

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2011

THESE N°

**EXPRESSION DES AQUAPORINES AU SEIN DES MEMBRANES
FŒTALES CHEZ LA PARTURIENTE DIABETIQUE**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 23 septembre 2011

par

Romain LEMARIÉ

né le 25 août 1978, à Rennes

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Alexis DESMOULIÈRE Président
Mme le Professeur Marie-Paule VASSON Juge
M. le Professeur Denis GALLOT Juge
M. le Professeur Vincent SAPIN Juge

REMERCIEMENTS

A notre président de jury.

Nous vous remercions, **Mr le Professeur Desmoulière**, de nous faire l'honneur de présider notre thèse et de l'attention que vous avez portée à notre travail.

Aux membres du jury.

Nous remercions,

- **Mme le Professeur Vasson**, pour avoir accepté de juger notre travail.
- **Mr le Professeur Gallot**, pour votre accueil au sein de votre service, et de l'intérêt que vous avez porté à notre étude.
- **Mr le Professeur Sapin**, de nous avoir accueilli au sein de votre équipe, pour votre disponibilité et pour la confiance que vous nous avez accordée en nous proposant ce beau projet. Remercie ...

A Mag, pour tout ce que tu m'apportes sur le plan personnel et tous nos projets à venir.

A toi Maman, je dédie ce travail, qui marque la fin de toutes ces années d'études ; Merci encore pour tous tes encouragements qui m'ont aidé à persévérer.

A Jérémie pour notre complicité importante à mes yeux. On est pas frère pour rien, non ?

Aux Bretons, pour tous les moments partagés. Une dédicace particulière pour Scrapy et Aline.

Aux Limougeauds, Jean-Phi, Papé, Lucie, Fred, et Youssef, pour cette première année d'internat riche en souvenirs.

A Boubou, pour ton amitié et ce qu'elle apporte. Au plaisir de retravailler avec toi.

Aux Clermontois, pour l'accueil fait à un breton égaré en centre France : Amélie, Mathilde, Touf (désolé, Mathilde est déjà pris), Chacha (Charlotte était pas pris par contre), et Toto l'amateur de fiches et de belles robes.

A tous les techniciens, internes et biologistes avec lesquels j'ai travaillé au cours de mon internat.

A l'équipe du Professeur Sapin : Cécile, Corinne, Geoffroy, Loïc, Pierre et Régine pour l'accueil et la bonne ambiance.

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUYT Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------



Abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	Adénosine Monophosphate cyclique
AQP(s) :	Aquaporine(s)
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
Cp :	Crossing point
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP :	désoxyNucléoside Triphosphate
DT1 :	Diabète de type 1
DT2 :	Diabète de type 2
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IGFBP-1 :	Insulin-like Growth-factor Binding Protein 1
IRS-1 :	Insulin Receptor Substrate 1
IRS-2 :	Insulin Receptor Substrate 2
IRE :	Insulin Response Elements
mTOR :	mammalian Target of Rapamycin
PEPCK :	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PI3K :	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
RT-PCR :	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SVF :	Sérum de Veau Fœtal

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

BIBLIOGRAPHIE

1. GROSSESSE CHEZ LA FEMME DIABETIQUE
 - 1.1 Définitions
 - 1.2 Epidémiologie
 - 1.3 Prise en charge
 - 1.4 Complications
2. PHYSIOPATHOLOGIE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE
 - 2.1 Formation et flux
 - 2.2 Composition
 - 2.3 Rôles
 - 2.4 Pathologies
 - 2.5 Régulation du volume amniotique
3. MEMBRANE FŒTALE ET AQUAPORINES
 - 3.1 Membranes
 - 3.2 Aquaporines
4. OBJECTIFS

MATERIELS - METHODES

1. COLLECTION DE MEMBRANES
2. COLLECTION DE MEMBRANES
3. PCR QUANTITATIVE
4. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES TOTALES
5. ELISA
6. CULTURE D'EXPLANTS EN PRESENCE D'INSULINE
7. PCR
8. STATISTIQUES

RESULTATS

1. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQPS AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES DES FEMMES DIABETIQUES (DT1 ET DT2) OU NON

1.1 Expression qualitative des ARN

1.2 Quantification de l'expression des gènes des aquaglycéroporines

1.3 Quantification de l'expression des gènes des aquaporines « classiques » des aquaglycéroporines

2. ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQUAGLYCEROPORINES PAR L'INSULINE AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES

2.1 Expression des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline

2.2 Quantification de l'expression transcriptionnelle des gènes des aquaglycéroporines 3 et 9 au sein des membranes fœtales

DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES TABLEAUX

SERMENT DE GALIEN

BIBLIOGRAPHIE

1. GROSSESSE CHEZ LA FEMME DIABETIQUE

1.1 Définitions

Le diabète sucré, caractérisé par une hyperglycémie liée à un déficit absolu ou relatif en insuline [1] présente deux types majoritaires :

- le diabète de type I (DT1), qui fait suite à la destruction spécifique des cellules β des îlots pancréatiques de Langerhans, le plus souvent due à une maladie auto-immune, responsable d'une carence absolue de l'insulinosécrétion et d'une insulino dépendance stricte.
- Le diabète de type II (DT2) dit non insulino dépendant est le plus fréquent et touche des sujets plus âgés que le DT1. Il est la conséquence d'une insulino résistance associée à une insulinosécrétion anormale.

Les femmes enceintes sont concernées par deux types de diabète : le diabète gestationnel qui se déclare pendant la grossesse et le diabète pré-gestationnel (DT1 ou DT2) qui préexiste avant la grossesse.

1.2 Epidémiologie

Le diabète sucré est une des maladies chroniques les plus répandues à travers le monde. La prévalence mondiale du diabète chez les adultes est estimée à plus de 220 millions en 2011 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et devrait continuer à croître pour atteindre 439 millions d'adultes en 2030, soit 7,7% de la population mondiale [2]. Cette évolution est due essentiellement au DT2 qui augmente en parallèle de ses deux facteurs de risques majeurs : l'obésité et la sédentarité. Il touche des sujets plus âgés que le DT1. En effet, le DT1 avec une prévalence de 0,15% en France [3] survient dans la moitié des cas avant l'âge de 20 ans.

Les femmes enceintes, jeunes, sont essentiellement touchées par le DT1. Néanmoins, pour les raisons déjà évoquées et parce que les grossesses actuelles sont plus tardives dans les pays développés, elles n'échappent pas à l'augmentation du DT2 [4]. La prévalence des diabètes pré-gestationnels a ainsi augmenté de 3,1 pour 1000 naissances à la fin des années 90 à 4,7 pour 1000 naissances [5].

1.3 Prise en charge

La grossesse chez une femme diabétique est plus à risque, nécessitant une prise en charge médicale précoce et multidisciplinaire, depuis le projet de conception jusqu'à l'accouchement. Le diabétologue doit assurer l'équilibre métabolique de la patiente par le contrôle strict du taux de glycémie. Il évalue le risque médical de la grossesse et définit les modalités du traitement insulinique. Cette surveillance pré- et péri-conceptionnelle a permis depuis 30 ans d'améliorer le pronostic de ces grossesses en diminuant les risques de mortalité périnatale et de malformations congénitales [6]. Cette prise en charge est plus aisée pour le DT1, souvent connu depuis plus longtemps. La jeune diabétique est alors informée depuis quelques années des problèmes liés à la survenue d'une grossesse, et des moyens de permettre le déroulement satisfaisant de celle-ci [7].

L'émergence du DT2 pendant la grossesse devient un problème éminent. Il est souvent sous-estimé du fait de son caractère asymptomatique qui en fait toute sa gravité [3]. En effet, les symptômes classiques (polyurie et polydipsie) ne surviennent qu'à des niveaux glycémiques très supérieurs à ceux compatibles avec une grossesse normale. Dans le cas où ce DT2 est antérieurement connu, ou découvert lors du dépistage systématique en début de grossesse, une insulinothérapie doit être instaurée, car les antidiabétiques oraux sont contre-indiqués pendant la grossesse. Ces patientes sont alors considérées comme diabétiques insulino-dépendantes [7].

Par ailleurs, les nouveau-nés de mère diabétique sont plus fragiles que les autres et doivent naître dans des maternités de niveau 3 [7].

1.4 Complications

Pendant la grossesse, les femmes diabétiques cumulent les risques liés à leur grossesse et au diabète (rétinopathie, néphropathie...). La survenue de complications est plus fréquente (toxémie gravidique, fausses couches, troubles hypertensifs...) et leurs fœtus sont plus à risque d'anomalies, comme la dystocie des épaules au moment de l'accouchement, souvent secondaire à une macrosomie [8]. Ces anomalies sont principalement le résultat d'une exposition fœtale précoce à l'hyperglycémie maternelle [9]. Ces connaissances concernent le pronostic des grossesses chez les femmes ayant un DT1. La faible littérature disponible pour le DT2 semble suggérer peu de différences avec le DT1, et ce pour des conditions de prise en charge similaires, malgré des perturbations glycémiques moindres, un nombre moins élevé de césariennes, et un âge gestationnel à la naissance plus grand [4]. Une autre pathologie peu connue et souvent associée aux grossesses de femmes diabétiques est l'hydramnios ou poly-hydramnios, qui correspond à un volume trop important de liquide amniotique.

2. PHYSIOPATHOLOGIE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

2.1 Formation et flux

Avant la 20^{ème} SA, le liquide amniotique est essentiellement un ultrafiltrat du plasma maternel avec une composition isotonique au sérum maternel et fœtal. Ceci est lié aux échanges se produisant à travers la peau fœtale non kératinisée perméable à l'eau, aux électrolytes et aux éléments biochimiques.

Après la kératinisation de la peau qui débute vers la 20^{ème} SA, plusieurs éléments collaborent à la formation et à l'élimination du liquide amniotique (Figure 1) [10]. Ses deux principales sources de production sont la diurèse fœtale et les sécrétions pulmonaires, tandis que ses deux principales voies de réabsorption sont la déglutition fœtale et l'absorption dans le sang fœtal à travers la surface fœtale du placenta. Les membranes chorio-amniotiques

jouent le rôle d'une membrane semi-perméable au travers de laquelle se font des transferts d'eau dont les flux sont bidirectionnels. Au cours du 3^{ème} trimestre, compte tenu d'un déficit osmotique constant du liquide amniotique par rapport au plasma maternel, le flux net des échanges à travers les membranes est une sortie du liquide de la cavité amniotique vers la mère de 0,3 à 0,7 mL/h. Le volume du liquide amniotique varie au cours de la grossesse en augmentant progressivement jusqu'à 20 SA puis plus rapidement pour atteindre un pic à 34 SA (1000 mL) et redescendre à 800 mL à terme [10].

