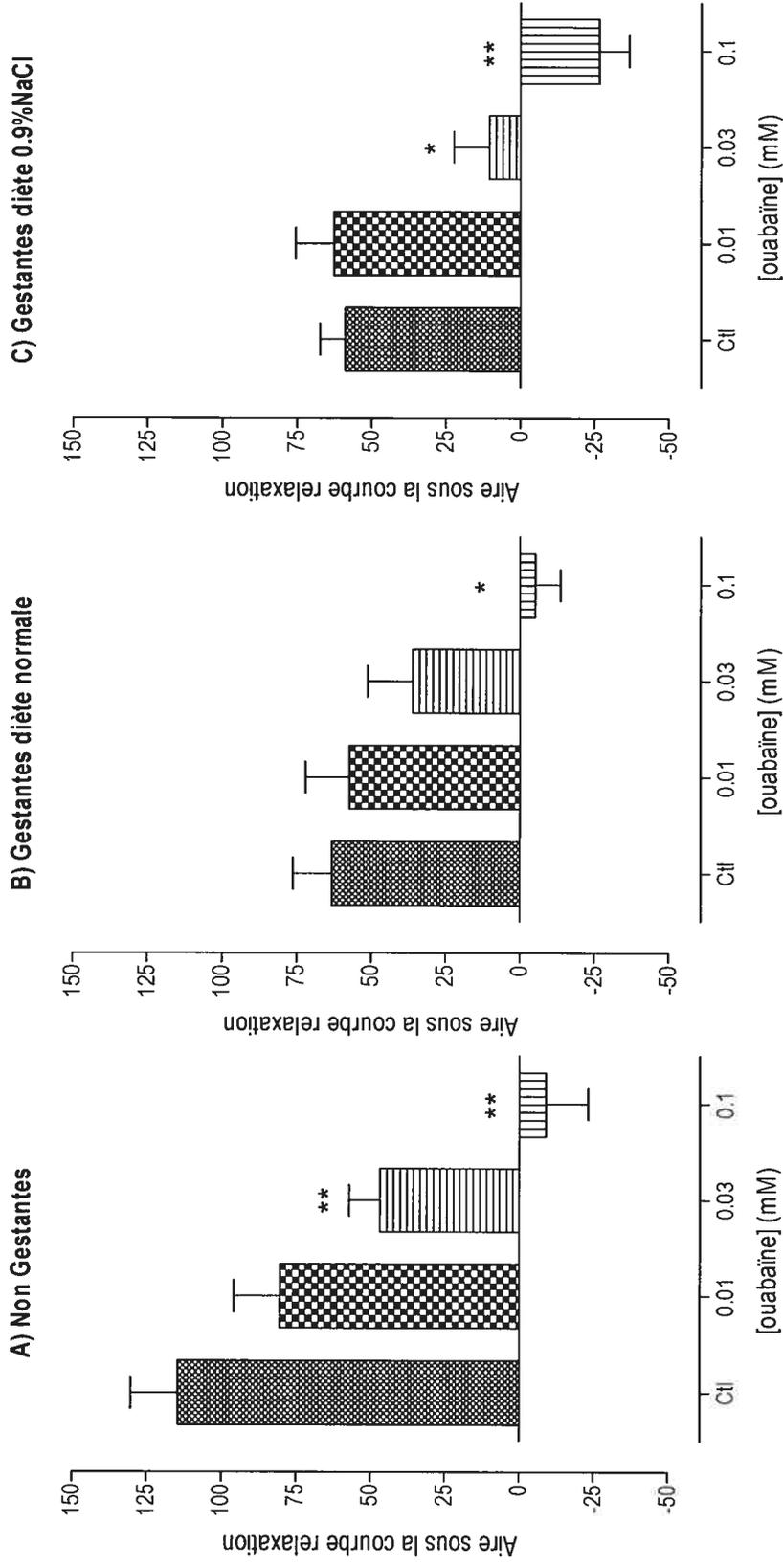


Figure 21: Histogrammes représentant l'aire sous la courbe de la relaxation au KCl des aortes, en l'absence ou présence de ouabaine, chez des rates non gestantes (A), gestantes recevant une diète normale (B) et gestantes recevant une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C). * effet significatif de la ouabaine ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

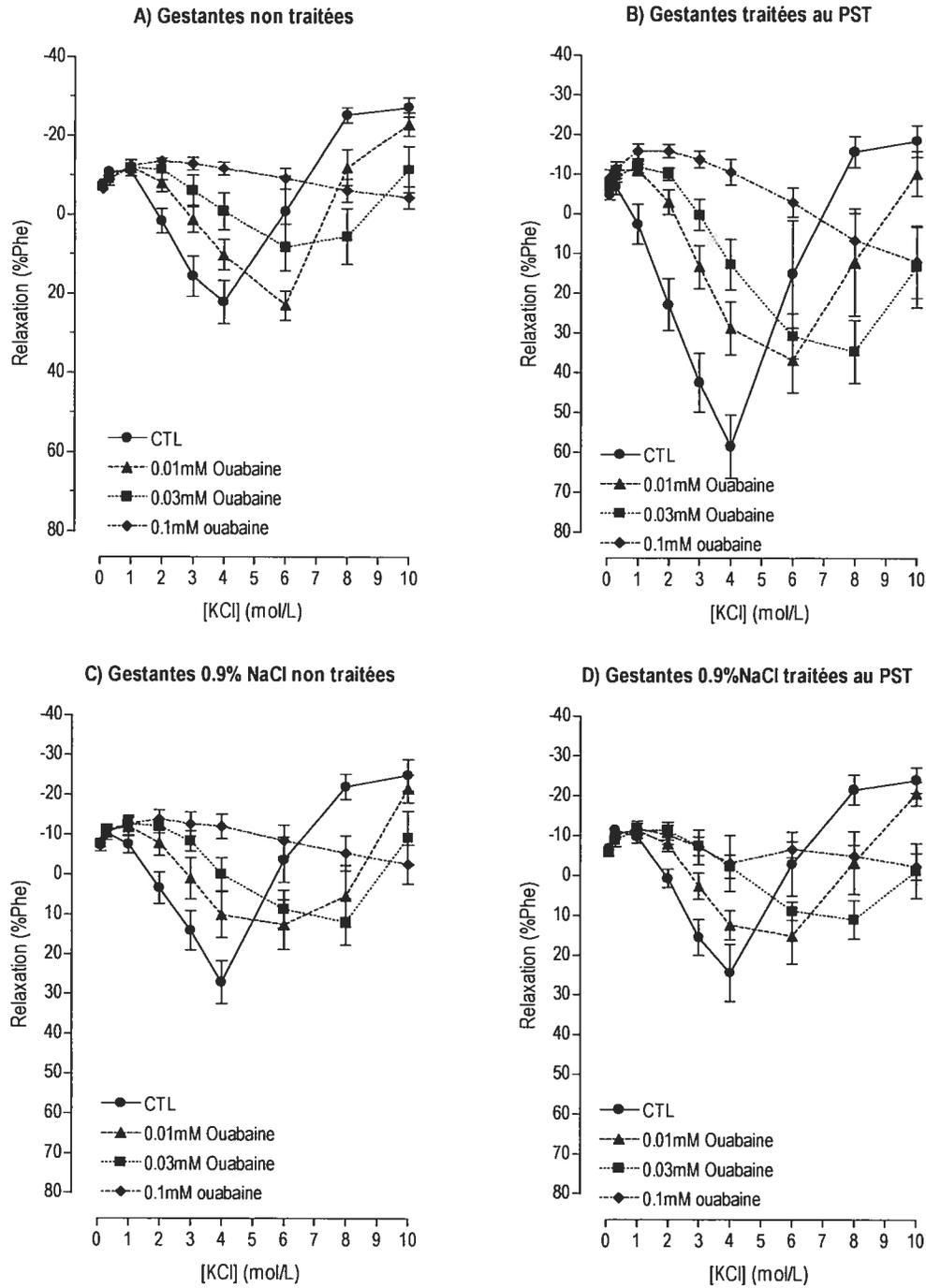


Figure 22: Courbes de relaxation au KCl, en présence de différentes concentrations de ouabaine sur des anneaux d'aortes de rates gestantes recevant une diète normale (A) et une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C) ainsi qu'un traitement au PST 2238 (B et D). La réponse au KCl est exprimée en pourcentage de la contraction à la PhE.

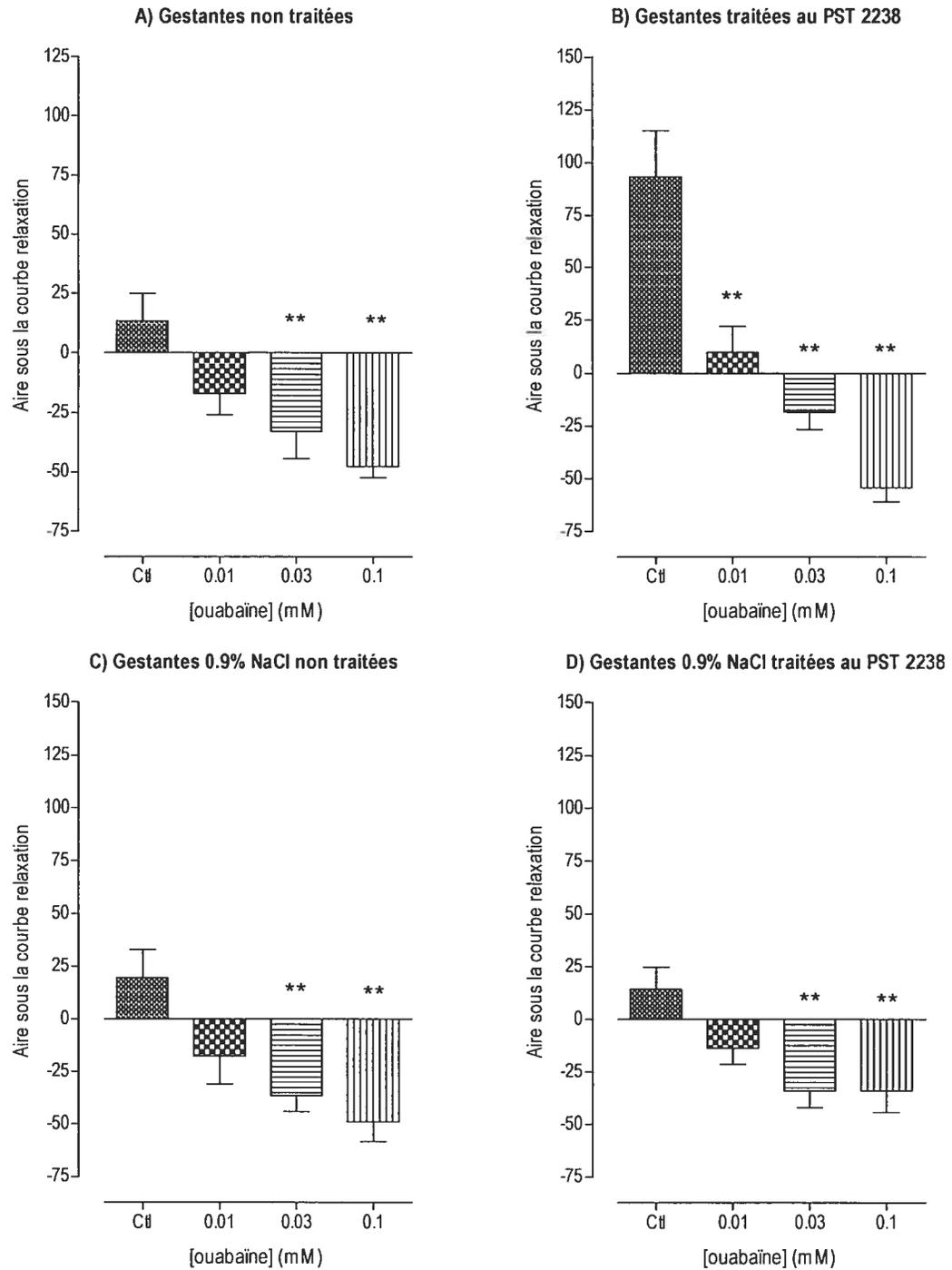


Figure 23: Histogrammes représentant l'aire sous la courbe de la relaxation au KCl des aortes, en l'absence ou présence de ouabaine, chez des rates gestantes recevant une diète normale (A) et une diète avec un supplément sodique 0.9% NaCl (C) ainsi qu'un traitement au PST 2238 (B et D). * effet significatif de la ouabaine ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