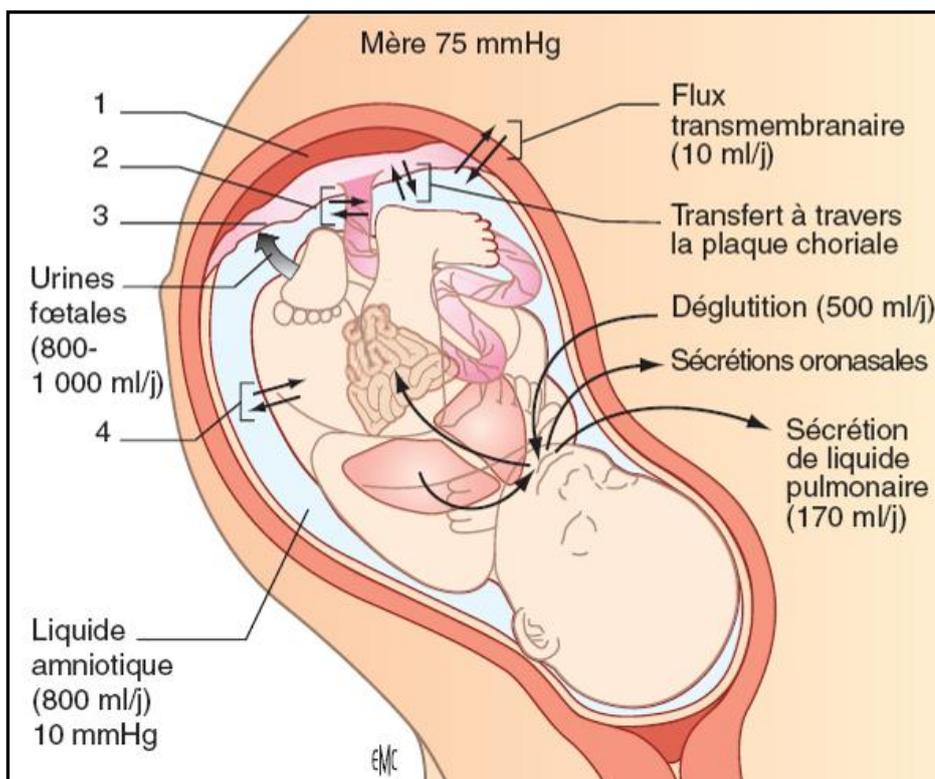


Figure 1 : Constitution du liquide amniotique. Mouvements de fluides à mi-gestation. 1. Placenta ; 2. Cordon ; 3. Amnios ; 4. Peau. D'après [10].

2.2 Composition

Le liquide amniotique est composé de 98% d'eau. En terme d'électrolytes, il est isotonique au plasma avant la 20^{ème} SA puis l'osmolalité décroît en raison

du faible pouvoir de concentration des urines du rein fœtal. On retrouve également tous les acides aminés protéinogènes, des enzymes, des lipides pulmonaires, du glucose, des facteurs de croissance, des hormones et des cellules fœtales en suspension [10].

2.3 Rôles

Le liquide amniotique a un rôle antibactérien avec des propriétés bactériostatiques puis bactéricides. Il présente de plus un rôle mécanique d'une part en permettant les mouvements fœtaux et donc le développement de l'appareil locomoteur du fœtus, et d'autre part un rôle protecteur contre les traumatismes. Il assure également l'homéostasie physique de l'environnement fœtal (température, volume) [10].

2.4 Pathologies

Il existe des anomalies qualitatives ou quantitatives du liquide amniotique. Les anomalies de volume, qui nous intéressent dans ce travail, sont directement associées à une augmentation de la mortalité périnatale et du taux de morbidité [11]. Selon l'anomalie de volume, on distingue soit une quantité trop faible de liquide amniotique, l'oligoamnios ou oligo-hydramnios, soit un excès de liquide, l'hydramnios ou polyhydramnios.

i) l'oligoamnios est lié à une production insuffisante (anomalie rénale, absence de sécrétion pulmonaire par atrésie trachéale...) ou à une fuite chronique due à une rupture prématurée des membranes, spontanée ou iatrogène comme l'amniocentèse. Dans ce dernier cas, l'importance des complications (hypoplasie pulmonaire, infection létale...) dues à ces pertes de liquide amniotique dépend de différents facteurs : commencement des pertes, durée, importance, et surtout l'âge gestationnel à la délivrance.

ii) l'hydramnios complique 1 à 2% des grossesses. Dans plus de la moitié des cas, l'hydramnios est considéré comme idiopathique en l'absence de

cause évidente. On observe soit une augmentation de production (comme dans le diabète), soit une diminution de résorption (comme dans l'atrésie de l'œsophage) [11]. Malgré un pronostic favorable dans la majorité des cas, l'hydramnios présente des risques de complications plus élevées : anomalies congénitales, rupture de la poche des eaux et accouchements prématurés, présentation défavorable due à une mobilité fœtale excessive...

Le diabète représenterait 25% des causes de polyhydramnios. Toutefois, la prévalence de l'hydramnios chez les femmes diabétiques est très variable selon les études. Cette complication survient plus fréquemment dans un contexte de mauvais contrôle glycémique et plusieurs mécanismes physiopathologiques sont proposés. Parmi eux, l'hyperglycémie fœtale responsable d'une polyurie par effet osmotique est le plus communément admis. Les enfants diabétiques atteints de macrosomie ont également un débit cardiaque et un volume plasmatique augmentés qui accroît le débit de filtration glomérulaire et donc la production urinaire. Un autre mécanisme envisageable serait une concentration de glucose augmentée dans le liquide amniotique qui entraînerait l'arrivée d'eau par gradient de concentration [11] [12].

La signification clinique de l'hydramnios dans les grossesses diabétiques reste un problème non résolu.

Une mortalité ou des complications périnatales plus importantes pourraient être attendues en associant les risques des grossesses diabétiques et ceux des grossesses compliquées d'un polyhydramnios. Mais cela n'a pas été montré. Un accouchement plus précoce, le plus souvent programmé par césarienne, pourrait être une explication. D'autre part, il n'a pas été montré de différences selon les types de diabète et leur durée d'évolution avant la grossesse [12].

2.5 Régulation du volume amniotique

Elle passe essentiellement par la régulation de la diurèse fœtale via certaines hormones comme l'aldostérone et la vasopressine, et par celle de la sécrétion pulmonaire via l'adrénaline et la vasopressine.

Dans l'adaptation du volume amniotique, les membranes fœtales ont un rôle évident que ce soit en physiologie ou en pathologie. A l'échelle cellulaire et moléculaire, l'eau passe à travers les membranes via différents systèmes de transport perméatif passif comme la simple diffusion, la diffusion accélérée mais aussi la diffusion facilitée grâce à des protéines membranaires transporteuses d'eau comme les aquaporines [13] [14].

3. MEMBRANE FŒTALE ET AQUAPORINES

3.1 Membranes

3.1.1 Structure

L'amnion est la couche la plus interne et proche du fœtus et le chorion est accolé à la décidue maternelle [15] (Figure 2).

L'amnion, non vascularisé et non innervé, d'épaisseur allant de 0,012 à 0,080 mm, présente 5 couches qui sont de la cavité amniotique vers le chorion : i) l'épithélium amniotique avec une monocouche de cellules cuboïdes, ii) la membrane basale formée de collagènes et de glycoprotéines, iii) la couche compacte composée de tissu conjonctif, iv) la couche fibroblastique constituée de cellules mésenchymales et de macrophages, v) la couche intermédiaire spongieuse connectant l'amnion au chorion [16].

Le chorion, 4 fois plus épais que l'amnion mais moins résistant aux forces de tension, vascularisé, est composé de 3 couches : i) la couche réticulaire avec un réseau de fibres et des cellules fusiformes et stellaires, ii) la membrane basale chorale avec une couche épaisse de cellules polygonales cytotrophoblastiques, iii) une 3^{ème} couche formée de cellules basales et de cellules trophoblastiques superficielles.

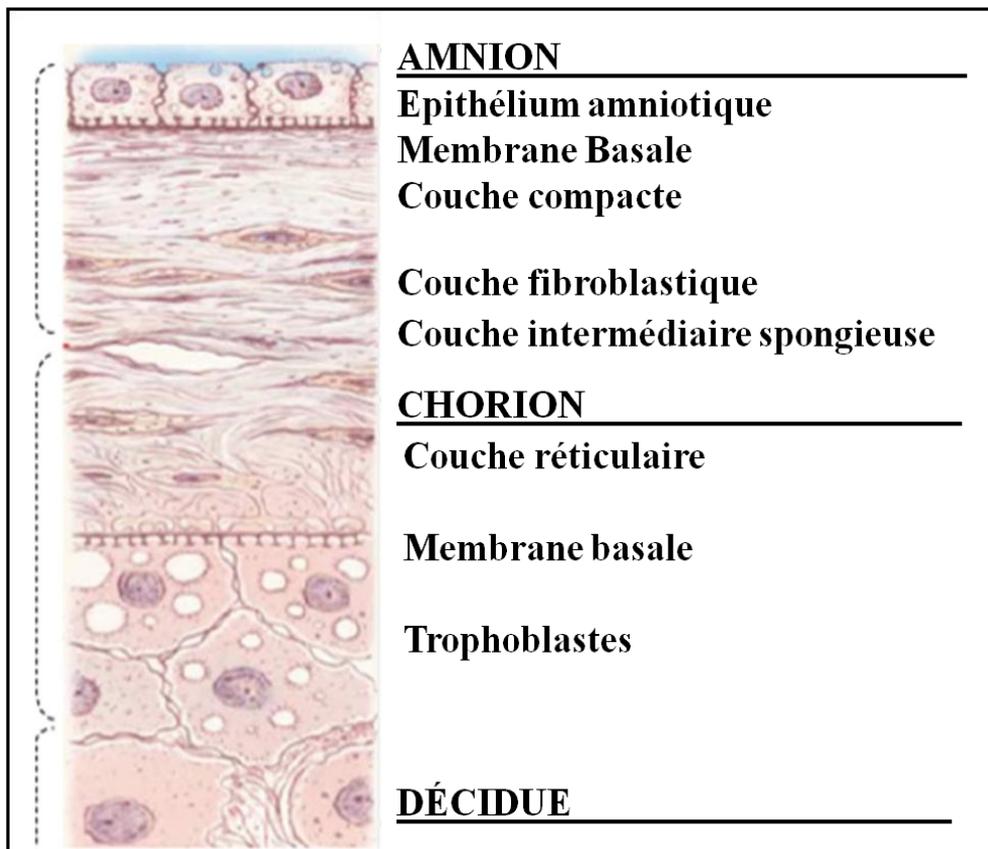


Figure 2 : Structure des membranes fœtales. D'après [16].

3.1.2 Rôles

Les membranes chorio-amniotiques permettent l'adaptation au volume et aux tensions croissantes, notamment grâce aux différents collagènes qui leur confèrent résistance et élasticité [17]. De plus, elles ont un rôle dans l'initiation de la parturition et dans les défenses immunitaires [17]. Enfin, elles interviennent dans l'homéostasie du liquide amniotique via entre autres les aquaporines [14] [18].

3.2 Aquaporines

3.2.1 Présentation

Ce sont de petites protéines membranaires (24-30 kDa) dont le nom vient de leur capacité à augmenter la perméabilité des bicouches lipidiques membranaires à l'eau [19]. Elles existent chez toutes les espèces [20]. Chez l'humain, leurs gènes comptent 4 à 8 introns, ont une taille de 3,6 à 47 kb, et se répartissent sur les chromosomes 1, 7, 9, 10, 12, 15 et 16 [21]. A l'heure actuelle, les AQPs forment une famille constituée de 13 membres (AQP0 à 12) séparées en 3 groupes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles [22](Figure 3) :

- Les « aquaporines classiques », comprenant les AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8, qui sont uniquement perméables à l'eau. Les AQPs 6 et 8 sont classées dans ce groupe de par leur forte homologie de séquence bien que l'AQP 6 soit perméable aux nitrates et l'AQP8 à l'ammoniaque et à l'urée.
- Les « aquaglycéroporines », comprenant les AQP3, 7, 9, et 10, qui sont perméables à l'eau, à l'urée, et au glycérol.

Les « super-aquaporines », un sous-groupe récemment proposé pour 2 aquaporines : AQP11 et 12, qui sont localisées dans le cytoplasme et dont les perméabilités ne sont pas complètement déterminées [23].

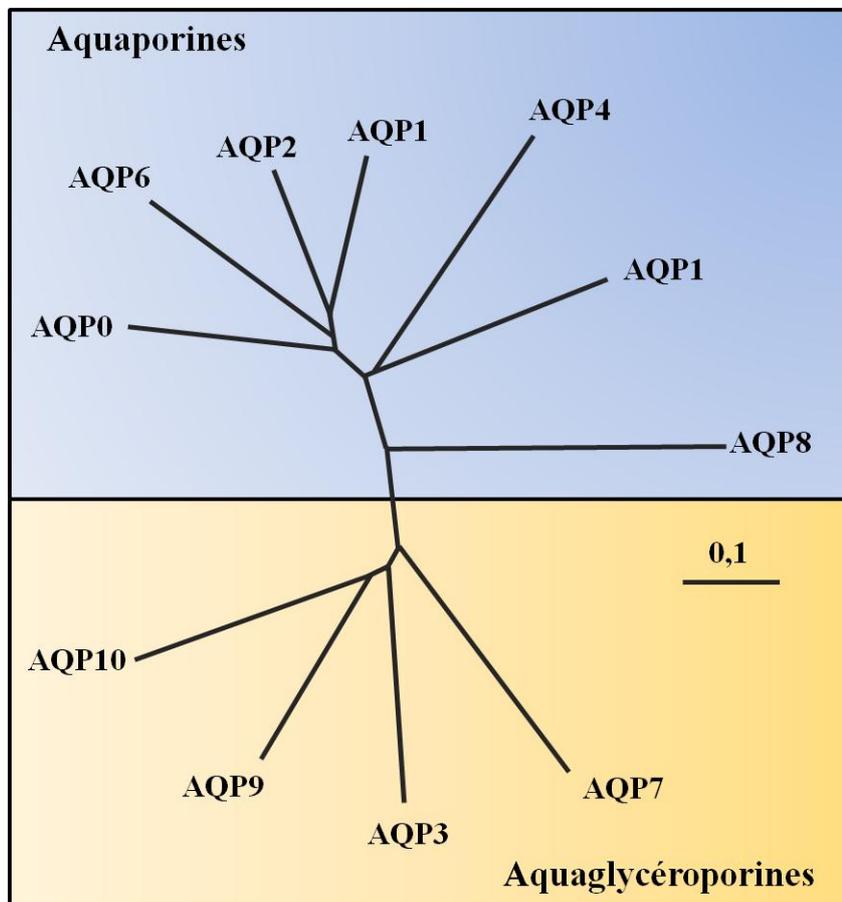


Figure 3 : Arbre phylogénétique séparant les aquaporines et les aquaglycéroporines. La barre d'échelle représente la distance évolutive : 0,1 correspond à 10 substitutions pour 100 résidus d'acides aminés. D'après [24].

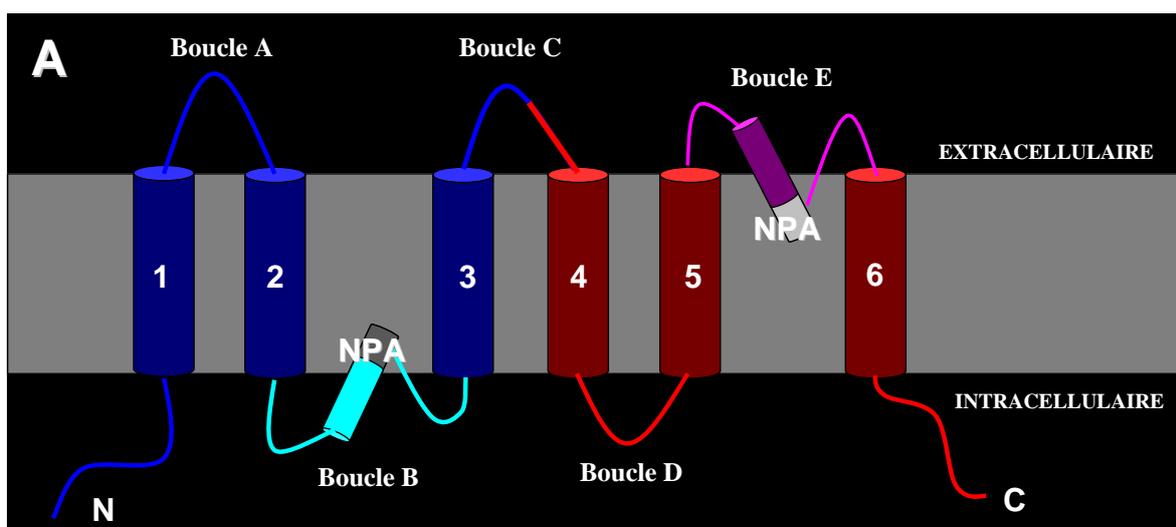
3.2.2 Structure – Fonction

Des analyses de modélisation bioinformatique ont révélé que l'AQP1 existe sous forme de monomère mais n'est fonctionnelle dans la membrane cellulaire que sous forme de tétramère (comme les autres AQPs) (Figure 4) [24]. Chaque monomère est constitué de 6 hélices transmembranaires (1-6) reliées par 5 boucles (A-E) [20]. Les boucles A, C et E sont extracellulaires et les boucles B et D sont intracellulaires. Le motif NPA (Asn-Pro-Ala) constitue le cœur des AQPs. Il en existe 2 par monomère : le premier se situe sur la boucle B dans la partie amino-terminale et le second sur la boucle E dans la partie

carboxy-terminale. La première et la deuxième moitié de la molécule présentent de fortes homologues internes et sont orientées en sens opposé dans la bicouche lipidique. Par repliement, les extrémités NH₂ et COOH se rapprochent, de même que les motifs NPA des boucles B (intracellulaire) et E (extracellulaire). Ces 2 boucles forment un 7^{ème} domaine transmembranaire dans lesquels les 2 motifs NPA se font face, créant ainsi un passage pour l'eau à travers le pore protéique (Figure 4A 4B) [20]. Cette structure en « sablier » ainsi que l'organisation en tétramère ont été confirmées par des cartes tridimensionnelles utilisant la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Figure 4C).

Contrairement aux canaux ioniques, chaque monomère d'AQPs est un pore laissant passer de l'eau [25].

Sur un plan fonctionnel, la voie traversant le monomère est formée d'un alignement de résidus hydrophobes conservés permettant le passage de l'eau sous forme d'une file de molécules liées par des liaisons hydrogènes. La présence dans le pore de deux sites de restriction (un formé par l'Arg195 et l'autre par les 2 motifs NPA) prévient le passage des protons. La perméabilité au glycérol, retrouvée pour les aquaglycéroporines, dépend de la présence d'acides aminés aromatiques [20].



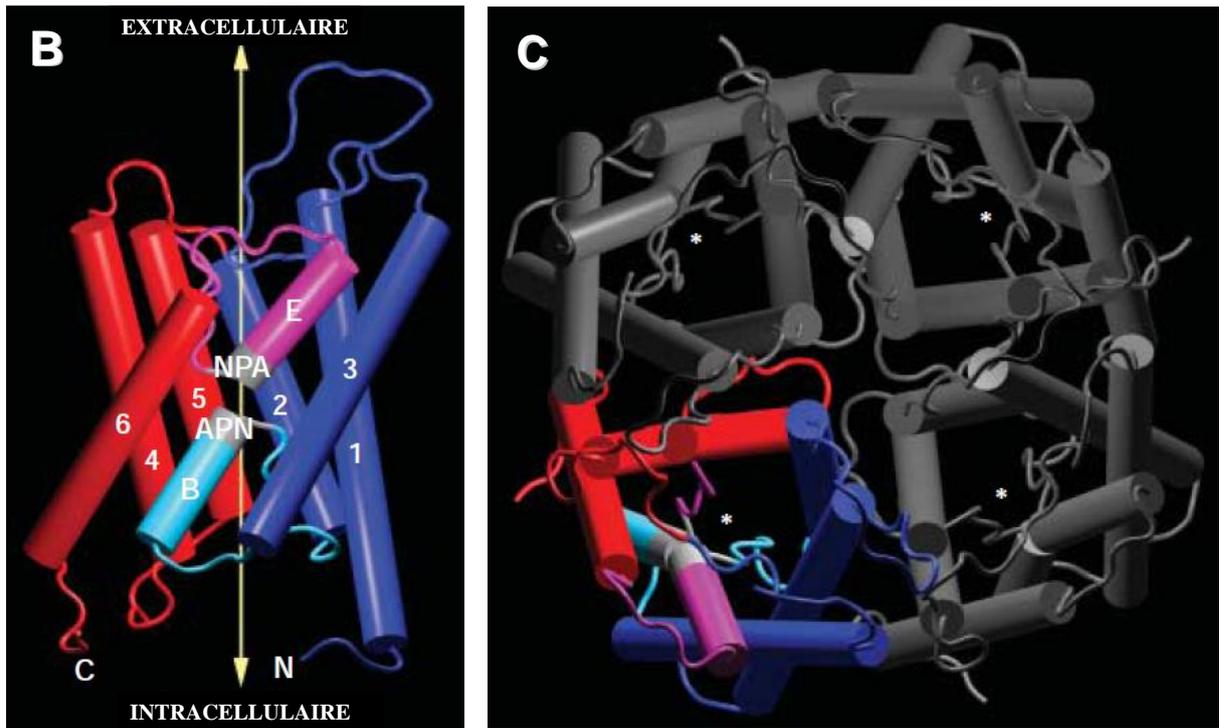


Figure 4 : Structure des aquaporines. Structure primaire d'un monomère avec 6 domaines transmembranaires, 5 boucles, et 2 motifs NPA (A) qui se replient pour former le pore aqueux (B). Disposition en tétramère ; l'astérisque précise le pore aqueux de chaque monomère (C). D'après [24].

3.2.3 Expression

A l'échelle de la cellule, la plupart des AQPs sont localisées au sein de la membrane plasmique (AQP0, 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10) alors que d'autres se retrouvent exclusivement dans les membranes intracellulaires (AQP6, 11, 12) [21]. Les AQPs 2 et 5, intracellulaires à l'état basal, s'intègrent à la membrane cellulaire à partir du moment où elles sont activées par un stimulus.

A l'échelle de l'organisme, l'expression des AQPs est variée. Certaines sont ubiquitaires comme l'AQP1 et d'autres sont retrouvées préférentiellement sur des organes précis, selon, semble-t-il, les fonctions physiologiques qui leur incombent. Ainsi, sur certains organes comme le poumon et le rein, le rôle fondamental des AQPs dans les mouvements d'eau a été démontré. On retrouve par exemple les AQPs 1 et 2, respectivement au niveau du tube proximal et du tube collecteur du rein, qui assurent la réabsorption d'eau et la concentration des urines [24]. Les aquaglycéroporines (AQPs 3, 7, et 9) vont

jouer quant à elles un rôle majeur dans les échanges de glycérol. On les retrouve à des endroits stratégiques pour ce métabolite : dans les adipocytes pour la lipogenèse et la lipolyse et donc le contrôle du stockage des graisses, dans les hépatocytes pour la néoglucogenèse, et au niveau intestinal pour son absorption via l'AQP3 [26] [27].

Au sein des membranes fœtales, les AQPs 1 [28], 3, 8, 9 [29] [30] [31] et 11 [32] s'expriment, tout au long de la grossesse, au niveau de l'amnion et du chorion (détection d'ARN et de protéines) et jouent un rôle dans la régulation aqueuse intra-membranaire du liquide amniotique [22] [32].

3.2.4 Régulation

Les mécanismes de régulation des différentes AQPs sont complexes et restent peu connus. Toutefois, les études actuelles de manipulations génétiques sur les rongeurs et d'identification chez l'homme nous donnent quelques éléments de réponse. Au niveau rénal, la translocation de l'AQP2 vers la membrane apicale des cellules du tube collecteur du rein est induite par la vasopressine [33] et est potentialisée par l'insuline. Cette action participerait au rôle supposé de l'insuline dans la réabsorption d'eau au niveau rénal [34].