1.7. Expression de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte

Afin de confirmer si les modifications d'activité observées dans les bains d'organes isolés sont dues à une modification de l'expression de la protéine, nous avons mesuré l'expression de différentes sous-unités de la protéine par immunobuvardage de type Western. L'expression des sous-unités catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ($\alpha 3$ n'étant pas suffisamment exprimé pour être détectable dans les conditions utilisées) et de la sous-unité régulatrice $\beta 1$ a été mesurée. La Figure 24 nous montre que la diète supplémentée en sodium induit une augmentation de la sous-unité $\alpha 1$ (A) sans modifier l'expression des deux autres sous-unités (B et C). Le traitement au PST 2238 n'a eu aucun impact sur l'expression de la sous-unité régulatrice (C). Toutefois, il induit une augmentation des sous-unités catalytiques qui est significative pour $\alpha 2$ (B) mais qui ne l'est pas pour $\alpha 1$ (A) dans le groupe sous diète normale. On remarque également qu'il induit une diminution de l'expression de $\alpha 1$ dans le groupe recevant le supplément sodique. Le traitement au PST 2238 a donc un effet inverse sur l'expression de $\alpha 1$ en présence ou absence de la diète supplémentée en sodium (0.9% NaCl). Cela pourrait expliquer les différences d'activités observées.

2. Partie 2 : Animaux traités avec le canrénoate de potassium

2.1. Dose de canrénoate de potassium administrée

Selon leur consommation moyenne d'eau et leur poids corporel (résultats non présentés) durant la période de traitement, les rates non gestantes ont reçu, en moyenne, une dose de 23.7 mg/kg/jour et les rates gestantes (incluant le poids fœtal) 19.7 mg/kg/jour. Ces doses correspondent à celle de 20 mg/kg/jour que nous désirions administrer.

2.2. Données physiologiques

Cette partie du projet a été réalisé en collaboration avec Véronique Houde, étudiante du Dre Michèle Brochu, et toutes les données physiologiques se retrouve dans son mémoire de maîtrise (94). Le poids des animaux, la consommation de nourriture et d'eau, les paramètres plasmatiques et urinaires et le poids des organes ont été mesurés.

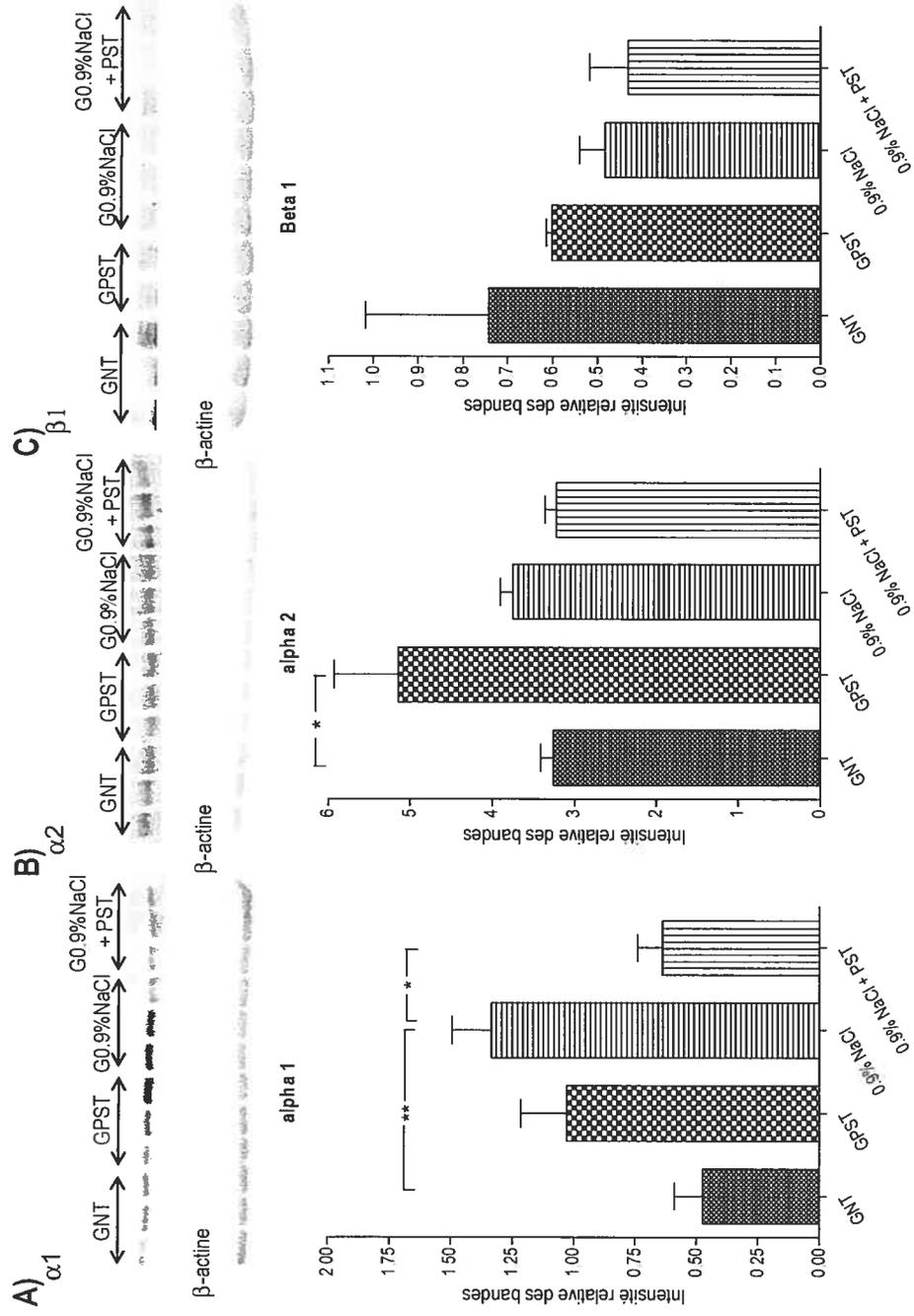


Figure 24 : Immunobuvardage de type western des sous-unités $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B) et $\beta 1$ (C) de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte. * différence significative à $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Parmi ces données, quelques points méritent d'être retenus. La consommation d'eau des animaux est augmentée par la gestation et diminuée par le traitement au canrénoate ce qui nous permet d'observer un effet d'interaction significatif entre les deux conditions. De plus, on note un autre effet d'interaction pour la balance en eau (volume d'eau ingéré – volume d'urine). Au niveau plasmatique, le canrénoate n'affecte pas, ni chez les rates non gestantes ni chez les gestantes, les électrolytes et le profil hormonal (aldostérone, corticostérone et PRA).

2.3. Pression artérielle systolique

La figure 15 montre l'effet du canrénoate de potassium sur la pression artérielle des rates non gestantes (Fig. 15A) et des gestantes (Fig. 15B) des jours 12 à 22 de la gestation. Chez les rates non gestantes, la pression artérielle est similaire pour les deux groupes avant l'administration du traitement (jour 12 à 15) et reste inchangé après le traitement (jour 15 à 22). Dans la figure 15B, on observe la baisse de pression reliée à la gestation qui est significative à partir du jour 20 chez les rates non traitées. Cette diminution de la pression est significativement accentuée aux jours 21 et 22, chez les rates traitées avec le canrénoate.

2.4. Effets de la gestation et du traitement au canrénoate de potassium sur la réponse vasculaire à la phényléphrine

La réponse maximale à la PhE est significativement réduite dans les anneaux aortiques des rates gestantes comparativement aux non gestantes non traitées (de 2.37 ± 0.11 à 1.89 ± 0.10 g; Fig. 16A, panneaux de gauche et du centre). Chez les rates non gestantes, seulement le NS1619 a réussi à diminuer la réponse maximale à la PhE mais chez les rates gestantes les deux activateurs des canaux potassiques (NS1619 et cromakalim) y sont parvenus. Le traitement au canrénoate de potassium a augmenté significativement la réponse à la PhE dans les deux groupes (chez les non gestantes la réponse est également significative ($p < 0.05$), Fig 14B, panneau droit). Chez les rates recevant le traitement, la nifédipine et la cromakalim inhibent significativement la réponse à la PhE et les effets inhibiteurs sont encore plus importants dans les anneaux aortiques des rates gestantes. Ces données que les trois modulateurs ont des effets inhibiteurs

augmentés sur la réponse à la PhE par le canrénoate chez les rates gestantes en comparaison avec les rates non gestantes.

2.5. Effets de la gestation et du traitement au canrénoate de potassium sur la réponse vasculaire au KCl

La réponse maximale au KCl est significativement plus faible chez les rates gestantes des deux groupes comparativement aux non gestantes (non traité de 1.84 ± 0.06 à 1.49 ± 0.07 g, traité au canrénoate de 2.23 ± 0.06 à 1.66 ± 0.07 g; Fig. 17). Le traitement au canrénoate augmente la réactivité au KCl des anneaux aortiques des rates non gestantes mais l'effet n'est pas significatif sur le groupe des gestantes (Fig. 17). Le NS1619 inhibe de façon significative la contraction au KCl dans tous les groupes (Fig. 17 panneaux de gauche et du centre). Toutefois, cette inhibition est inférieure durant la gestation dans les aortes des rates non traitées, un effet qui est renversé par le traitement avec le canrénoate de potassium (Fig. 17 panneaux de droite). La nifédipine diminue la contraction au KCl de façon très substantielle dans tous les groupes, ce qui rend la quantification des effets très aléatoires. Son action est moins importante dans le groupe des gestantes non traitées comparativement au non gestantes non traitées (Fig. 17A droite) et l'effet est similaire dans les groupes traités (Fig. 17B droite). La cromakalim n'a aucun effet sur la contraction maximale dans aucun des groupes.

Ces résultats démontrent que la réponse des anneaux d'aorte au KCl est diminuée durant la gestation autant chez les rates contrôles que chez celles qui reçoivent le canrénoate de potassium. De façon similaire, on remarque que le traitement n'a pas d'effet sur l'inhibition de la réponse au KCl par la nifédipine. Toutefois, la réactivité de l'aorte en présence de NS1619 est renversée par l'administration de canrénoate de potassium. La cromakalim n'a eu aucun effet dans les différents groupes.