Une des voies de régulation de l'expression de certaines aquaglycéroporines (3, 7 et 9) se fait par des hormones lipogéniques comme l'insuline, et lipolytiques (leptine et catécholamines). L'insuline en contrôlant l'expression de ces AQPs sur différents tissus (adipeux, hépatique, et intestinal), contrôle ainsi les entrées et sorties du glycérol et une partie des métabolismes lipidiques et glucidiques [27] [35]. Par exemple, en réprimant l'expression de l'AQP3 dans les cellules intestinales, l'insuline va diminuer l'absorption intestinal de glycérol et aura un rôle hypoglycémiant supplémentaire [26] [36]. Les effecteurs de ces voies d'activation sont nombreux et en cours d'identification. On peut ainsi citer l'ion Magnésium et le peptide vasoactif intestinal qui, à l'instar de l'insuline, jouent également sur l'expression du gène de l'AQP3 au niveau intestinal [37].

Au niveau des membranes fœtales, les effecteurs sont encore moins connus ; seules les stimulations de transcription du gène de l'AQP3 par l'AMPc et du gène de l'AQP8 par un stress hypotonique ont été identifiées [31] [38].

Les voies d'activation sont également à l'étude. Au niveau des hépatocytes et adipocytes, l'action de l'insuline sur l'expression des aquaglycéroporines se fait par la voie du phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) / Akt / mTOR [39] (Figure 5). Cette voie est connue pour l'expression d'un transporteur majeur de glucose (GLUT4), et pour la synthèse protéique et de glycogène. De plus des IRE (*Insulin Response Elements*), qui existent dans de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose, ont également été décrits dans certains promoteurs d'AQPs [40] [41]. Au sein des membranes chorio-amniotiques, les voies de signalisation régulant l'expression des AQP8 ne sont pas décrites.

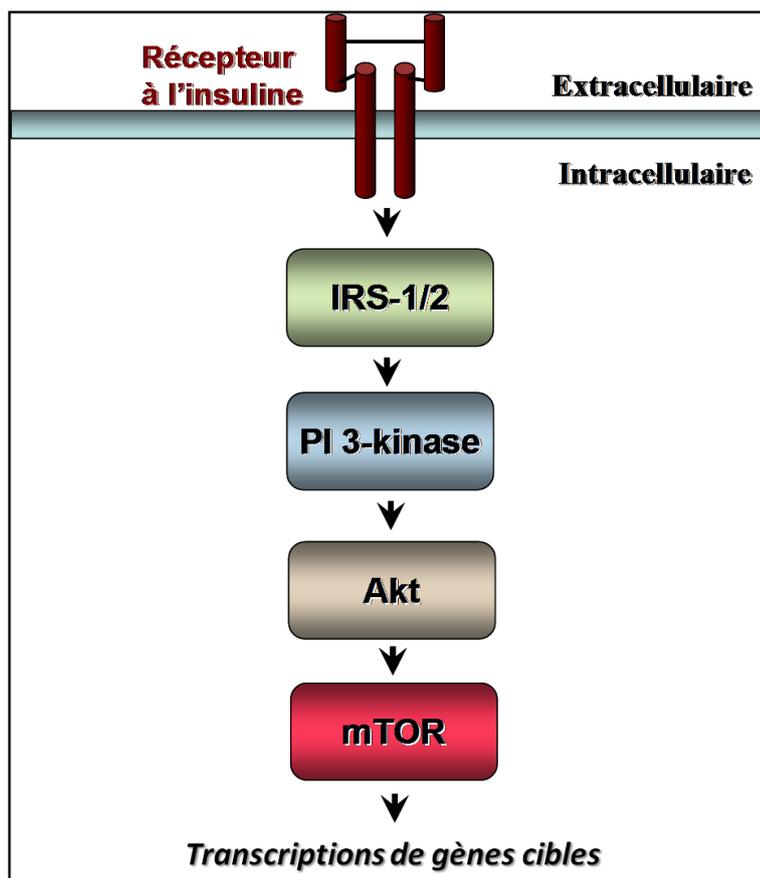


Figure 5 : Vue simplifiée de la voie d'activation PI3K / Akt / mTOR (IRS-1/2: Insulin Receptor Substrate 1/2; PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase; mTOR: mammalian Target of Rapamycin)

3.2.5 Régulation

Le premier exemple de l'importance clinique d'une AQP déficiente altérant la perméabilité aqueuse d'un organe, a été apporté dans le cadre du diabète insipide néphrogénique, une pathologie rare qui résulte en l'émission de larges volumes d'urines diluées. Des mutations ont été identifiées sur le gène de l'AQP2 dans des formes héréditaires. Une diminution d'expression d'AQP2 lors de formes acquises a également été décrite [24]. Une altération de la coordination entre les AQPs des tissus adipeux et hépatiques chez l'homme obèse et le diabétique de type 2 a également été bien étudiée [27]. De plus, pour certains auteurs, la polyurie du diabète sucré ne peut être expliquée uniquement par la diurèse osmotique, et elle serait due également au manque d'insuline jouant un rôle au niveau rénal dans la réabsorption d'eau en partie par le biais des AQPs [34]. Le rôle de l'AQP7, qui en contrôlant le contenu pancréatique intracellulaire en glycérol participerait à la régulation de la sécrétion d'insuline, est également à l'étude dans le développement du DT2 [27]. D'autres pistes sont explorées : altération de l'expression de l'AQP9 dans le tissu synovial de patients avec arthrite rhumatoïde, des AQPs 1 et 5 dans le syndrome de Gougerot-Sjögren (syndrome sec) des glandes lacrymales et salivaires.

Certaines études se sont intéressées au rôle des AQPs dans l'hydramnios, mais uniquement dans un cadre idiopathique. Il en ressort une augmentation de l'expression des AQPs que l'on retrouve habituellement à terme sur ces membranes. Les AQPs 1 [42], 3, et 9 [43] augmentent au niveau de l'amnion et du chorion, et l'AQP8 n'augmente que dans l'amnion [44] [45]. Pour Mann et collaborateurs, l'augmentation d'expression d'AQP1 est vue comme un mécanisme visant à compenser l'augmentation de volume de liquide amniotique et non comme sa cause [42]. De façon parallèle, Zhu et collaborateurs ont montré une diminution compensatrice de certaines AQPs dans le cadre de l'oligohydramnios. L'expression diminuée de l'AQP1 dans l'amnion, et de l'AQP3 dans l'amnion et le chorion permet ainsi d'éviter l'absorption intra-membranaire et de maintenir une homéostasie [46].

4. OBJECTIFS

Le polyhydramnios est une pathologie fréquemment associée au diabète. Les mécanismes physiopathologiques de cette complication sont peu connus. Dans ce contexte, ils sont le plus souvent reliés à la polyurie fœtale consécutive à l'hyperglycémie, et le rôle des membranes fœtales, pourtant essentielles dans les mécanismes de régulation du volume de liquide amniotique, n'a été que peu étudié. Les seules études réalisées l'ont été dans un cadre idiopathique. Elles ont par ailleurs montré des niveaux d'expression différents des AQP_s dans les membranes fœtales, entre les grossesses ayant un volume de liquide amniotique normal ou non. Les voies d'activation n'ont pas non plus été étudiées.

Notre étude a pour objectif de préciser le rôle des AQP_s au sein des membranes chorio-amniotiques chez des parturientes diabétiques.

Notre travail s'est effectué en plusieurs étapes :

1. Tout d'abord, établir et comparer le profil d'expression transcriptionnel qualitatif et quantitatifs des AQP_s au sein de 88 membranes fœtales issues de 3 populations de parturientes : non diabétique, diabétique de type 1 (DT1), et diabétique de type 2 (DT2).
2. Ensuite, en cas de profils transcriptionnels différents, une étude à l'échelle protéique des AQP_s sera faite sur ces mêmes membranes.
3. Enfin, en cas de différences d'expression, nous étudierons l'effet de l'insuline sur l'expression des aquaporines identifiées au sein du chorion et de l'amnion.

MATERIELS - METHODES

1. COLLECTION DE MEMBRANES

Quatre-vingt huit femmes enceintes ont été recrutées à la maternité du Centre Hospitalier Universitaire Jeanne de Flandre de Lille dans le cadre du protocole Diamant (PHRC Régional initié en 2009). Ce protocole dirigé par le Pr Anne Wambergue, endocrinologue, est réalisé dans le cadre d'une étude clinico-biologique des femmes enceintes diabétiques (DT1 ou 2). Une collaboration a été initiée entre le laboratoire de Biochimie du CHU de Lille, responsable des collectes des échantillons biologiques pendant et à l'issue de la grossesse (Dr. Isabelle Fajardy) et le laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire du CHU de Clermont-Ferrand (Pr Vincent Sapin). Un amendement au PHRC a été réalisé afin de pouvoir utiliser les membranes amniotiques.

Les quatre-vingt huit membranes fœtales sont issues de grossesses à terme. Le recrutement s'est fait selon 3 groupes définis préalablement :

- Un groupe témoin constitué de femmes non diabétiques (n = 37).
- Un groupe DT1 (n = 35).
- Un groupe DT2 (n = 16).

Les membranes fœtales ont été stockées à -80°C et nous ont été envoyées congelées à la Faculté de Médecine de Clermont-Ferrand (Université d'Auvergne), dans l'équipe de recherche du Pr Vincent Sapin, dont l'un des thèmes de recherche est la compréhension des mécanismes physiopathologiques au sein des membranes fœtales lors de pathologies obstétricales. La conservation s'est également faite à -80°C.

2. EXTRACTION DES ARN TOTAUX ET SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRES

L'extraction des ARN totaux des membranes fœtales a été réalisée avec le kit d'extraction ARN Easy Lipid Tissue Minikit[®] de Qiagen[®].

Brièvement, l'extraction d'ARN totaux se fait par broyage à froid d'un échantillon de nos membranes amniotiques d'environ 1 cm² dans 1 mL de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen[®]). Après homogénéisation des broyats, 0,2 mL de chloroforme a été ajouté et les échantillons ont été centrifugés 15 min à 12000 g à 4°C. La phase supérieure est conservée et 1 volume d'éthanol à 70% est ajouté. Après centrifugation sur colonne de filtration, le culot est lavé plusieurs fois par différents tampons. Une dernière centrifugation avec 30 à 50 µL d'eau sans RNase (Qiagen[®]) permet de reprendre le culot sec.

Les extractions d'ARN totaux ont été dosées et 3 µg ont été utilisés pour la synthèse d'ADNc avec le kit Superscript III[®] (Invitrogen[™]).

3. PCR QUANTITATIVE

Les quantifications des ADNc des aquaporines 1, 3, 8, et 9 par PCR en temps réel ont directement été réalisées (mise au point préalable au sein de l'équipe). Les PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du LightCycler[®] 480 (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Les amorces spécifiques utilisées sont regroupées dans le Tableau 1. Pour une réaction, 2 µL d'ADNc sont ajoutés au mélange réactionnel composé de : 6 µL d'eau, 1 µL d'amorce sens (10 mmol/L), 1 µL d'amorce antisens (10 mmol/L), et 10 µL du Master Mix Power SYBR Green I[®] (Roche). Le programme de PCR utilisé est : 10 minutes de dénaturation à 95°C, suivi de 40 cycles comprenant 10 secondes de dénaturation à 95°C, 10 secondes d'hybridation à 59°C (AQPs 1, 3) ou à 55°C (AQPs 8, 9) et 10 secondes d'élongation à 72°C. L'acquisition de la fluorescence se fait à la fin de l'élongation de chaque cycle et pour chaque capillaire.

L'ensemble de ces mesures permet d'obtenir la courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR et de déterminer le Cp (Crossing point) de chaque échantillon (minimum de cycles nécessaires pour voir une amplification). La quantification dans chaque expérience se fait grâce à l'utilisation de 2 gammes étalon, l'une pour le gène d'intérêt (AQP) et l'autre pour le gène de ménage (36B4). A la fin de l'amplification, la courbe de fusion de chaque échantillon est réalisée afin d'évaluer la pureté de l'amplification.

L'ensemble des expériences de quantification a été réalisé en triplicats. Dans chacune des 3 expériences, chaque échantillon a été dosé 2 fois (n=6).

GENE	Amorces	TM °C	Taille des produits amplifiés (pb)
Aquaporine 0	Sens : 5'- GAGGAAACCTAGCACTCAA -3' Antisens : 5'- TAATACATCCCAAAGAGGTG -3'	56	196
Aquaporine 1	Sens : 5'- ATCACCTCCTCCCTGACT -3' Antisens : 5'- CAGCCAGTGTAGTCAATAGC -3'	59	224
Aquaporine 2	Sens : 5'- CTCTCTCCATAGGCTTCTCT -3' Antisens : 5'- ACAGCACGTAGTTGTAGAGG -3'	56	189
Aquaporine 3	Sens : 5'- GAATAGTTTTGGGCTGTATT -3' Antisens : 5'- CCTATGAACTGGTCAAAGAA -3'	59	151
Aquaporine 4	Sens : 5'- GGAATCCTCTATCTGGTCAC -3' Antisens : 5'- CTAAGCTATGAGCCAGTG -3'	56	184
Aquaporine 5	Sens : 5'- ACCTTGTCGGAATCTACTTC -3' Antisens : 5'- AGAGCAGGTAGAAGTAAAGGA -3'	55	159
Aquaporine 6	Sens : 5'- TAGGCTCCACATCTCTC -3' Antisens : 5'- CCAGTTGAGACACTGTTCC -3'	56	154
Aquaporine 7	Sens : 5'- ATAGCAAAGATCCAGGAAAT -3' Antisens : 5'- ACAGTTAGCAAAGGTCACAG -3'	56	243
Aquaporine 8	Sens : 5'- CTGGAACCTCCACTGGATCT -3' Antisens : 5'- CCATCTCCAATGAAGCACCT -3'	55	87
Aquaporine 9	Sens : 5'- GGGAGCAGAAAAGGGA -3' Antisens : 5'- AGCCACATCCAAGGAC -3'	55	116
Aquaporine 10	Sens : 5'- AGTTTCTGGGTGTGTTTGTA -3' Antisens : 5'- ACTGCACCAAGATGTAATG -3'	56	243
Aquaporine 11	Sens : 5'- CATCACCTTTTGGTCTATG -3' Antisens : 5'- GAAAAAGCTGAACATCAAAA -3'	56	175
Aquaporine 12	Sens : 5'- CTTTTGTTTCCATCTGACC -3' Antisens : 5'- CGTACTCCAGTAAGGTGTGT -3'	56	185
36B4	Sens : 5'- AGGCTTTAGGTATCACTACT -3' Antisens : 5'- GCAGAGTTTCTCTGTGATA -3'	59	219
Insulin-Receptor	Sens : 5'- AAGACGTTGAGGATTACCT -3' Antisens : 5'- GTTCAACACCTTCTCAAAA -3'	59	222
IRS1	Sens : 5'- GTAGCTCAACTGGACATCAC -3' Antisens : 5'- GTTCAGTCAATGAAATCCTG -3'	59	197
IRS2	Sens : 5'- CAGCATTGACTTCTGTCC -3' Antisens : 5'- AACACAGTCATTGCTCAGAT -3'	59	180

Tableau 1 : Liste des amorces spécifiques utilisées pour les PCR (quantitatives et qualitatives).

4. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

Les protéines totales des membranes chorio-amniotiques sont extraites grâce au kit Plasma Membrane Protein Extraction Kit[®] de BioVision[®]. Les échantillons de nos membranes amniotiques d'environ 1 cm² sont broyés dans 1mL de Tampon (Homogenize Buffer[®]) selon les recommandations du fournisseur. Le surnageant est conservé à -20°C.

Le dosage des protéines totales sur nos extraits tissulaires de membranes a été effectué par un analyseur Modular P[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Il s'agit d'une technique colorimétrique basée sur la méthode du Biuret.

5. ELISA

La recherche du niveau d'expression protéique des aquaglycéroporines 3 et 9 est faite par méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sur les extraits de protéines totales des 88 membranes de notre collection. Ce dosage immuno-enzymatique sur support solide est réalisé avec les kits ELISA d'USCNK[®] (lots L110523523 pour l'AQP3 et L110523518 pour l'AQP9) en suivant les recommandations du fournisseur. La présence de l'AQP (3 ou 9) est mise en évidence par réaction enzymatique colorimétrique et lecture de la D.O. à 450nm au spectrophotomètre. Les concentrations d'AQPs de chaque échantillon sont déduites directement à partir de la courbe d'étalonnage réalisée par dilution du standard fourni.

6. CULTURE D'EXPLANTS EN PRESENCE D'INSULINE

Le produit de la délivrance (placenta et membranes chorio-amniotiques) (Figure 6), issu d'un accouchement non pathologique post-césarienne à terme (37 SA), a été recueilli dans un champ stérile au bloc opératoire du service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Clermont-Ferrand (Pr Denis Gallot). La

membrane a été gardée et l'amnion a été séparé du chorion. Le milieu utilisé pour la culture des explants est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Les divers échantillons (fragments de 1 cm² d'amnion et de chorion) ont été mis en culture immédiatement dans des plaques 6 puits avec un milieu de culture supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF Charcoal stripped), 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 0,25g/mL d'amphotéricine B. Cette mise en culture est faite en présence ou non d'insuline (Sigma-Aldrich® ; Réf. 19278 - 5mL) à une concentration de 10 nM ou 100 nM (concentrations classiquement utilisées dans la littérature). L'ensemble des expériences d'induction a été réalisé en triplicats. Les échantillons ont été congelés à -80°C après différents temps d'induction (6, 12, 24, et 48 heures).

L'extraction des ARN, la reverse transcription, et la quantification en PCR en temps réel des ADNc des AQPs 3 et 9, ont été réalisées selon les procédures précédemment décrites (2. et 3.).

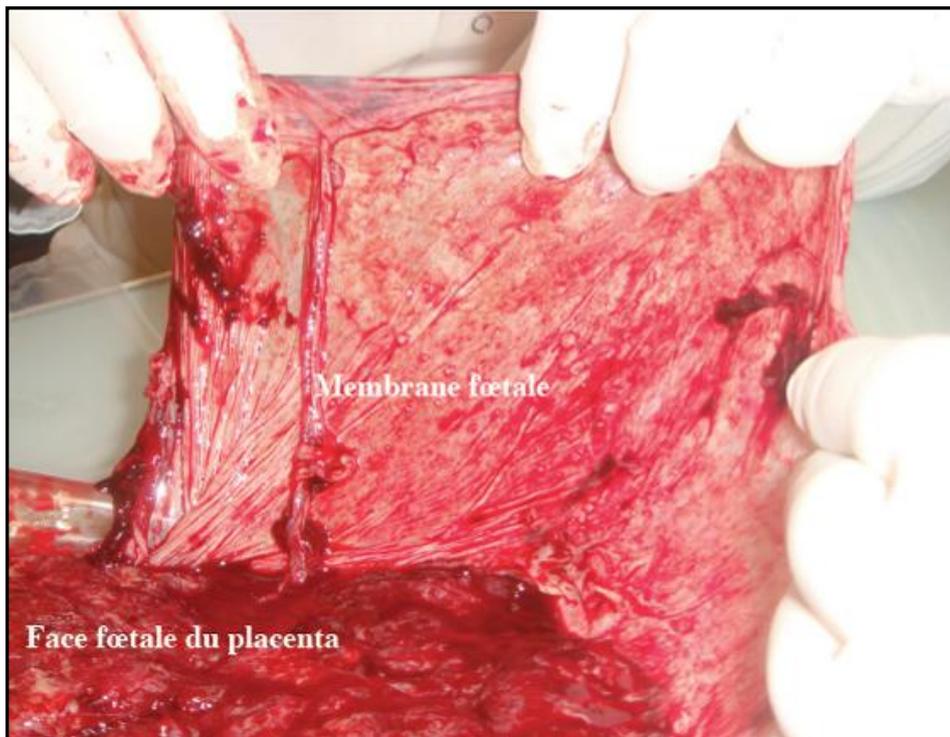


Figure 6 : Photographie d'un produit de la délivrance.
(Membranes chorio-amniotiques et placenta)

7. PCR

A partir des ADNc obtenus des 88 membranes, un profil d'expression des gènes des 13 aquaporines a été réalisé par PCR. De plus, à partir des ADNc issus d'échantillons d'amnion et de chorion, un profil d'expression des gènes du récepteur à l'insuline et de ses deux principaux substrats IRS1 et IRS2 a été également réalisé par PCR. Le kit *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen™) a été utilisé. Pour chaque PCR, la mise en évidence de l'expression d'un gène de ménage (36B4) a été réalisée. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 1.

Pour une réaction, 1 µL d'ADNc est ajouté au mélange réactionnel composé de : 24 µL d'eau, 5 µL d'amorce sens (10 mmol/L), 5 µL d'amorce antisens (10 mmol/L), 5 µL de tampon PCR, 4 µL de dNTP, 4,75 µL de MgCl₂ (50 mmol/L) et 0,25 µL de Taq polymérase 5U. Les PCR comptaient 40 cycles d'amplification avec une dénaturation initiale de 10 minutes à 94°C, une élongation finale de 10 minutes à 72°C et pour chaque cycle, une étape de dénaturation de 45 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 45 secondes à 56°C (pour le récepteur à l'insuline et IRS1) ou à 59°C (pour IRS2), et une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C.

Les produits d'amplification ont été déposés sur un gel d'agarose à 2%.

8. STATISTIQUES

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé :

- pour la comparaison de l'expression ARN (AQPs 1, 3, 8 et 9) ou protéines (AQPs 3 et 9) des différents groupes (témoin vs DT1, témoin vs DT2, DT1 vs DT2) des 88 membranes collectées à Lille.
- pour la comparaison de l'expression ARN (AQPs 3 et 9), au sein des explants (amnion ou chorion) cultivés (voir VI-), des différents

groupes (non traité vs traité par 10nM d'insuline, non traité vs traité par 100 nM d'insuline).

Pour la comparaison de l'expression ARN (AQP3 et 9), au sein des explants (amnion ou chorion) cultivés (voir VI-), entre les différents temps de traitement par l'insuline (6h, 12h, 24h, 48h), il a été réalisé une ANOVA à 1 facteur complétée par un test post hoc de Tukey afin de tester les paires de groupes pour lesquelles les différences sont significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Prism version 5 de GraphPad®. Des valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

RESULTATS

1. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQPs AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES DES FEMMES DIABETIQUES (DT1 ET DT2) OU NON

1.1 Expression qualitative des ARN

L'expression des ARNm des 13 AQPs au sein des 88 membranes fœtales a été étudiée par PCR. Le but est d'identifier une éventuelle modification (effet on-off) qualitative d'expression (expression d'un gène d'AQP non exprimé à l'état basal ou extinction de l'expression d'un gène d'AQP exprimé à l'état basal) (tableau 2).

Nous n'avons pas mis en évidence de modifications qualitatives d'expression. Les AQPs exprimées au sein des membranes sont les AQPs 1, 3, 8, 9 et 11 quelque soit le groupe (témoin, DT1, DT2). Une étude quantitative du niveau d'expression a donc été décidée pour ces aquaporines.