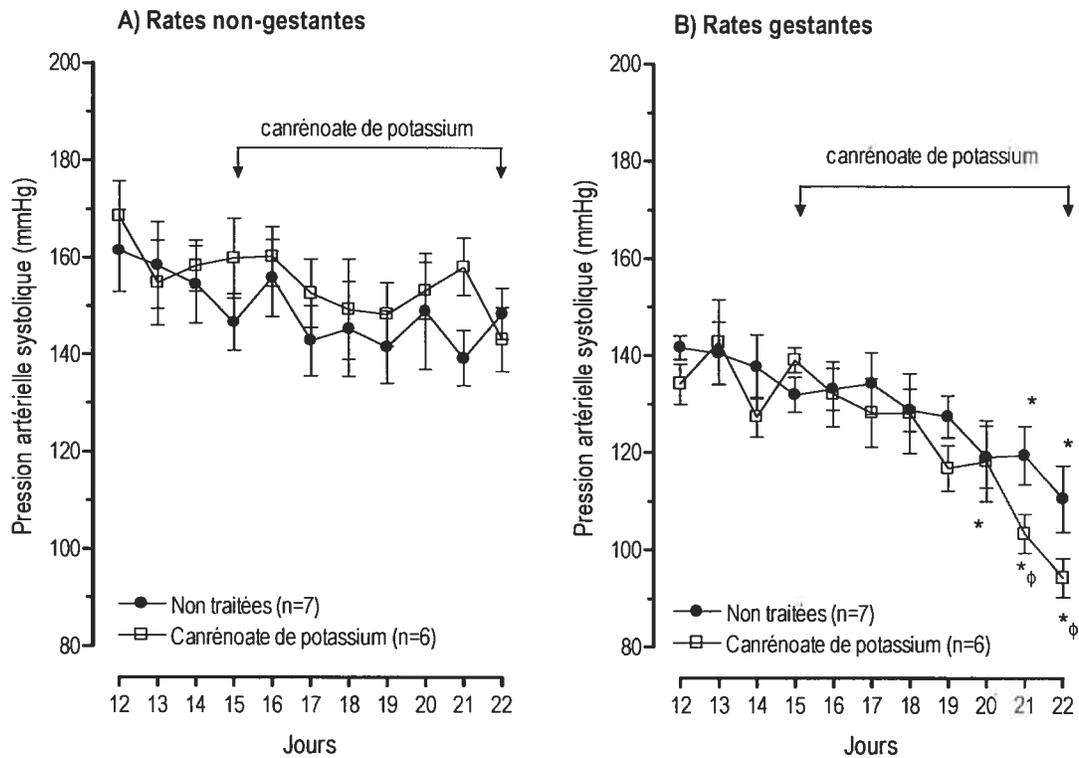


Figure 15: Effets du traitement au canrénoate de potassium sur la pression artérielle des rates non gestantes (A) et gestantes (B). Les flèches indiquent la période de traitement. Entre parenthèses, on retrouve le nombre de rates utilisées. Les points représentent les moyennes et les barres d'erreurs, l'erreur standard (ESM). *, significativement différent par comparaison à la période de prétraitement, φ, significativement différent des rates non traitées.

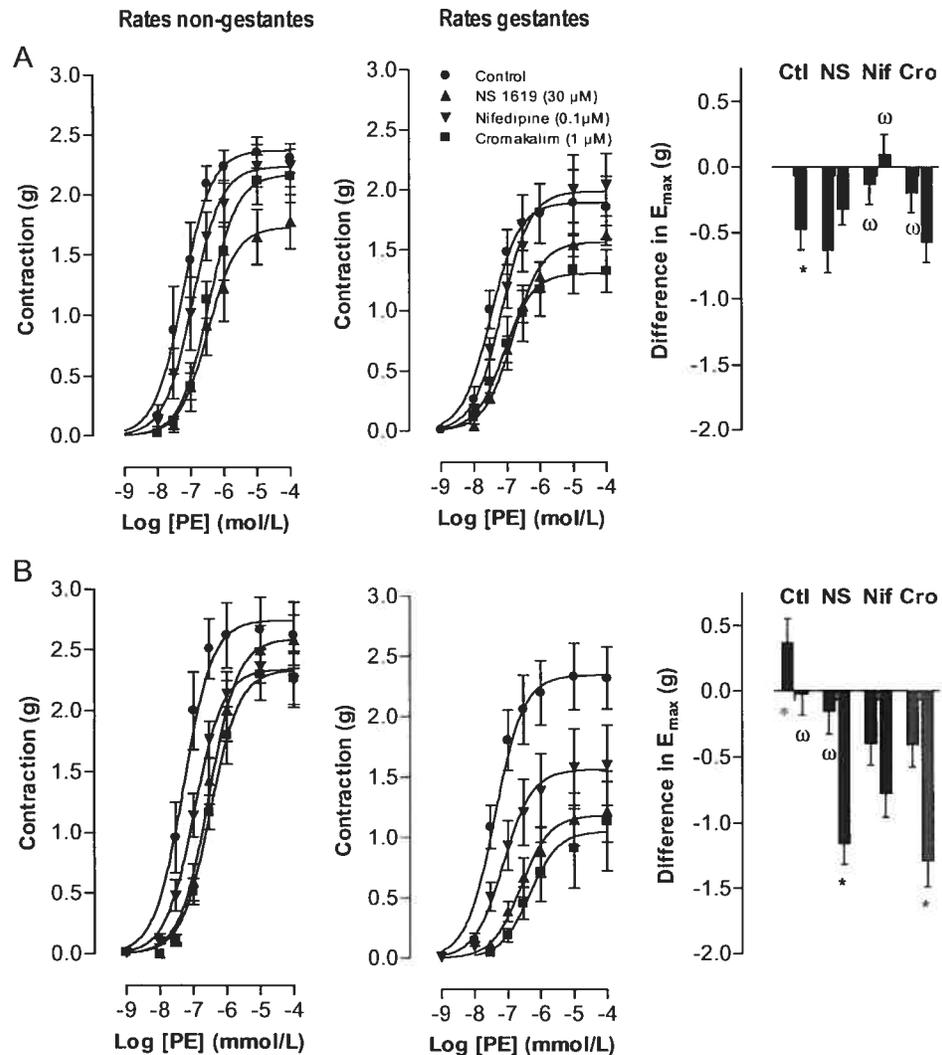


Figure 16: Courbes concentration-réponse à la PhE sur des anneaux aortiques de rates non gestantes (gauche) et gestantes (centre) qui sont soit non traitées (A) ou traitées au canrénoate de potassium (B). Les courbes ont été obtenues en l'absence (contrôle) et en présence de (en $\mu\text{mol/L}$) 0.1 nifédipine, 1 cromakalim ou 30 NS1619. Les colonnes jumelées (aortes de rates non gestantes et gestantes, panneau de droite) montrent les différences dans les réponses maximales (E_{max}) par rapport à une réponse relative; pour les contrôles (ctl), la comparaison se fait avec les rates non gestantes non traitées, tandis que pour la nifédipine (Nif), la cromakalim (Cro) et le NS-1619 (NS), la comparaison se fait avec les non gestantes ou gestantes du même traitement. ω , indique les valeurs qui ne sont pas différentes de zéro. * différence significative entre les aortes de non gestantes et gestantes recevant un même traitement.

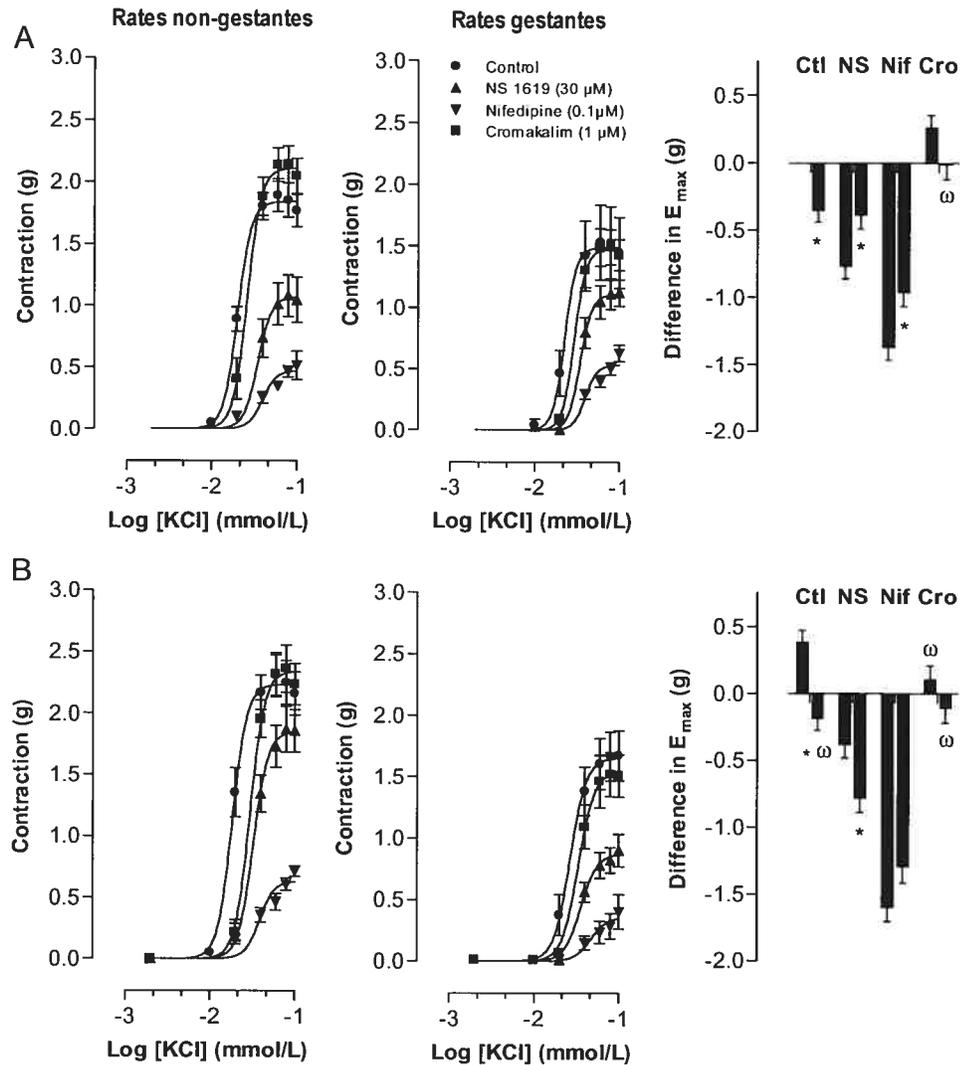


Figure 17 : Courbes concentration-réponse au KCl sur des anneaux aortiques de rates non gestantes (gauche) et gestantes (centre) qui sont soit non traitées (A) ou traitées au canrénoate de potassium (B). Les courbes ont été obtenues en l'absence (contrôle) et en présence de (en μ mol/L) 0.1 nifédipine, 1 cromakalim ou 30 NS1619. Les colonnes jumelées (aortes de rates non gestantes et gestantes, panneau de droite) montrent les différences dans les E_{max} des courbes par rapport à une réponse relative; pour les contrôles (ctl), la comparaison se fait avec les rates non gestantes non traitées, tandis que pour la nifédipine (Nif), la cromakalim (Cro) et le NS-1619 (NS), la comparaison se fait avec les non gestantes ou gestantes du même traitement. ω , indique les valeurs qui ne sont pas différentes de zéro. * différence significative entre les aortes de non gestantes et gestantes recevant un même traitement.

IV. DISCUSSION

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire durant la grossesse sont mal connus et toujours à l'étude. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les changements hémodynamiques de la grossesse. Dans notre laboratoire, on a démontré que le SRAA est impliqué dans cette régulation puisque qu'une inactivation de ce système entraîne des modifications de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire. En effet, en donnant à des rates gestantes un supplément sodique (0.9% ou 1.8% NaCl), on arrive à inhiber la baisse de pression artérielle de la gestation et à augmenter la réactivité vasculaire, créant ainsi une condition s'apparentant à l'hypertension gestationnelle expérimentale (12; 15). Le but de ce projet était d'étudier les mécanismes affectant les fonctions vasculaires et hémodynamiques de la gestation normale et de l'hypertension gestationnelle expérimentale. Pour ce faire, le projet a été divisé en deux volets. Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de la Na^+/K^+ -ATPase dans le contrôle de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire puis nous avons également tenu à évaluer l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes sur ces mêmes fonctions.

Inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase (PST 2238)

Nous savons que le potentiel de membrane influence les changements hémodynamiques de la grossesse. Pour cette raison, dans la première partie du projet, nous avons tenu à évaluer l'implication de la pompe à sodium, qui est une unité régulatrice importante du potentiel membranaire, dans la grossesse et dans l'hypertension gestationnelle expérimentale. Pour ce faire nous avons traité des rates gestantes sous diète normale ou recevant un supplément sodique (0.9% NaCl) avec du PST 2238 durant les 7 derniers jours de la gestation. Plusieurs paramètres physiologiques ont été mesurés pour vérifier l'impact du traitement (Tableaux 1 à 5). Parmi tous les paramètres mesurés, seules les composantes du SRAA ont été modifiées. Comme observé précédemment, les niveaux d'aldostérone et de PRA ont été diminués par la diète supplémentée en sodium (15). On constate également que la corticostérone est diminuée par la diète sodique (Fig. 18) mais lorsqu'on regarde les valeurs de chaque groupe individuellement (tableau 4), il semble que ce serait l'impact, encore inconnu, du PST 2238 combiné au supplément sodique qui

rendrait cette liaison significative. De plus, nous notons un effet d'interaction avec le PST 2238 pour les données de PRA. En effet, lorsqu'on compare les valeurs de PRA, indépendamment de la diète (Fig. 18A), on constate que le traitement avec le PST 2238 induit une augmentation significative de ce paramètre. Cette réponse laisse croire que le PST 2238 accentue les effets de la grossesse puisqu'il est rapporté que normalement durant cette période on note une augmentation de la PRA. Il est également connu que des facteurs similaires aux digitaliques (modulateurs endogènes de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase) sont augmentés durant la grossesse (214). Au contraire, dans les cas d'hypertension essentielle et d'hypertension de grossesse chez l'humain, on observe une augmentation des niveaux plasmatiques de facteurs similaires à la digitale associée à une diminution de la PRA (24; 214; 233). Ces observations suggèrent qu'une influence endogène pourrait modifier l'action des facteurs similaires à la digitale sur la Na^+/K^+ -ATPase dans les deux conditions susmentionnées. Dans notre modèle d'hypertension gestationnelle (diète sodée) nous voyons également une baisse des niveaux de PRA. Nos observations avec le PST 2238 sont contraires aux résultats attendus. On aurait supposé que le PST 2238 bloquerait les effets des facteurs similaires à la digitale, maintiendrait les niveaux ou induirait une baisse de la PRA. Cependant, nous observons plutôt une augmentation de la PRA. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour expliquer cette observation.

Pour vérifier les changements hémodynamiques de la gestation, nous avons mesuré la pression artérielle systolique (Fig. 19). Comme attendu, on observe chez les gestantes non traitées, la diminution de pression liée à la grossesse. Malheureusement, nous n'avons pu reproduire, dans cette série d'expériences, l'inhibition de la baisse de pression artérielle précédemment observée en donnant un supplément sodique de 0.9% NaCl dans l'eau de breuvage pendant les 7 derniers jours de la gestation (15). Nous ne pouvons pas déterminer la cause de ce phénomène. Cependant, nous pouvons confirmer que les rates ont bien consommé le supplément sodique puisque leur consommation d'eau, leur volume urinaire et la concentration de sodium excrétée dans l'urine sont significativement plus élevés (Tableau 5). De plus, les effets de la diète sodée sur la réactivité vasculaire sont toujours présents. En effet, on peut évaluer cette réactivité par la valeur de la contraction à la PhE précédant la courbe de relaxation au KCl. On constate que le niveau de contraction est plus faible chez les rates gestantes que chez les non gestantes mais que celles qui ont

reçu un supplément sodique ont des niveaux de contraction équivalents aux non gestantes. L'ensemble de ces paramètres ressemble aux données préalablement rapportée par notre laboratoire (12; 15). Toutefois, il est peu probable que le nombre d'animaux utilisés soit en cause dans l'absence d'inhibition de la baisse de pression artérielle, une différence de cinq rats ne ferait pas varier suffisamment les points pour différencier les deux courbes et servirait simplement à diminuer légèrement les erreurs standards. Des modifications au niveau de la sensibilité au sel de la souche de rat ou des variations des conditions d'hébergement pourraient être impliquées et seraient plus plausibles pour expliquer la perte de reproductibilité des pressions. En effet, nos animaux sont maintenant hébergés dans un environnement assez différent quant à la régularité des cycles lumière-noiceur et il semble que notre fournisseur ait changé les géniteurs de la souche Sprague-Dawley que nous utilisons. L'impact de ces changements demeure à être confirmé.

Le traitement au PST 2238 n'induit aucune modification de la pression artérielle systolique. Dans notre hypothèse de départ, nous nous attendions à voir une diminution de la pression dans le groupe recevant la diète riche en sel puisque que le PST 2238 est un agent antihypertenseur, dans l'hypertension induite par la ouabaïne chez le rat (67; 69), et que nous suspectons qu'un facteur endogène similaire à la ouabaïne serait impliqué dans l'hypertension de grossesse. Malheureusement, comme nous n'avons pu reproduire sur ce paramètre notre modèle d'hypertension de grossesse, nous n'avons pas pu vérifier notre hypothèse.

Pour vérifier l'implication de la Na^+/K^+ -ATPase dans la réactivité vasculaire, des analyses dans des bains d'organes isolés ont été effectuées sur des anneaux d'aorte. La courbe de relaxation au KCl effectuée sur des aortes placées dans une solution physiologique sans K^+ et en présence de différentes concentrations de ouabaïne est proportionnelle à l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Dans un premier temps, nous avons comparé l'activité des rates gestantes avec celle des non gestantes et des gestantes recevant le supplément sodique. Nous avons pu remarquer que la relaxation au KCl, en l'absence de ouabaïne, est moins importante chez les rates gestantes que chez les non gestantes et qu'elle n'est pas affectée par la diète forte en sodium. Le groupe des gestantes est moins sensible à l'effet inhibiteur de la ouabaïne sur la relaxation au KCl que les deux autres groupes de gestantes, le profil d'inhibition est similaire chez les rates non gestantes et les gestantes recevant le supplément 0.9% NaCl. Cela pourrait être dû aux différentes

isoformes exprimées dans l'aorte. Plusieurs études ont démontré que la sous-unité $\alpha 2$ serait celle qui est couplée à la contractilité de muscles lisses vasculaires. En effet, à l'aide de souris invalidée pour les gènes de la sous-unité $\alpha 1$ ou $\alpha 2$, il a été possible de déterminer que $\alpha 2$ est l'isoforme principalement couplée aux signalisations contraction-relaxation (219; 264). Sa localisation, différente de $\alpha 1$, à proximité des réticulums sarcoplasmiques lui assure une colocalisation spatiale et fonctionnelle avec l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) qui lui permet d'assurer la régulation du Ca^{2+} intracellulaire (11; 105; 219; 264). L'hypertension dépendante du sodium ou induite par la ouabaïne partagent la même chaîne de mécanismes, i.e., l'augmentation d'entrée de Ca^{2+} via NCX1, qui est responsable de l'augmentation du tonus myogène et de la pression artérielle (99; 264). Toutefois, des études antérieures dans notre laboratoire ont démontré que l'expression de $\alpha 1$ dans l'aorte n'était pas modifiée par la gestation mais qu'elle était augmentée par le supplément sodique (130) tandis que Fedorova et al (64) ont démontré une augmentation de $\alpha 1$ dans la gestation, qui est accrue par le supplément sodique, sans changement dans l'expression de $\alpha 2$. Les modifications de réactivité observées ne peuvent donc pas être dues entièrement au rôle de $\alpha 2$. Les concentrations de ouabaïne utilisées sont d'ailleurs suffisamment élevées pour inhiber toutes les isoformes même si $\alpha 2$ a une plus grande affinité pour la ouabaïne chez les rongeurs (170; 219). Nous croyons qu'un facteur circulant affectant l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase pourrait donc être responsable des modifications que nous observons.

Il a été démontré que durant la grossesse chez l'humain, les niveaux de substances immunoréactives similaires à la digoxin augmentent progressivement et significativement durant la grossesse et retournent à la normale durant la période post-partum (79). L'inhibition de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase augmente également de façon significative mais pas aussi rapidement que les facteurs similaires à la digitale et elle reste élevée environ 6 semaines après l'accouchement. Cela suggère que les récepteurs de ces substances immunoréactives similaires à la digoxin pourrait être désensibilisés induisant un découplage entre la concentration de molécules et la réponse observée (79). Plus spécifiquement, Lopatin et al (137) ont détecté les taux de MBG, un bufodienolide qui inhibe plus particulièrement la sous-unité $\alpha 1$ de la Na^+/K^+ -ATPase (63), et de OLF, des stéroïdes cardiotoniques qui sont plus spécifiques pour $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (63; 219; 264). Ils ont

déterminé que durant la grossesse humaine les niveaux de MBG augmentent sans que ceux de OLF soient modifiés tandis que dans les cas de prééclampsie, on note des augmentations des deux composés (137). L'excrétion rénale des mêmes composés, soit la MBG et la ouabaïne endogène (OE), a été mesurée chez des rates non gestantes, gestantes avec diète normale ou avec un supplément sodique. La gestation normale a entraîné, en comparaison avec les non gestantes, des augmentations modérées de l'excrétion rénale de MBG et de OE tandis que chez les rates gestantes recevant le supplément sodique, en comparaison avec celles recevant la diète normale, on a observé un accroissement de l'excrétion rénale de MBG seulement. De plus, l'administration d'anticorps anti-MBG a diminué la pression artérielle systolique et a augmenté l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase (64).

En se basant sur ces données, nous avons injectés du PST 2238 à des rates gestantes sous diète normale ou recevant un supplément sodé de 0.9% NaCl et nous avons évalué l'activité et l'expression de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'aorte. Le PST 2238 est intéressant puisqu'il a une activité agoniste négligeable et une forte activité antagoniste de la ouabaïne (70; 264). Lorsque les rates recevant une diète normale sont traitées avec cette molécule, on remarque que l'activité totale de la pompe à sodium des aortes est grandement augmentée. De plus, l'effet inhibiteur de la ouabaïne est plus important dans le groupe recevant le traitement. Chez les rates recevant la diète sodée, on ne note aucune différence d'activité ou de l'effet inhibiteur de la ouabaïne avec le traitement au PST 2238. Afin de déterminer si la différence d'activité est la résultante de modifications de l'expression des sous-unités de la pompe, celle-ci a été déterminé par immunobuvardage de type western. On note, comme observé précédemment (64; 130), que lorsque les rates gestantes reçoivent le supplément sodé, seule l'expression de $\alpha 1$ est augmentée, on n'observe aucun changement pour $\alpha 2$. Notons que la relaxation maximale n'est pas modifiée. Le traitement au PST 2238 induit, quant à lui, des augmentations de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le groupe recevant la diète normale mais n'a pas d'effet dans le groupe recevant la diète 0.9% NaCl puisque les valeurs d'expression de $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont similaires au groupe de gestante sous diète normale. Le profil d'expression des sous-unités de la pompe est donc en accord avec les données d'activité de celle-ci (relaxation au KCl) et cela peut expliquer les différences que nous observons. En effet, puisqu'il y a plus de pompes exprimés dans l'aorte des rates traitées au PST 2238, elles

peuvent être impliquées dans l'augmentation de l'activité de la pompe qui se reflète par une plus grande relaxation du vaisseau. De plus, si le PST 2238 déplace un facteur similaire à la ouabaine endogène, il y aurait plus de sites disponibles pour l'inhibition *in vitro* par la ouabaine. Le PST 2238 est reconnu pour normaliser l'endocytose de la Na^+/K^+ -ATPase dans les cellules traitées à la ouabaine qui démontrent une augmentation de la pompe associée à une diminution du taux d'internalisation (67). Un facteur endogène ou une altération de la fonction de la sous-unité $\alpha 1$ serait présent chez la rates supplémentées en sodium, ce qui expliquerait l'augmentation de $\alpha 1$ sans la modification de l'activité. Ce facteur pourrait influencer l'effet inhibiteur de la ouabaine puisqu'il pourrait déjà occuper un site de liaison qui empêche la ouabaine de se lier à la pompe. Toutefois, il serait intéressant de vérifier la réponse inhibitrice avec un agent plus spécifique pour $\alpha 1$, tel que la MBG, et de comparer son effet inhibiteur avec celui de la ouabaine qui est plus spécifique pour $\alpha 2$. D'autres études seront toutefois nécessaires pour confirmer l'implication d' $\alpha 1$ dans les modification de réactivité vasculaire que nous observons.