Groupe	Aquaporines												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoin	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
DT1	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
DT2	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-

Tableau 2 : Expression des ARNm des AQPs au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin, diabète de type 1 (DT1), diabète de type 2 (DT2). + = présence d'ARN, - = absence d'ARN

1.2 Quantification de l'expression des gènes des aquaglycéroporines

1.2.1 Etude de l'AQP3

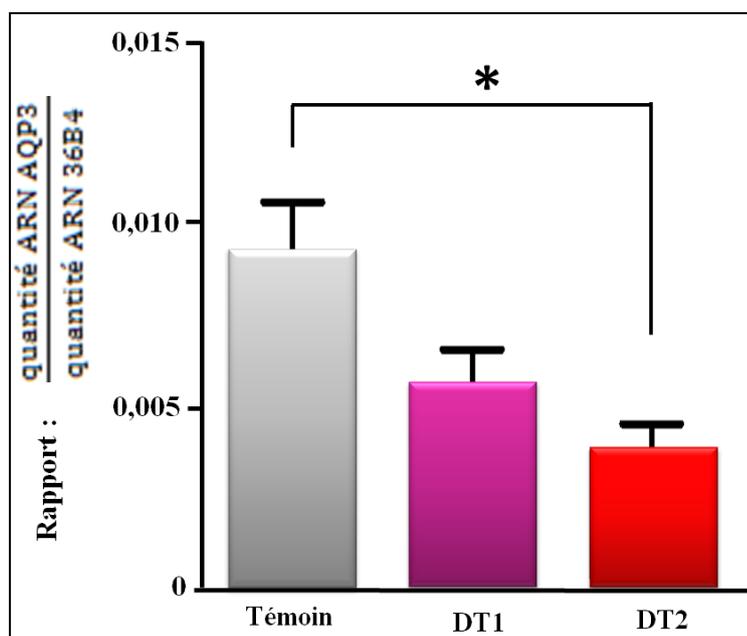
- ARN

La quantification de l'expression des ARNm du gène de l'AQP3 au sein des 88 membranes fœtales a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (Figure 7A). Nous observons par rapport au groupe témoin une diminution d'expression de 39% au niveau du groupe DT1 ($p = 0,07$) ainsi qu'une diminution statistiquement significative ($p = 0,03$) de 60% au niveau du groupe DT2.

- Protéines

La quantification de l'expression protéique de l'AQP 3 au sein des 88 membranes fœtales a été réalisée par méthode immunoenzymatique (ELISA) (Figure 7B). Nous constatons la même tendance que pour les ARNm avec par rapport au groupe témoin une diminution de 31% au niveau du groupe DT1 ainsi qu'une diminution de 62% au niveau du groupe DT2. En revanche, ces différences ne sont pas statistiquement significatives (p respectivement à 0,58 et 0,16).

7A.



7B.

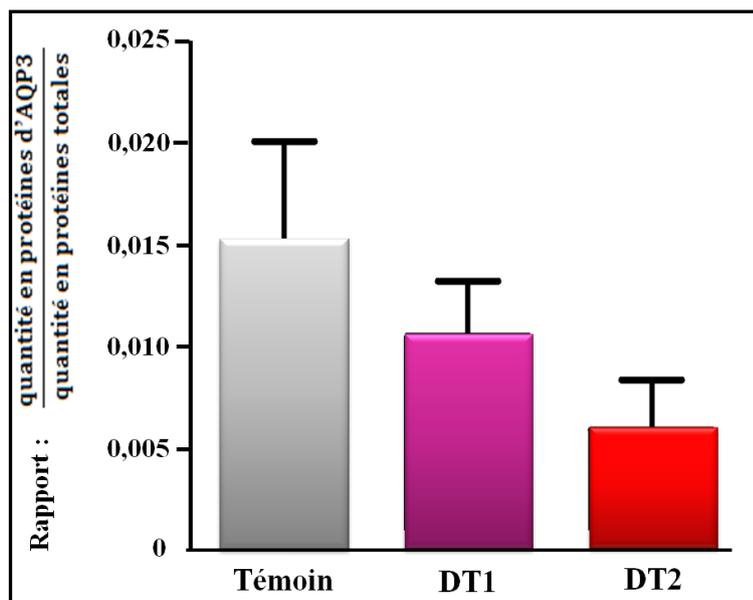


Figure 7 : Expression ARN (A) et protéique (B) du gène de l'AQP3 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin (n= 37), diabète de type 1 (DT1) (n= 35), diabète de type 2 (DT2) (n= 16).

A. Les ARN extraits d'explants de membranes d'environ 1 cm² ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative (n=6). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4). Différence statistiquement significative entre les groupes Témoin et DT2 (* : p= 0,03).

B. Les protéines d'AQP3 ont été quantifiées par ELISA à partir des protéines totales extraites d'explants de membranes d'environ 1 cm². Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles des protéines totales.

1.2.2 Etude de l'AQP9

- ARN

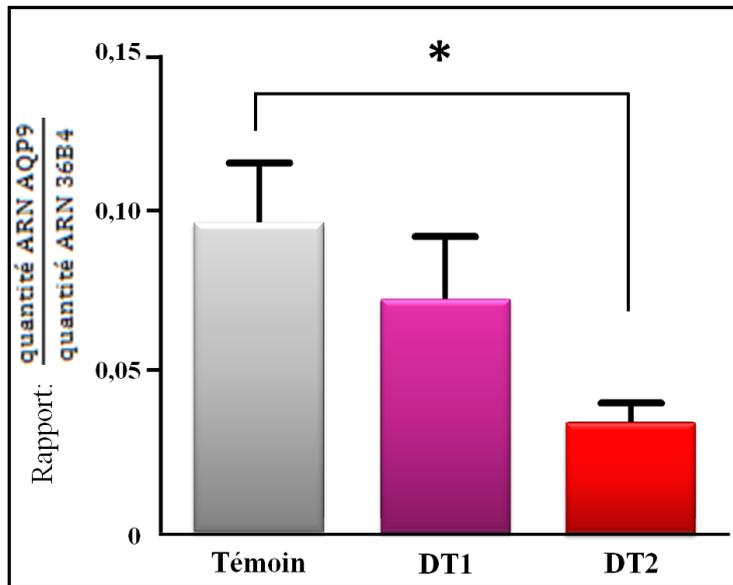
La quantification de l'expression des ARNm du gène de l'AQP9 au sein des 88 membranes fœtales a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (Figure 8A). Nous observons par rapport au groupe témoin une diminution d'expression de 24% au niveau du groupe DT1 (p = 0,1) ainsi qu'une diminution statistiquement significative (p = 0,02) de 64% au niveau du groupe DT2.

- Protéines

Malgré des concentrations protéiques observées plus basses en AQP9 pour le groupe des diabètes (DT1 et DT2) en comparaison avec le groupe

témoin, les différences ne sont pas statistiquement significatives (Figure 8B).
($p = 0,42$ pour témoin vs DT1, et $p = 0,30$ pour témoin vs DT2).

8A.



8B.

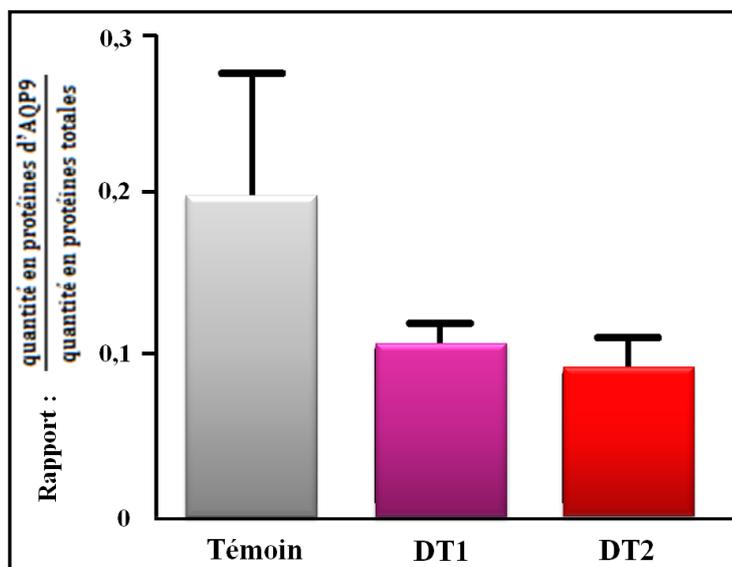


Figure 8 : Expression ARN (A) et protéique (B) de l'AQP9 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin ($n = 37$), diabète de type 1 (DT1) ($n = 35$), diabète de type 2 (DT2) ($n = 16$).

A. Les ARN extraits d'explants de membranes d'environ 1 cm^2 ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative ($n = 6$). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4). Différence statistiquement significative entre les groupes Témoin et DT2 (* : $p = 0,02$).

B. Les protéines d'AQP9 ont été quantifiées par ELISA à partir des protéines totales extraites d'explants de membranes d'environ 1 cm^2 . Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles des protéines totales.

1.3 Quantification de l'expression des gènes des aquaporines « classiques » des aquaglycéroporines

1.3.1 Etude de l'AQP1

La quantification de l'expression des ARNm du gène de l'AQP1 au sein des 88 membranes fœtales a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (Figure 9). Nous observons par rapport au groupe témoin une augmentation d'expression de 39% au niveau du groupe DT1 ($p = 0,30$) ainsi qu'une diminution d'expression statistiquement significative ($p = 0,01$) de 47% au niveau du groupe DT2.

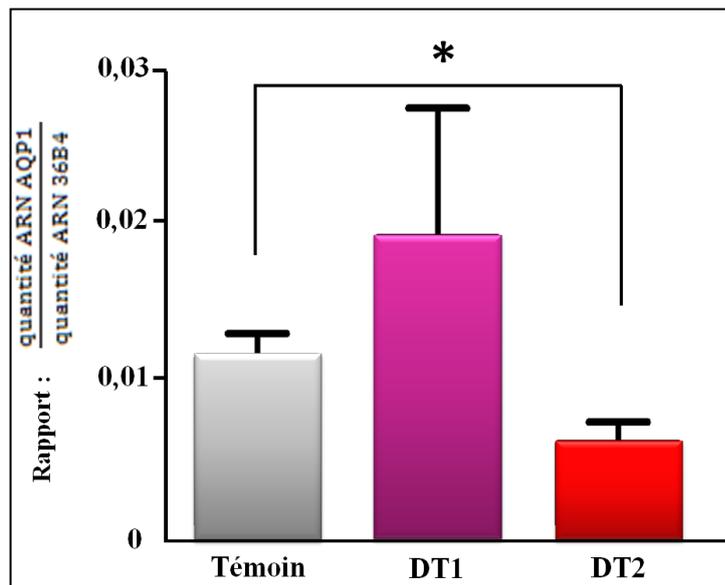


Figure 9 : Expression ARN du gène de l'AQP1 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin ($n = 37$), diabète de type 1 (DT1) ($n = 35$), diabète de type 2 (DT2) ($n = 16$).

Les ARN extraits d'explants de membranes d'environ 1 cm^2 ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative ($n = 6$). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4). Différence statistiquement significative entre les groupes Témoin et DT2 (*: $p = 0,01$).

1.3.2 Etude de l'AQP8

La quantification de l'expression des ARNm du gène de l'AQP8 au sein des 88 membranes fœtales a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (Figure 10). Nous observons par rapport au groupe témoin une augmentation d'expression de 39% au niveau du groupe DT1 ainsi qu'une diminution d'expression de 26% au niveau du groupe DT2. En revanche, ces différences ne sont pas statistiquement significatives (p respectivement à 0,17 et 0,57).