Pour conclure cette partie, on constate que la gestation entraîne des changements dans la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase au niveau vasculaire et que le supplément sodique, même si dans cette série d'expérience il n'a pas modifié la pression, est suffisamment important pour influencer le métabolisme du sel chez la rate. De plus, le traitement au PST 2238 permet de démontrer qu'un facteur endogène serait impliqué dans la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase durant la grossesse et dans les conditions d'hypertension gestationnelle. C'est ce que je tenterai de déterminer dans la poursuite de mes travaux.

Inhibition des récepteurs des minéralocorticoïdes (canrénoate de potassium)

Pour atteindre notre second objectif, nous avons traité des rates non gestantes et gestantes avec du canrénoate de potassium, un antagoniste des récepteurs des minéralocorticoïdes, pendant 7 jours (dernière semaine de gestation sur trois). Le but de l'étude était d'administrer une dose de 20 mg/kg/jour dans l'eau de breuvage des rates. Cette dose avait déjà été utilisée par d'autres équipes qui ont démontré qu'elle inhibe complètement les effets cardiovasculaires de l'aldostérone (dont le remodelage) sans induire d'effets diurétiques chez les rats normaux (25; 26; 262).

Des études réalisées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que des altérations du SRAA durant la grossesse pouvaient modifier la pression artérielle. En effet, nous avons observé qu'une suractivation du SRAA, par une diminution de l'apport sodé, ne modifiait pas la pression (201) mais qu'une inhibition du SRAA, par une augmentation de cet apport, inhibait la baisse de pression observée durant la gestation (15). Nos résultats montrent qu'en ne bloquant qu'une seule des composantes du SRAA, l'aldostérone, par l'administration de canrénoate de potassium, la pression est modifiée d'une façon différente. Avec ce traitement, nous avons réussi à démontrer que les rates gestantes étaient plus sensibles au blocage des récepteurs des minéralocorticoïdes. En effet, nos résultats démontrent que le traitement n'affecte pas la pression artérielle systolique chez les rates non gestantes mais qu'il induit, chez les rates gestantes, une diminution de la pression artérielle systolique plus importante que celle observée durant la gestation. Les effets des anti-minéralocorticoïdes sur la pression artérielle ont déjà été mesurés sur des rats normaux (135) et sur des rats normaux âgés (123) et aucun changement significatif n'a été observé dans ces études. Toutefois, ces études utilisaient le spironolactone, un autre antagoniste des minéralocorticoïdes. Nos résultats peuvent quant même être comparés à ceux-là puisque lorsqu'ils sont métabolisés *in vivo*, les deux composés ont le même métabolite actif, le canrénone.

Cette accentuation de la chute de pression artérielle par le canrénoate observée seulement durant la gestation pourrait être dû en partie à la progestérone. Cette hormone, dont les niveaux sont augmentés durant la grossesse, possède un effet natriurétique et hypotenseur puisqu'il est en compétition avec les minéralocorticoïdes pour leur récepteur de type 1 (171). On peut donc suggérer que l'effet antagoniste du canrénoate de potassium, sur les récepteurs des minéralocorticoïdes, pourrait s'ajouter à celui de la progestérone et ainsi induire la baisse de pression plus importante que nous observons. Une autre étude a démontré que le canrénone pouvait avoir un effet hypotenseur. De Mendonca et al (50) ont démontré qu'un traitement chronique de canrénone (60 mg/kg/jour), chez des rats Wistar avec une masse rénale réduite et qui reçoivent un supplément 0.8% NaCl dans l'eau de breuvage, atténue l'augmentation de pression, normalement observé chez ces animaux, dès le 5^e jour de traitement. Les auteurs supposent que cet effet serait entre autre dû à une compétition avec les facteurs endogènes similaires à la ouabaine (Ouabain-like factor; OLF). Plusieurs études supportent cette

hypothèse; par exemple Ferrari et al (66) ont utilisé deux souches de rats génétiquement hypertendus, des rats milan hypertendus (MHS) et des rats spontanément hypertendus (SHR), pour comparer les effets du canrénone et de l'hydrochlorothiazide, un puissant diurétique. Le canrénone n'a eu aucun impact chez les SHR tandis qu'il a diminué la pression artérielle chez les MHS, un phénomène qui ne peut s'expliquer par un effet diurétique puisque l'hydrochlorothiazide n'a pas modifié la pression dans aucun des groupes (66). Chez l'humain, il existe des sous-groupes de patients essentiellement hypertendus qui répondent seulement à un traitement au canrénate de potassium sans être influencé par l'hydrochlorothiazide ou le furosémide tandis que d'autres n'y répondent pas du tout. Ceux qui répondent sélectivement au canrénate de potassium ont une activité de cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ plus élevée et une PRA plus faible (81). On peut donc suggérer que l'effet hypotenseur du canrénate de potassium que nous observons est grandement influencé par différentes caractéristiques individuelles parmi lesquelles on retrouve les concentrations d'OLF, les niveaux d'activation du SRAA (particulièrement la PRA) et les niveaux de cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. De plus, il est connu que des excès de minéralocorticoïdes sont associés avec des changements de la perméabilité membranaire des muscles lisses vasculaires aux ions, ainsi qu'à une augmentation de la réponse aux agents presseurs, évidente bien avant que l'augmentation de pression sanguine apparaisse (84).

Dans cette étude, nous démontrons, comme décrit précédemment, que la réactivité vasculaire à la PhE et au KCl est diminuée dans les aortes des rates gestantes comparativement à celle des non gestantes (12; 33; 152; 200). Cette différence est maintenue en présence de KCl mais pas avec la PhE dans les groupes traités avec le canrénate de potassium. Cela peut suggérer que le traitement au canrénate, durant la gestation, affecte les mécanismes de vasoconstriction liés à des récepteurs, comme celui de la PhE, de façon plus importante que ceux dépendant de la dépolarisation, dans les muscles lisses de l'aorte. Sorrentino et al (226) suggèrent plutôt que le spironolactone, le canrénate de potassium et le canrénone agiraient probablement en inhibant les canaux VDCC puisqu'ils observent sur des aortes *in vitro* que les contractions induites par la PhE et le KCl, qui résultent d'un influx de calcium intracellulaire, sont inhibées par ces agents.

On sait depuis longtemps que les canaux ioniques dans les muscles lisses vasculaires sont impliqués dans la vasoconstriction de même que dans la modulation du

tonus et de la réactivité vasculaire (12; 33; 152; 200). Dans notre étude, nous rapportons aussi que le blocage des canaux calciques (nifédipine 0.1 $\mu\text{mol/L}$) est plus efficace que l'activation des canaux K_{ATP} (cromakalim 1 $\mu\text{mol/L}$) et des canaux BK_{Ca} (NS 1619 30 $\mu\text{mol/L}$) à bloquer la réponse au KCl. La réponse à la PhE, quant à elle, est peu sensible au blocage des canaux calciques mais elle est inhibée par l'activation des canaux potassiques (12; 33). Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment publiés par notre laboratoire, même si l'amplitude de l'inhibition de la réponse à la PhE par les activateurs des canaux potassiques, particulièrement la cromakalim, est plus petite que celle rapportée précédemment (12; 33). Le même profil de réponse est maintenu dans les groupes recevant le canrénoate de potassium mais les effets inhibiteurs sont plus importants. Sans traitement au canrénoate, les activateurs de K_{ATP} et de BK_{Ca} et l'inhibiteur de VDCC sont plus puissants pour bloquer la réponse à la PhE dans les aortes de rates gestantes que de non gestantes, comparativement aux groupes non traités. Cela implique que le traitement au canrénoate de potassium durant la dernière semaine de gestation sur trois pourrait activer ces canaux ioniques ou augmenter leur expression, tout au moins pourrait agir directement sur les cellules musculaires lisses. Cela est également supporté par les effets inhibiteurs du NS 1619 et de la nifédipine sur la contraction au KCl, même s'ils sont d'une moins grande ampleur. De plus, on note que l'effet inhibiteur de la cromakalim n'est pas modifié par le traitement. Cela peut s'expliquer par le fait que le canrénoate est aussi un antagoniste de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (34; 216; 226; 227). Glavind-Kristensen et al (80) suggèrent que l'inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase prévient en partie l'activation des canaux K_{ATP} induit par la cromakalim en changeant l'environnement local des K_{ATP} (i.e. des augmentations du ratio ATP/ADP et /ou des diminutions du gradient transmembranaire de potassium).

Nous avons démontré précédemment que les canaux potassiques (BK_{Ca} et K_{ATP}) ont un rôle important dans le contrôle du potentiel de membrane et dans la diminution, liée à la gestation, de la réponse vasculaire à la PhE, à l'AVP et au KCl (33). Contrairement aux résultats que nous obtenons en traitant les animaux avec le canrénoate de potassium, Sorrentino et al (226) ne voient pas d'implication, *in vitro*, de ces canaux en réponse au spironolactone, au canrénoate de potassium et au canrénone. Il a également été prouvé que l'expression des BK_{Ca} n'est pas modifiée par l'aldostérone mais qu'elle est diminuée par les glucocorticoïdes (29) ce qui suggère que la différence que nous observons est liée à des

modifications de l'activité du canal. Plusieurs personnes s'entendent toutefois sur l'implication importante des BK_{Ca} dans la régulation du potentiel de membrane et de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ (166; 202).

On sait que la proportion de canaux calciques dans différents états fonctionnels (fermé, ouvert et inactivé) est régie par le potentiel de membrane (166). Nous avons démontré précédemment que l'activité des VDCC, mais pas la densité des molécules, est diminuée durant la grossesse dans les anneaux aortiques (199), les artères mésentériques (230) et les cellules de la zone glomérulée du cortex surrénalien (222). En contraste avec nos résultats qui montrent une augmentation de la force contractile des aortes des rates traitées au canrénoate, plusieurs études *in vitro* sur l'aorte ont rapportés que les antagonistes de l'aldostérone inhibent les réponses contractiles. Mironneau a démontré que le spironolactone agit sur les canaux calciques lents de façon similaire aux bloqueurs des canaux calciques pour inhiber ces réponses (156). Cela est également supporté par Wheling qui suggère que les effets rapides de l'aldostérone sont insensibles au spironolactone (254).

Pour conclure cette partie, nous observons que le canrénoate de potassium induit une diminution de la pression artérielle plus importante que celle induite par la gestation. Il augmente également la réactivité vasculaire à la PhE et au KCl chez les non gestantes et chez les gestantes. Il a aussi accru les effets des modulateurs des canaux ioniques mais de façon généralement plus importante durant la gestation. Nous suggérons donc que les récepteurs de minéralocorticoïdes ont un rôle important dans le maintien de la baisse de pression artérielle et de réactivité vasculaire durant la gestation, les mécanismes cellulaires impliqués demeurent cependant à être documentés.

V. PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis de faire progresser nos connaissances sur les modifications hémodynamiques de la gestation et de l'hypertension gestationnelle. Il est évident que ces modifications ne sont pas résultantes d'un seul phénomène mais bien de l'agencement de plusieurs mécanismes qui veillent au bon développement du fœtus et qui permettent à l'organisme maternel d'être un hôte approprié. Nous avons déterminé que le SRAA est une partie déterminante du contrôle des fonctions hémodynamiques. D'autres études seront toutefois nécessaires pour approfondir le rôle de ces différentes composantes. De plus, nous avons déterminé que les canaux et pompes ioniques s'adaptent pour maintenir la résistance périphérique et la pression artérielle sous contrôle. Dans des études ultérieures, nous essayerons, en continuité à la première partie du projet, d'approfondir nos connaissances sur la régulation de la Na^+/K^+ -ATPase durant la grossesse et nous tenterons de mieux caractériser le facteur endogène qui influencerait cette régulation. Dans un premier temps, nous devons développer une méthode pour mesurer précisément la faible activité Na^+/K^+ -ATPase dans les vaisseaux sanguins. Déjà quelques options sont envisagées, comme la captation de rubidium ou le dosage par HPLC de quantité infinitésimal de conversion d'ATP en ADP (95). Puis, nous pourrions mieux évaluer l'implication de la sous-unité $\alpha 1$ en utilisant un antagoniste qui est plus spécifique à cette sous-unité, tel que la marinobufagénine, comparativement à la ouabaïne qui est plus spécifique pour la sous-unité $\alpha 2$. Nous tenterons également de mieux définir l'interaction entre les facteurs similaires à la digitale et la PRA. Il serait intéressant d'évaluer la fonctionnalité et l'expression de la Na^+/K^+ -ATPase lorsque le SRAA est modifié. Par exemple, dans le modèle de diète pauvre en sodium (201), dans lequel la rénine est fortement activée, il faudrait observé l'impact du traitement au PST 2238.

Pour faire suite à la deuxième partie du projet, il faudra déterminer comment la résistance périphérique et la pression artérielle sont régulés par les différentes composantes du SRAA et nous évaluerons l'impact de cette régulation sur la réactivité vasculaire. Dans un premier temps, nous approfondirons le rôle de l'aldostérone dans les changements hémodynamiques de la grossesse. Pour ce faire, nous administrerons de l'aldostérone aux rates non gestantes ou à des rates gestantes sous supplément sodique (aldostérone diminuée) puis la pression artérielle et la réactivité vasculaire, plus particulièrement l'implication des canaux calciques, potassiques et de la Na^+/K^+ -ATPase,

seront étudiées. L'expression des canaux ioniques pourra également être mesurée, pour vérifier leur modulation par le traitement, de même que l'expression des récepteurs des minéralocorticoïdes et des éléments de leur voie de signalisation.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Abdalla S, Lothar H, el MA and Quitterer U.** Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7: 1003-1009, 2001.
2. **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.
3. **Aiello EA, Malcolm AT, Walsh MP and Cole WC.** Beta-adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K⁺ channels of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275: H448-H459, 1998.
4. **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.
5. **Albert AP and Large WA.** Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium* 33: 345-356, 2003.
6. **Albert AP, Piper AS and Large WA.** Properties of a constitutively active Ca²⁺-permeable non-selective cation channel in rabbit ear artery myocytes. *J Physiol* 549: 143-156, 2003.
7. **Alioua A, Huggins JP and Rousseau E.** PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 268: L1057-L1063, 1995.
8. **Antolovic R, Bruller HJ, Bunk S, Linder D and Schoner W.** Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the alpha subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur J Biochem* 199: 195-202, 1991.
9. **Aperia A, Ibarra F, Svensson LB, Klee C and Greengard P.** Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity in renal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7394-7397, 1992.
10. **Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG and Campbell KP.** Gamma 1 subunit interactions within the skeletal

- muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 278: 1212-1219, 2003.
11. **Arnon A, Hamlyn JM and Blaustein MP.** Ouabain augments Ca(2+) transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na(+). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H679-H691, 2000.
 12. **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.
 13. **Baines AD, Ho P and Drangova R.** Proximal tubular dopamine production regulates basolateral Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 262: F566-F571, 1992.
 14. **Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC and Cox DH.** Mapping the BKCa channel's "Ca2+ bowl": side-chains essential for Ca2+ sensing. *J Gen Physiol* 123: 475-489, 2004.
 15. **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.
 16. **Beggah AT, Beguin P, Jaunin P, Peitsch MC and Geering K.** Hydrophobic C-terminal amino acids in the beta-subunit are involved in assembly with the alpha-subunit of Na,K-ATPase. *Biochemistry* 32: 14117-14124, 1993.
 17. **Beggah AT, Jaunin P and Geering K.** Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 272: 10318-10326, 1997.
 18. **Belizan JM, Pineda O, Sainz E, Menendez LA and Villar J.** Rise of blood pressure in calcium-deprived pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 141: 163-169, 1981.
 19. **Bird IM, Zheng J, Cale JM and Magness RR.** Pregnancy induces an increase in angiotensin II type-1 receptor expression in uterine but not systemic artery endothelium. *Endocrinology* 138: 490-498, 1997.

20. **Blanc B, Agher JP, Boubli L and Ruf H.** Les constantes biologiques au cours de la grossesse. In: *Encycl Med Chir*, 1988, p. 1-24.
21. **Blanc B, Comte M, Boubli L and et al.** Modifications de l'organisme maternel au cours de la grossesse. In: *Encycl Med Chir*, 1988, p. 1-118.
22. **Blanco G, Koster JC, Sanchez G and Mercer RW.** Kinetic properties of the alpha 2 beta 1 and alpha 2 beta 2 isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 34: 319-325, 1995.
23. **Bohlender J, Ganten D and Luft FC.** Rats transgenic for human renin and human angiotensinogen as a model for gestational hypertension. *J Am Soc Nephrol* 11: 2056-2061, 2000.
24. **Borghi C, Boschi S, Munarini A, Mussi A, Costa FV and Ambrosioni E.** Short-term plasma renin activity suppression by saline and release of a plasma endogenous Na/K ATPase inhibitor in essential hypertension. *Am J Hypertens* 3: 98-104, 1990.
25. **Bos R, Mougenot N, Findji L, Mediani O, Vanhoutte PM and Lechat P.** Inhibition of catecholamine-induced cardiac fibrosis by an aldosterone antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 8-13, 2005.
26. **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.
27. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
28. **Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ER, Nelson MT and Horowitz B.** Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 515 (Pt 3): 639-651, 1999.
29. **Brem AS, Bina RB, Mehta S and Marshall J.** Glucocorticoids inhibit the expression of calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Mol Genet Metab* 67: 53-57, 1999.

30. **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.
31. **Brown MA, Wang J and Whitworth JA.** The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens* 19: 713-726, 1997.
32. **Buhagiar KA, Hansen PS, Gray DF, Mihailidou AS and Rasmussen HH.** Angiotensin regulates the selectivity of the Na⁺-K⁺ pump for intracellular Na⁺. *Am J Physiol* 277: C461-C468, 1999.
33. **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.
34. **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.
35. **Catterall WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555, 2000.
36. **Cavanagh D, Rao PS, Knuppel RA, Desai U and Balis JU.** Pregnancy-induced hypertension: development of a model in the pregnant primate (*Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol* 151: 987-999, 1985.
37. **Cavanagh D, Rao PS, Tsai CC and O'Connor TC.** Experimental toxemia in the pregnant primate. *Am J Obstet Gynecol* 128: 75-85, 1977.
38. **Cheong A, Dedman AM and Beech DJ.** Expression and function of native potassium channel [K(V)alpha1] subunits in terminal arterioles of rabbit. *J Physiol* 534: 691-700, 2001.
39. **Cheong A, Dedman AM, Xu SZ and Beech DJ.** K(V)alpha1 channels in murine arterioles: differential cellular expression and regulation of diameter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1057-H1065, 2001.
40. **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.

41. **Combs CA, Katz MA, Kitzmiller JL and Brescia RJ.** Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 169: 215-223, 1993.
42. **Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE and Mosher MD.** Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 7: 566-571, 1993.
43. **Conrad KP, Miles TM and Benyo DF.** Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 40: 102-111, 1998.
44. **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.
45. **Crews JK, Herrington JN, Granger JP and Khalil RA.** Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension* 35: 367-372, 2000.
46. **Cross JC.** The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 64: 96-103, 2003.
47. **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.
48. **Dart C and Standen NB.** Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol* 471: 767-786, 1993.
49. **Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, Sethi S, Weiss RM and Bates JN.** Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 39: 337-342, 2002.
50. **de MM, Grichois ML, Pernollet MG, Thorman B, Meyer P, Devynck MA and Garay R.** Hypotensive action of canrenone in a model of hypertension where ouabain-like factors are present. *J Hypertens Suppl* 3: S73-S75, 1985.
51. **Delprat B, Bibert S and Geering K.** [FXYP proteins: novel regulators of Na,K-ATPase]. *Med Sci (Paris)* 22: 633-638, 2006.

52. **Derrickson BH and Mandel LJ.** Parathyroid hormone inhibits Na(+)-K(+)-ATPase through Gq/G11 and the calcium-independent phospholipase A2. *Am J Physiol* 272: F781-F788, 1997.
53. **Descamps P, Marret H, Binelli C, Chaplot S and Gillard P.** [Body changes during pregnancy]. *Neurochirurgie* 46: 68-75, 2000.
54. **DiFederico E, Genbacev O and Fisher SJ.** Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 155: 293-301, 1999.
55. **Dupont A.** Disappearance of spironolactone-induced gynaecomastia during treatment with potassium canrenoate. *Lancet* 2: 731, 1985.
56. **Earley S, Waldron BJ and Brayden JE.** Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res* 95: 922-929, 2004.
57. **Edouard DA, Pannier BM, London GM, Cuhe JL and Safar ME.** Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol* 274: H1605-H1612, 1998.
58. **Edwards DL, Arora CP, Bui DT and Castro LC.** Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1. *Am J Obstet Gynecol* 175: 484-488, 1996.
59. **Elkayam U.** Pregnancy and Cardiovascular Disease. In: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Elsevier, 2005, p. 1965-1984.
60. **Eriksson UJ.** Importance of genetic predisposition and maternal environment for the occurrence of congenital malformations in offspring of diabetic rats. *Teratology* 37: 365-374, 1988.
61. **Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA and Bakker WW.** A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 171: 158-164, 1994.
62. **Fallgren B, Bjellin L and Edvinsson L.** Effect of pregnancy and sex steroids on alpha 1-adrenoceptor mechanisms in the guinea-pig uterine vascular bed. *Pharmacol Toxicol* 63: 375-381, 1988.

63. **Fedorova OV and Bagrov AY.** Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *Am J Hypertens* 10: 929-935, 1997.
64. **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.
65. **Ferrandi M, Barassi P, Minotti E, Duzzi L, Molinari I, Bianchi G and Ferrari P.** PST 2238: a new antihypertensive compound that modulates renal Na-K pump function without diuretic activity in Milan hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 881-889, 2002.
66. **Ferrari P, Ferrandi M, Minotti E, Duzzi L and Bianchi G.** Effect of canrenone and hydrochlorothiazide on the development of hypertension in rat models of genetic hypertension. *J Hypertens Suppl* 11: S330-S331, 1993.
67. **Ferrari P, Ferrandi M, Torielli L, Barassi P, Tripodi G, Minotti E, Molinari I, Melloni P and Bianchi G.** Antihypertensive compounds that modulate the Na-K pump. *Ann N Y Acad Sci* 986: 694-701, 2003.
68. **Ferrari P, Ferrandi M, Tripodi G, Torielli L, Padoani G, Minotti E, Melloni P and Bianchi G.** PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates Na,K-ATPase in genetic hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1074-1083, 1999.
69. **Ferrari P, Ferrandi M, Valentini G and Bianchi G.** Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na⁺-K⁺-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R529-R535, 2006.
70. **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.
71. **Fitzgerald DJ, Entman SS, Mulloy K and FitzGerald GA.** Decreased prostacyclin biosynthesis preceding the clinical manifestation of pregnancy-induced hypertension. *Circulation* 75: 956-963, 1987.