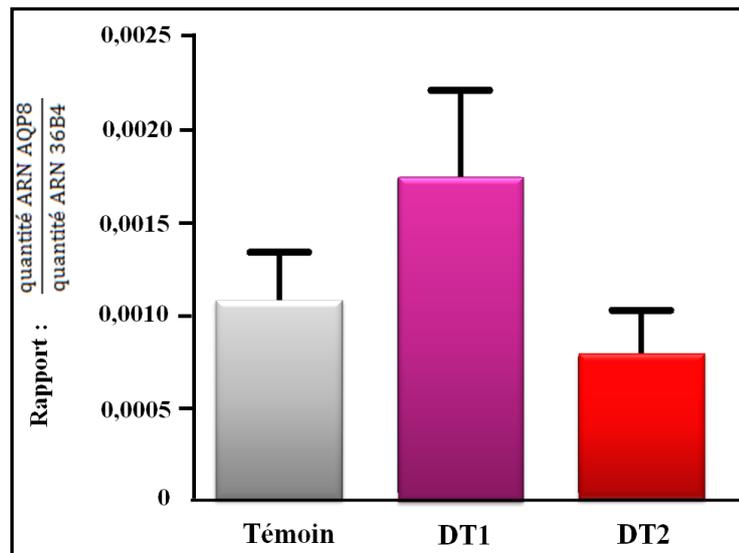


Figure 10 : Expression ARN du gène de l'AQP8 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin ($n= 37$), diabète de type 1 (DT1) ($n= 35$), diabète de type 2 (DT2) ($n= 16$).

Les ARN extraits d'explants de membranes d'environ 1 cm^2 ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative ($n=6$). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4).

2. ÉTUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQUAGLYCEROPORINES PAR L'INSULINE AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES

2.1 Expression des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline

L'expression qualitative des ARN des gènes des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline au sein des membranes fœtales a été mise en évidence par PCR. Nous avons choisi d'étudier le récepteur de l'insuline et ses 2 principaux substrats : IRS-1 et IRS-2. L'objectif est de s'assurer de la présence de cette voie de signalisation dans les membranes fœtales avant d'étudier les éventuels effets de l'insuline sur l'expression des AQP_s sur des cultures d'explants d'amnion et de chorion. Ainsi, nous mettons en évidence l'expression ARN de ces trois gènes au sein de l'amnion et du chorion (Figure 11).

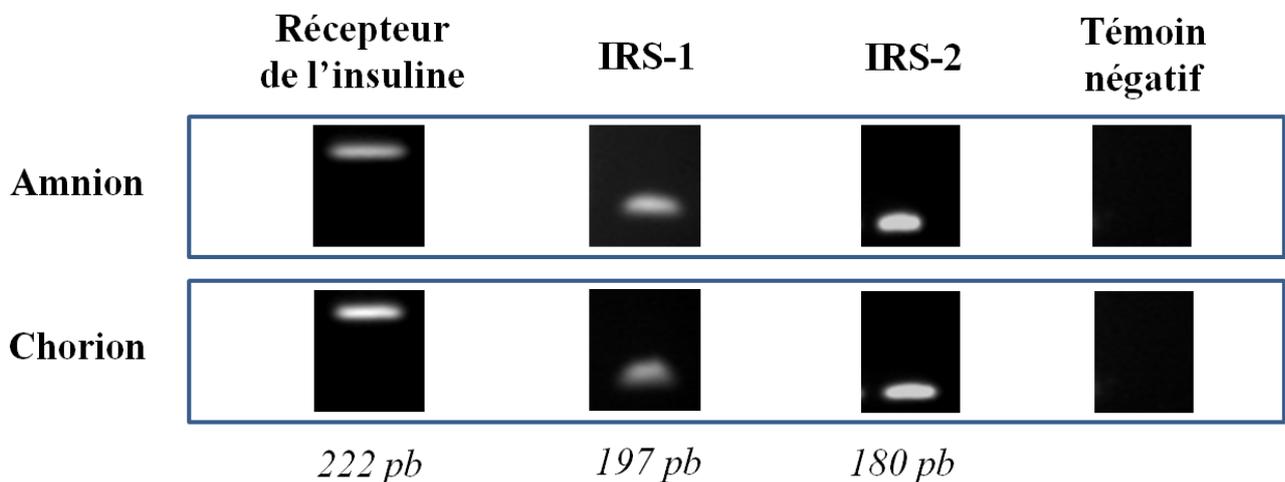


Figure 11 : Expression ARN des gènes des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline au sein de l'amnion et du chorion : Récepteur de l'insuline, IRS-1 et IRS-2.

Les ARN extraits d'explants d'amnion et de chorion d'environ 1 cm² ont été rétrotranscrits. Après PCR des ADNc obtenus, les produits ont été déposés sur gel d'agarose à 2% pour la migration électrophorétique.

2.2 Quantification de l'expression transcriptionnelle des gènes des aquaglycéroporines 3 et 9 au sein des membranes fœtales

Les ARNm des gènes des AQP3 et 9, extraits d'explants d'amnion et de chorion mis en culture en présence ou non d'insuline (à 10 ou 100 nM) à différents temps (6, 12, 24, et 48 heures), ont été quantifiés par PCR quantitative.

2.2.1 Etude de l'AQP3

Au niveau du chorion, nous n'avons pas observé d'effet de l'insuline sur l'expression ARN de l'AQP3, que ce soit de façon concentration-dépendante ou temps-dépendant (résultats non illustrés).

Au niveau de l'amnion (Figure 12), en comparant l'expression ARN du gène AQP3, pour chaque temps d'incubation, entre les explants non traités et ceux traités par insuline, il est observé des différences significatives lors d'un traitement par 10 nM d'insuline après 24 (diminution d'expression de 31%, $p < 0,001$) et 48 heures (diminution d'expression de 86%, $p < 0,0001$). Pour les explants traités par 100 nM d'insuline, les différences sont significatives plus tôt, dès 12h de culture (diminution de 48%, $p < 0,02$), et s'accroissent après 24 et 48 heures (diminutions respectives de 66 et 88%, $p < 0,0001$).

Si pour chaque concentration d'insuline donnée (10 nM ou 100 nM), les taux d'ARN sont comparés en fonction du temps de traitement, le traitement à 10 nM présente une différence statistiquement significative entre la 6^{ème} heure d'incubation et les 24^{ème} et 48^{ème} heures d'incubation avec des diminutions d'expression respectives de 35% et 87%. La différence est également significative entre la 24^{ème} et la 48^{ème} heure avec 80% de diminution d'expression.

Pour un traitement à 100 nM, les différences avec la 6^{ème} heure de culture sont statistiquement significatives, avec des diminutions d'expression respectives à 12, 24, et 48 heures, de 66%, 72%, et 92%. A la 48^{ème} heure de

culture, il est observé également une baisse d'expression significative par rapport aux 12^{ème} et 24^{ème} heures (de respectivement 88% et 75%).

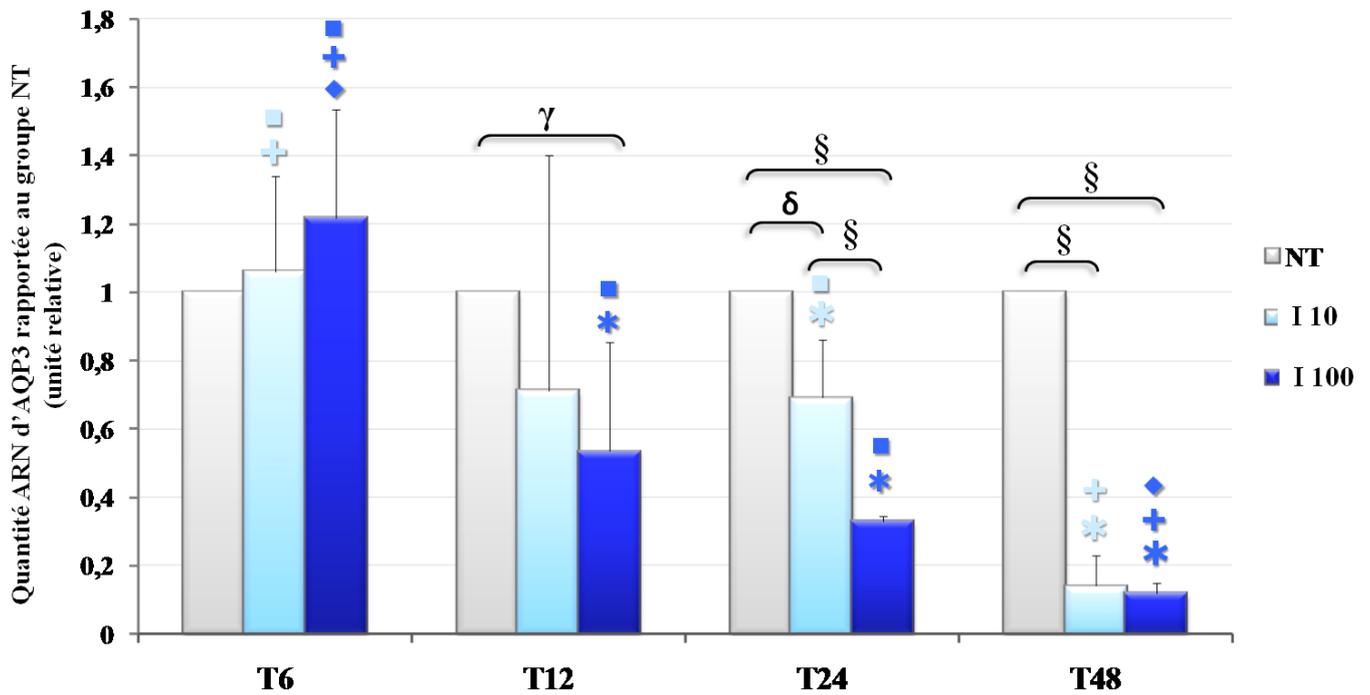


Figure 12 : Etude de l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de l'AQP3 dans l'amnion.

Les explants d'amnion (1 cm²) ont été cultivés pendant 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) et 48 heures (T48) avec ou sans insuline, d'où les conditions suivantes : non traité (NT), cultivé en présence d'insuline à 10 nM (I 10) ou 100 nM (I 100). Les ARN extraits ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative (n=6). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4). Chaque ratio a été à son tour rapporté au ratio issu de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement à l'insuline (NT). Les échantillons non traités présentent donc à chaque temps des ratios à 1. Différence statistiquement significative avec : $p < 0,02$: γ , $p < 0,001$: δ , $p < 0,0001$: \S . Différence temps-dépendant statistiquement significative par rapport : au T6 : $*$, au T12 : \blacklozenge , au T24 : $+$, au T48 : \blacksquare .

2.2.2 Etude de l'AQP9

Au niveau du chorion, nous n'avons pas observé d'effet de l'insuline sur l'expression ARN de l'AQP9, que ce soit de façon concentration-dépendante ou temps-dépendant. (résultats non illustrés).

Au niveau de l'amnion (Figure 13), il est observé dès 6h de traitement par l'insuline une augmentation des taux d'ARN du gène AQP9 qui est suivie d'une décroissance. En effet, dès la 6^{ème} heure de culture, des différences significatives sont retrouvées, d'une part entre les explants non traités et ceux traités par insuline à 10 nM (induction d'un facteur 5,7) et 100 nM (induction d'un facteur 11) ($p < 0,001$), et d'autre part entre les 2 groupes traités ($p < 0,02$). Aux 12^{ème} et 24^{ème} heures de culture, cette induction ne reste significative que pour le traitement insulinique à 10 nM ($p < 0,001$ à 12 heures et $p < 0,02$ à 24 heures). Après 48 heures de culture, l'effet s'inverse et il est retrouvé cette fois par rapport à la condition « non traité » une baisse d'expression de 66% avec de l'insuline à 10 nM ($p < 0,02$) et de 83% avec de l'insuline à 100 nM ($p < 0,001$). De plus l'effet dose est significatif à 48h ($p < 0,001$).