72. **Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, Mayo G and FitzGerald GA.** Thromboxane A₂ synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 335: 751-754, 1990.
73. **FitzGerald GA, Brash AR, Falardeau P and Oates JA.** Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation of normal man. *J Clin Invest* 68: 1272-1276, 1981.
74. **Gabbe.** Endocrinology and diagnosis of pregnancy. In: *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*, Churchill Livingstone Inc, 2002.
75. **Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ and Garcia ML.** Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265: 11083-11090, 1990.
76. **Geering K, Meyer DI, Paccolat MP, Kraehenbuhl JP and Rossier BC.** Membrane insertion of alpha- and beta-subunits of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 260: 5154-5160, 1985.
77. **Genbacev O, DiFederico E, McMaster M and Fisher SJ.** Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia. *Hum Reprod* 14 Suppl 2: 59-66, 1999.
78. **Gerber RT, Anwar MA and Poston L.** Enhanced acetylcholine induced relaxation in small mesenteric arteries from pregnant rats: an important role for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). *Br J Pharmacol* 125: 455-460, 1998.
79. **Gilson GJ, Graves SW, Qualls CR and Curet LB.** Digoxin-like immunoreactive substance and sodium-potassium-adenosine triphosphatase inhibition in normal pregnancy: a longitudinal study. *Obstet Gynecol* 89: 743-746, 1997.
80. **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.
81. **Glorioso N, Tonolo G, Troffa C, Soro A, Manunta P, Madeddu P, Sabino G, Pinna-Parpaglia P and Realdi G.** Recognition of markers of response to potassium-canrenoate in essential hypertension. *Steroids* 60: 105-109, 1995.

82. **Glynn IM.** Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *J Physiol* 462: 1-30, 1993.
83. **Golden JG, Hughes HC and Lang CM.** Experimental toxemia in the pregnant guinea pig (*Cavia porcellus*). *Lab Anim Sci* 30: 174-179, 1980.
84. **Gomez Sanchez EP.** Mineralocorticoid modulation of central control of blood pressure. *Steroids* 60: 69-72, 1995.
85. **Gorelik G, Carbini LA and Scieli AG.** Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 403-410, 1998.
86. **Granger JP.** Maternal and fetal adaptations during pregnancy: lessons in regulatory and integrative physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1289-R1292, 2002.
87. **Guber HA, Farag AF, Lo J and Sharp J.** Evaluation of endocrine function. In: McPherson & Pincus: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, W. B. Saunders Company, 2006, p. 326-363.
88. **Guenther AE, Conley AJ, Van Orden DE, Farley DB and Ford SP.** Structural and mechanical changes of uterine arteries during pregnancy in the pig. *J Anim Sci* 66: 3144-3152, 1988.
89. **Gutkowska J, Boucher R and Genest J.** [Radioimmunologic determination of plasma renin activity]. *Union Med Can* 106: 446-450, 1977.
90. **Hart MV, Morton MJ, Hosenpud JD and Metcalfe J.** Aortic function during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 154: 887-891, 1986.
91. **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.
92. **Hefler LA, Tempfer CB, Bancher-Todesca D, Schatten C, Husslein P, Heinze G and Gregg AR.** Placental expression and serum levels of cytokeratin-18 are increased in women with preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 8: 169-173, 2001.

93. **Heilmann L.** Blood rheology and pregnancy. *Baillieres Clin Haematol* 1: 777-799, 1987.
94. **Houde V.** *Effets de l'administration d'un antagoniste du récepteur des minéralocorticoïdes durant la gestation chez la rate* (Dissertation). Université de Montréal, 2007.
95. **Houghton FD, Humpherson PG, Hawkhead JA, Hall CJ and Leese HJ.** Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Dev Biol* 263: 360-366, 2003.
96. **Ihara Y, Taii S and Mori T.** Expression of renin and angiotensinogen genes in the human placental tissues. *Endocrinol Jpn* 34: 887-896, 1987.
97. **Ikeda U, Takahashi M, Okada K, Saito T and Shimada K.** Regulation of Na-K-ATPase gene expression by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 267: H1295-H1302, 1994.
98. **Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y and Mori Y.** The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res* 88: 325-332, 2001.
99. **Iwamoto T, Kita S, Zhang J, Blaustein MP, Arai Y, Yoshida S, Wakimoto K, Komuro I and Katsuragi T.** Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca²⁺ entry via Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 10: 1193-1199, 2004.
100. **Jackson EK.** Renin and Angiotensin. In: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, USA: McGraw-Hill, 2001, p. 809-841.
101. **Jackson WF.** Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35: 173-178, 2000.
102. **Jackson WF.** Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12: 113-127, 2005.
103. **Jackson WF.** Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 265: H1797-H1803, 1993.

104. **Johnson MH and Everitt BJ.** Reconnaissance maternelle et soutien de la gestation. In: *Reproduction*, Paris: De Boeck Université, 2002, p. 191-199.
105. **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.
106. **Jung S, Strotmann R, Schultz G and Plant TD.** TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C347-C359, 2002.
107. **Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, Tomita M and Nakayama K.** Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod* 8: 1129-1135, 2002.
108. **Kanayama N, Tsujimura R, She L, Maehara K and Terao T.** Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *J Hypertens* 15: 383-389, 1997.
109. **Kaplan JH.** Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71: 511-535, 2002.
110. **Kassab S, Miller MT, Hester R, Novak J and Granger JP.** Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension* 31: 315-320, 1998.
111. **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.
112. **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.
113. **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.

114. **Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S and Granger JP.** Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 31: 1065-1069, 1998.
115. **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.
116. **Kiely J, Hadcock JR, Bahouth SW and Malbon CC.** Glucocorticoids down-regulate beta 1-adrenergic-receptor expression by suppressing transcription of the receptor gene. *Biochem J* 302 (Pt 2): 397-403, 1994.
117. **Kirley TL.** Inactivation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. *J Biol Chem* 265: 4227-4232, 1990.
118. **Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ and Garcia ML.** Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal* 6: 861-870, 1994.
119. **Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB, III and .** Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33: 5819-5828, 1994.
120. **Kobrinisky E, Kepplinger KJ, Yu A, Harry JB, Kahr H, Romanin C, Abernethy DR and Soldatov NM.** Voltage-gated rearrangements associated with differential beta-subunit modulation of the L-type Ca(2⁺) channel inactivation. *Biophys J* 87: 844-857, 2004.
121. **Kone BC and Baylis C.** Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272: F561-F578, 1997.
122. **Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ and England SK.** Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation. *J Biol Chem* 279: 1217-1223, 2004.
123. **Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C and Benetos A.** Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol* 37: 662-667, 2001.

124. **Large WA.** Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 493-501, 2002.
125. **le TY and Forster C.** Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 676-682, 1997.
126. **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.
127. **Lemas MV, Hamrick M, Takeyasu K and Fambrough DM.** 26 amino acids of an extracellular domain of the Na,K-ATPase alpha-subunit are sufficient for assembly with the Na,K-ATPase beta-subunit. *J Biol Chem* 269: 8255-8259, 1994.
128. **Levick JR.** Vascular smooth muscle: excitation, contraction and relaxation. In: An introduction to cardiovascular physiology, edited by Koster J and Ueberberg A. London, UK: Hodder Arnold, 2003, p. 199-216.
129. **Levick JR.** Overview of the cardiovascular system. In: An introduction to cardiovascular physiology, edited by Koster J and Ueberberg A. London, UK: Hodder Arnold, 2003, p. 1-13.
130. **Li CY.** *Activité et expression de la Na/K-ATPase dans l'aorte de rates avec prééclampsie expérimentale* (Dissertation). Université de Montréal, 2004.
131. **Li C, Ansari R, Yu Z and Shah D.** Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. *Hypertension* 36: 159-164, 2000.
132. **Li P, Ferrario CM, Ganten D and Brosnihan KB.** Chronic estrogen treatment in female transgenic (mRen2)²⁷ hypertensive rats augments endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Hypertens* 10: 662-670, 1997.
133. **Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N and Ahmed A.** Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 101: 442-454, 1998.

134. **Lingrel JB and Kuntzweiler T.** Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* 269: 19659-19662, 1994.
135. **Liu YJ, Nakagawa Y, Toya K, Wang Y, Saegusa H, Nakanishi T and Ohzeki T.** Effects of spironolactone on systolic blood pressure in experimental diabetic rats. *Kidney Int* 57: 2064-2071, 2000.
136. **Longo LD.** Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 245: R720-R729, 1983.
137. **Lopatin DA, Ailamazian EK, Dmitrieva RI, Shpen VM, Fedorova OV, Doris PA and Bagrov AY.** Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. *J Hypertens* 17: 1179-1187, 1999.
138. **Lopina OD.** Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)* 66: 1122-1131, 2001.
139. **Losonczy G, Brown G and Venuto RC.** Increased peripheral resistance during reduced uterine perfusion pressure hypertension in pregnant rabbits. *Am J Med Sci* 303: 233-240, 1992.
140. **Lund CJ and Donovan JC.** Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am J Obstet Gynecol* 98: 394-403, 1967.
141. **Lutsenko S and Kaplan JH.** An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry* 32: 6737-6743, 1993.
142. **MacGillivray I, Rose GA and Rowe B.** Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci* 37: 395-407, 1969.
143. **Magness RR, Osei-Boaten K, Mitchell MD and Rosenfeld CR.** In vitro prostacyclin production by ovine uterine and systemic arteries. Effects of angiotensin II. *J Clin Invest* 76: 2206-2212, 1985.
144. **MANALO-ESTRELLA P and Barker AE.** Histopathologic findings in human aortic media associated with pregnancy. *Arch Pathol* 83: 336-341, 1967.
145. **Marieb E.N.** Système cardiovasculaire: les vaisseaux sanguins. In: Anatomie et physiologie humaines, Montréal: Éditions du nouveau pédagogique inc, 1999, p. 692-745.

146. **Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B and Hamill OP.** TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185, 2005.
147. **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.
148. **McCarthy JF, Misra DN and Roberts JM.** Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *Am J Obstet Gynecol* 180: 731-736, 1999.
149. **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.
150. **McLaughlin MK and Keve TM.** Pregnancy-induced changes in resistance blood vessels. *Am J Obstet Gynecol* 155: 1296-1299, 1986.
151. **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.
152. **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.
153. **Mihailidou AS and Funder JW.** Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids* 70: 347-351, 2005.
154. **Miller C, Moczydlowski E, Latorre R and Phillips M.** Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318, 1985.
155. **Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y, Zeng XR and Inoue I.** Mechanism of activation of the Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Life Sci* 53: 1129-1135, 1993.
156. **Mironneau J.** Calcium channel antagonist effects of spironolactone, an aldosterone antagonist. *Am J Cardiol* 65: 7K-8K, 1990.

157. **Miyoshi Y and Nakaya Y.** Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 700-706, 1991.
158. **Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki T, Nakaya S, Fujino K, Saito K and Inoue I.** Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ Res* 70: 612-616, 1992.
159. **Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF and Martin-Vasallo P.** Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 20: 51-91, 2000.
160. **Molnar M, Suto T, Toth T and Hertelendy F.** Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 170: 1458-1466, 1994.
161. **Monga M and Creazy RK.** Cardiovascular and renal adaptation to pregnancy. In: *Maternal-fetal medicine: principles and practice*, edited by Creazy RK and Resnik R. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1994, p. 758-763.
162. **Morgan T, Craven C and Ward K.** Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 32: 683-687, 1998.
163. **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.
164. **Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M and Imaizumi Y.** TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93: 829-838, 2003.
165. **Nash P, Wentzel P, Lindeberg S, Naessen T, Jansson L, Olovsson M and Eriksson UJ.** Placental dysfunction in Suramin-treated rats--a new model for pre-eclampsia. *Placenta* 26: 410-418, 2005.
166. **Nelson MT and Quayle JM.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: C799-C822, 1995.

167. **Neveu D, Nargeot J and Richard S.** Two high-voltage-activated, dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflugers Arch* 424: 45-53, 1993.
168. **Nielsen AH, Schauser KH and Poulsen K.** Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* 21: 468-477, 2000.
169. **Nuwayhid B, Nguyen T and Khraibi A.** Maternal Physiology. In: Essentials of obstetrics and gynecology, edited by Saunders. 1998, p. 85-89.
170. **O'Brien WJ, Lingrel JB and Wallick ET.** Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch Biochem Biophys* 310: 32-39, 1994.
171. **Oelkers WK.** Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 61: 166-171, 1996.
172. **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.
173. **Olesen SP, Munch E, Moldt P and Drejer J.** Selective activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* 251: 53-59, 1994.
174. **Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC and Kadowitz PJ.** Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 234: 35-42, 1993.
175. **Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT and Lowry PJ.** Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 405: 797-800, 2000.
176. **Paller MS.** Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 247: H100-H108, 1984.

177. **Parent A, Schiffrin EL and St-Louis J.** Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 163: 229-234, 1990.
178. **Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP and Yue DT.** Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558, 1999.
179. **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.
180. **Podjarny E, Baylis C and Losonczy G.** Animal models of preeclampsia. *Semin Perinatol* 23: 2-13, 1999.
181. **Podjarny E, Bernheim J, Katz B, Green J, Mekler J and Bursztyn M.** Chronic exogenous hyperinsulinemia in pregnancy: a rat model of pregnancy-induced hypertension. *J Am Soc Nephrol* 9: 9-13, 1998.
182. **Podjarny E, Bernheim J, Rathaus M, Pomeranz A, Tovbin D, Shapira J and Bernheim J.** Adriamycin nephropathy: a model to study effects of pregnancy on renal disease in rats. *Am J Physiol* 263: F711-F715, 1992.
183. **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.
184. **Poston L.** Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hypertens* 10: 391-394, 1996.
185. **Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ and Shennan AH.** Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 367: 1145-1154, 2006.
186. **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.

187. **Powers RW, Evans RW, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Crombleholme WR and Roberts JM.** Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1605-1611, 1998.
188. **Prada JA, Tsang RC and Clark KE.** Hypocalcemia and pregnancy-induced hypertension produced by low-calcium diet. *Hypertension* 23: 695-702, 1994.
189. **Puschett JB.** The role of excessive volume expansion in the pathogenesis of preeclampsia. *Med Hypotheses* 2006.
190. **Quadri L, Bianchi G, Cerri A, Fedrizzi G, Ferrari P, Gobbini M, Melloni P, Sputore S and Torri M.** 17 beta-(3-furyl)-5 beta-androstane-3 beta, 14 beta, 17 alpha-triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action. *J Med Chem* 40: 1561-1564, 1997.
191. **Quayle JM, Nelson MT and Standen NB.** ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77: 1165-1232, 1997.
192. **Quitterer U, Lothar H and Abdalla S.** AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Semin Nephrol* 24: 115-119, 2004.
193. **Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N and Conrad KP.** Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 64: 499-506, 2001.
194. **Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Moore PK.** The Vascular system. In: *Pharmacology*, London: Churchill Livingstone, 2003, p. 285-305.
195. **Rashed SM and Songu-Mize E.** Regulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by dopamine in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 305: 223-230, 1996.
196. **Richard S.** Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs* 65 Suppl 2: 1-10, 2005.
197. **Rivers RJ, Hein TW, Zhang C and Kuo L.** Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. *Circulation* 104: 1749-1753, 2001.

198. **Roberts JM.** Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol* 24: 24-28, 2000.
199. **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.
200. **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.
201. **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.
202. **Rusch NJ and Liu Y.** Potassium channels in hypertension: homeostatic pathways to buffer arterial contraction. *J Lab Clin Med* 130: 245-251, 1997.
203. **Sadee W, Daggioglu M and Schroder R.** Pharmacokinetics of spironolactone, canrenone and canrenoate-K in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 185: 686-695, 1973.
204. **Sakawi Y, Tarpey M, Chen YF, Calhoun DA, Connor MG, Chestnut DH and Parks DA.** Evaluation of low-dose endotoxin administration during pregnancy as a model of preeclampsia. *Anesthesiology* 93: 1446-1455, 2000.
205. **Salas SP, Altermatt F, Campos M, Giacaman A and Rosso P.** Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. *Hypertension* 26: 1019-1023, 1995.
206. **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.
207. **Sato A and Saruta T.** Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Int Med Res* 29: 13-21, 2001.
208. **Scheiner-Bobis G.** The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem* 269: 2424-2433, 2002.

209. **Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H and Schmieder RE.** Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med* 335: 1480-1485, 1996.
210. **Schubert R, Krien U, Wulfsen I, Schiemann D, Lehmann G, Ulfing N, Veh RW, Schwarz JR and Gago H.** Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension* 43: 891-896, 2004.
211. **Schubert R and Mulvany MJ.** The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond)* 96: 313-326, 1999.
212. **Schubert R and Nelson MT.** Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 22: 505-512, 2001.
213. **Schubert R, Noack T and Serebryakov VN.** Protein kinase C reduces the KCa current of rat tail artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 276: C648-C658, 1999.
214. **Seely EW, Williams GH and Graves SW.** Markers of sodium and volume homeostasis in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 150-156, 1992.
215. **Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK and Abramson SB.** The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171: 944-948, 1994.
216. **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.
217. **Shah DM.** Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614-F625, 2005.
218. **Shaul PW, Magness RR, Muntz KH, DeBeltz D and Buja LM.** Alpha 1-adrenergic receptors in pulmonary and systemic vascular smooth muscle. Alterations with development and pregnancy. *Circ Res* 67: 1193-1200, 1990.
219. **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.

220. **Sibai BM, Ewell M, Levine RJ, Klebanoff MA, Esterlitz J, Catalano PM, Goldenberg RL and Joffe G.** Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 177: 1003-1010, 1997.
221. **Sica DA.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. *Heart Fail Rev* 10: 23-29, 2005.
222. **Simaan M, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Functional alteration of dihydropyridine-sensitive Ca(2+) channels in the adrenal glomerulosa of pregnant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E925-E932, 2000.
223. **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.
224. **Smiley RM and Finster M.** Do receptors get pregnant too? Adrenergic receptor alterations in human pregnancy. *J Matern Fetal Med* 5: 106-114, 1996.
225. **Smith DL, Law RE, Shaw KJ, Do YS, Hsueh WA and Morris BJ.** Proximal 2.6 kb of 5'-flanking DNA is insufficient for human renin promoter activity in renin-synthesizing chorio-decidual cells. *Biochim Biophys Acta* 1219: 465-474, 1994.
226. **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.
227. **Sorrentino R, Cirino G, Calignano A, Mancuso F, Sorrentino L, Andrioli G and Pinto A.** Increase in the basal tone of guinea pig thoracic aorta induced by ouabain is inhibited by spironolactone canrenone and potassium canrenoate. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 519-525, 1996.
228. **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.
229. **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.

230. **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.
231. **Standen NB and Quayle JM.** K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164: 549-557, 1998.
232. **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.
233. **Suchmanova-Lazurova I, Lichardus B, Rosochova I, Pjescak M, Trejbal D, Murar J and Machanova Y.** The role of endogenous digitalis-like factor in blood pressure regulation in essential hypertension. *Wien Klin Wochenschr* 106: 513-516, 1994.
234. **Sweadner KJ and Rael E.** The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 68: 41-56, 2000.
235. **Sweeney G and Klip A.** Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 182: 121-133, 1998.
236. **Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K and Fukamizu A.** Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 274: 995-998, 1996.
237. **Taylor RN, Lebovic DI and Martin-Cadieux MC.** The endocrinology of pregnancy. In: *Basic & Clinical Endocrinology*, edited by Reinhardt S, Nogueira I and Ransom J. USA: McGraw-Hill, 2001, p. 575-602.
238. **Taylor RN, Varma M, Teng NN and Roberts JM.** Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1675-1677, 1990.
239. **Thatcher CD and Keith JC, Jr.** Pregnancy-induced hypertension: development of a model in the pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol* 155: 201-207, 1986.
240. **Therien AG and Blostein R.** Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C541-C566, 2000.

241. **Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD and Morton MJ.** Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol* 24: 11-14, 2000.
242. **Thorneloe KS, Chen TT, Kerr PM, Grier EF, Horowitz B, Cole WC and Walsh MP.** Molecular composition of 4-aminopyridine-sensitive voltage-gated K(+) channels of vascular smooth muscle. *Circ Res* 89: 1030-1037, 2001.
243. **Torgersen KL and Curran CA.** A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 29: 2-19, 2006.
244. **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.
245. **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.
246. **Triggle DJ.** The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-type, voltage-gated calcium channels. *Am J Hypertens* 11: 80S-87S, 1998.
247. **Tsien RW.** Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45: 341-358, 1983.
248. **Ungar S, Makman MH, Morris SA and Etgen AM.** Estrogen uncouples beta-adrenergic receptor from the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in female rat hypothalamus. *Endocrinology* 133: 2818-2826, 1993.
249. **Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C and Latorre R.** Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285: 1929-1931, 1999.
250. **Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M and Putney JW, Jr.** The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 1742: 21-36, 2004.
251. **Wakatsuki T, Nakaya Y, Miyoshi Y, Zeng XR, Nomura M, Saito K and Inoue I.** Effects of vasopressin on ATP-sensitive and Ca(2+)-activated K⁺ channels of coronary arterial smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 58 Suppl 2: 339P, 1992.

252. **Wang Y, Gao J, Mathias RT, Cohen IS, Sun X and Baldo GJ.** alpha-Adrenergic effects on Na⁺-K⁺ pump current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 509 (Pt 1): 117-128, 1998.
253. **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.
254. **Wehling M.** Effects of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on intracellular electrolytes. *Heart Fail Rev* 10: 39-46, 2005.
255. **Wehling M, Eisen C and Christ M.** Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 90: C5-C9, 1992.
256. **Weiner CP, Knowles RG and Moncada S.** Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 171: 838-843, 1994.
257. **Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT and Brayden JE.** Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90: 248-250, 2002.
258. **Wilson AJ, Jabr RI and Clapp LH.** Calcium modulation of vascular smooth muscle ATP-sensitive K(+) channels: role of protein phosphatase-2B. *Circ Res* 87: 1019-1025, 2000.
259. **Xu SZ and Beech DJ.** TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca(2+) channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 88: 84-87, 2001.
260. **Yallampalli C and Garfield RE.** Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1316-1320, 1993.
261. **Ylikorkala O, Pekonen F and Viinikka L.** Renal prostacyclin and thromboxane in normotensive and preeclamptic pregnant women and their infants. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 1307-1312, 1986.
262. **Young M and Funder J.** Mineralocorticoid action and sodium-hydrogen exchange: studies in experimental cardiac fibrosis. *Endocrinology* 144: 3848-3851, 2003.

263. **Zamofing D, Rossier BC and Geering K.** Inhibition of N-glycosylation affects transepithelial Na⁺ but not Na⁺-K⁺-ATPase transport. *Am J Physiol* 256: C958-C966, 1989.
264. **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.
265. **Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM and Fisher SJ.** Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91: 950-960, 1993.