En s'intéressant pour chaque concentration d'insuline donnée, à la décroissance des taux d'ARN en fonction du temps, qui fait suite à cette première phase d'induction par rapport au groupe non traité, il est observé une baisse régulière après culture dans 10 nM d'insuline. Les différences sont en effet significatives entre les 4 temps de culture avec, par rapport aux taux de la 6^{ème} heure, une baisse de 35% à 12 heures, 75% à 24 heures, et 94% après 48 heures. Par contre, avec une concentration plus forte d'insuline (100nM), la diminution du taux d'ARN après la 6^{ème} heure est plus brutale, avec 89 % de perte dès la 12^{ème} heure. Les différences entre les différents temps ne sont donc significatives qu'avec la 6^{ème} heure.

3.

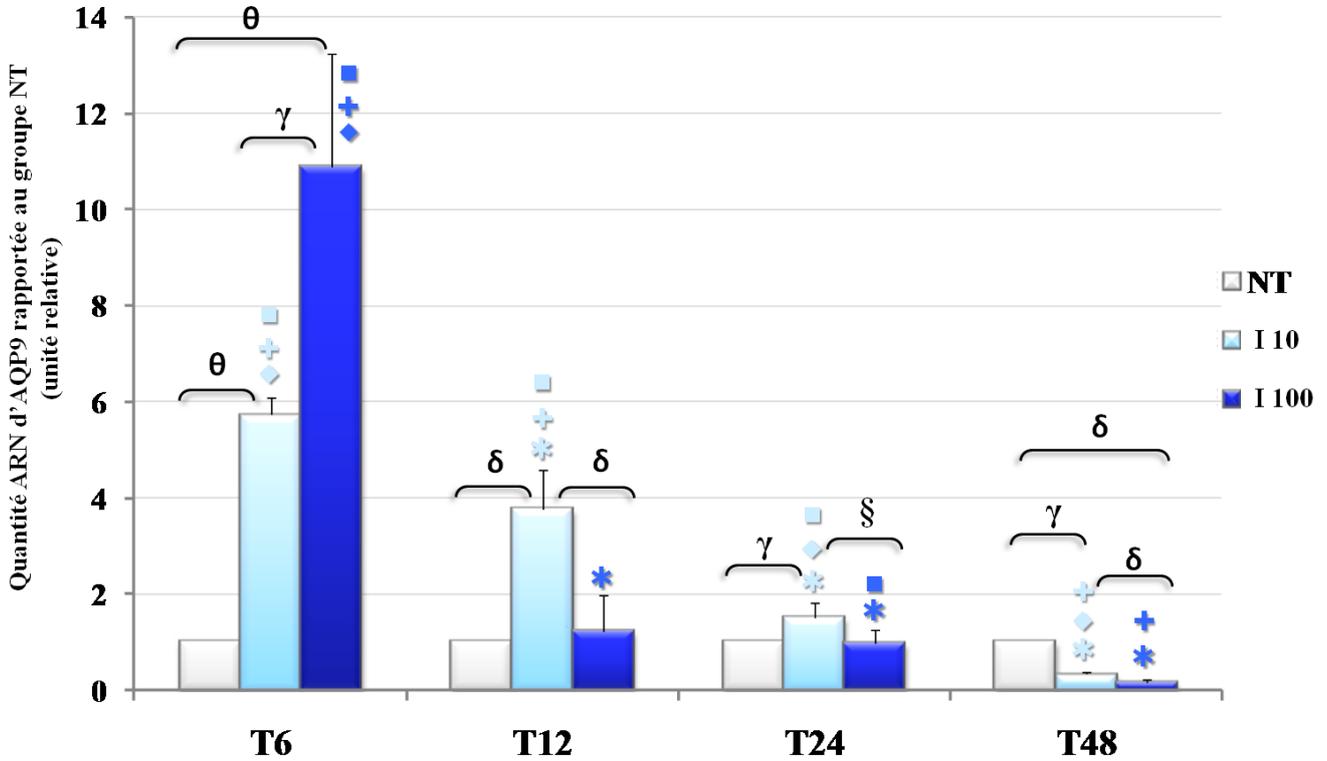


Figure 13 : Etude de l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de l'AQP9 dans l'amnion.

Les explants d'amnion (1 cm²) ont été cultivés pendant 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) et 48 heures (T48) avec ou sans insuline, d'où les conditions suivantes : non traités (NT), cultivé en présence d'insuline à 10 nM (I 10) ou 100 nM (I 100). Les ARN extraits ont été rétrotranscrits puis quantifiés 3 fois en duplicates par PCR quantitative (n=6). Les concentrations obtenues ont été normalisées à celles d'un gène de ménage (36B4). Chaque ratio a été à son tour rapporté au ratio issu de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement à l'insuline (NT). Les échantillons non traités présentent donc à chaque temps des ratios à 1. Différence statistiquement significative avec : $p < 0,02$: γ , $p < 0,01$: θ , $p < 0,001$: δ , $p < 0,0001$: σ . Différence temps-dépendant statistiquement significative par rapport : au T6 : *, au T12 : ♦, au T24 : †, au T48 : ■.

DISCUSSION

Le liquide amniotique joue un rôle essentiel dans le déroulement de la grossesse, et la normalité de son volume est un bon indicateur du bien être fœtal. Malgré une régulation fine, des anomalies de volume peuvent survenir (oligoamnios ou polyhydramnios) et sont fortement associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité fœtale.

Il est établi que les aquaporines jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie hydrique de l'organisme, et qu'elles participent également à la régulation du volume amniotique. Une expression des AQP1, 3, 8 et 9 au sein des membranes chorio-amniotiques a déjà été rapportée dans un cadre physiologique de la grossesse, ainsi qu'un accroissement de leur expression dans le polyhydramnios idiopathique. Par ailleurs, l'association fréquente du polyhydramnios au diabète est connue. Par contre, le rôle des membranes fœtales via les aquaporines dans la régulation du volume amniotique chez la femme enceinte diabétique n'a jamais été investigué.

Suite à ces observations, nous avons pour la première fois établi un profil d'expression des gènes des AQP1 au sein des membranes fœtales issues de grossesses de femmes diabétiques (DT1 et DT2), puis mis en évidence le rôle de l'insuline dans l'expression des aquaglycéroporines au sein de ces membranes.

La première étape a été d'étudier le profil d'expression des gènes des aquaporines au sein de notre collection de 88 membranes fœtales et ensuite de comparer leur expression selon les 3 groupes définis : témoin (n=37), DT1 (n=35), et DT2 (n=16). Au niveau des ARN, nous avons démontré qu'il n'y avait pas de modification d'expression qualitative des gènes des 13 aquaporines au sein de ces membranes (pas d'effet on-off). En effet les gènes des AQP1, 3, 8, 9 et 11 s'expriment toujours et ceux des AQP2, 4, 5, 6, 7, 10 et 12 ne s'expriment pas. Les ARNm des gènes des AQP1, 3, 8 et 9 (exprimées à la surface des membranes plasmiques des cellules) ont été

quantifiés par RT-PCR quantitative. L'AQP11, protéine présente au niveau intracellulaire (principalement dans le réticulum endoplasmique) n'a pas été étudiée.

Il ressort de cette étude un profil ARN quantitatif similaire pour, d'un côté, les aquaglycéroporines 3 et 9 (Figures 7A et 8A), et de l'autre, les aquaporines classiques 1 et 8 (Figures 9 et 10). L'expression des transcrits des aquaglycéroporines est en effet plus faible dans les membranes fœtales issues de grossesses de femmes diabétiques. Le groupe DT2 présente les taux les plus bas, avec une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin. Pour les AQPs 1 et 8, les taux de transcrits les plus importants concernent le groupe DT1, et les taux les plus bas, de nouveau le groupe DT2. La différence est significative pour l'expression de l'AQP1 dans le DT2 en comparaison au groupe témoin.

Au vu de ces résultats, une quantification de l'expression protéique des AQPs 3 et 9 a également été réalisée sur ces 88 membranes chorio-amniotiques. Il en ressort le même profil qu'en transcrits avec des taux plus faibles pour le groupe DT2 (Figures 7B et 8B). On ne peut toutefois parler que d'une tendance, car la comparaison statistique des groupes témoin et DT2 n'est pas significative. Deux explications peuvent être proposées : la faible sensibilité de notre technique ELISA sur des concentrations protéiques trop faibles, et une quantification protéique faite une seule fois sur ces membranes (n=1) par opposition à la répétition des dosages par PCR quantitative pour les transcrits (n=6).

Les principales différences concernent donc le groupe DT2 pour lequel une expression significativement plus basse des gènes des aquaglycéroporines 3 et 9, ainsi que de l'AQP1, a été mise en évidence. Nous supposons que l'imprégnation insulinique des 16 membranes fœtales du groupe DT2 a été importante au cours de la grossesse. En effet, en dehors de l'hyper-insulinémie physiologique en fin de grossesse, ces jeunes femmes diabétiques étaient probablement sujettes à un hyperinsulinisme propre à leur diabète de type 2. De plus, les antidiabétiques oraux étant contre-indiqués, un apport iatrogène d'insuline est fréquent au cours de ces grossesses afin de maintenir l'équilibre

glycémique. Quant au DT1, malgré la carence inhérente à ce type de diabète, les injections quotidiennes d'insuline, majorées pendant la grossesse, pourraient entraîner une imprégnation insulinique forte au moment des pics suivants les injections, sans toutefois atteindre les taux du DT2. Cette hypothèse expliquerait l'effet répresseur non significatif observé sur ces AQP. Cette hypothèse pourra être vérifiée lors de la comparaison entre les niveaux d'expression des AQP et les insulinémies des patientes que doivent nous fournir les investigateurs lillois.

L'insuline est une hormone anabolisante, essentielle à l'homéostasie glucidique, connue pour réguler la transcription de plus de 150 gènes, de façon négative ou positive. Le rôle répresseur de l'insuline sur l'expression de certaines aquaglycéroporines a déjà été montré sur des tissus essentiels au métabolisme glucidique [26] [35] [36] [40].

En raison de ces différents éléments, nous sommes partis du postulat que la répression des aquaglycéroporines 3 et 9 observée dans nos membranes DT2 serait due à l'insuline. Cette hormone participerait ainsi à la régulation du volume amniotique par le biais des AQP.

L'existence d'une voie de régulation de l'insuline n'a jamais été mise en évidence dans ces membranes. Nous avons donc déjà établi la présence du récepteur à l'insuline ainsi que ses 2 principaux substrats IRS-1 et 2, et avons supposé présente la voie d'activation PI3K/Akt/mTOR, ubiquitaire. Celle-ci a été décrite comme étant la voie de régulation de la transcription des gènes des AQP par l'insuline après activation de ses 2 substrats [13] [26] [27] [39].

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mis en culture des explants de chorion et d'amnion, issus d'une grossesse non pathologique, en présence ou non d'insuline. La comparaison de l'expression ARN des gènes AQP3 et AQP9, entre les explants traités ou non, ne montre aucune différence sur le chorion. Mais, sur l'amnion nous confirmons l'effet de l'insuline que nous attendions, puisque au bout de 48 heures de culture, les deux aquaglycéroporines ont leurs transcriptions réprimées (Figures 12 et 13). Dans les deux cas, nous mettons en évidence un effet concentration-dépendante (différence selon la concentration d'insuline testée) ainsi qu'un effet temps-

dépendant. Pour l'AQP9, l'inhibition transcriptionnelle par l'insuline observée à 48h de traitement s'observe après une induction précoce de cette même transcription (Figure 13). Cet effet ne dure pas puisque à partir de la 12^{ème} heure nous assistons à une décroissance régulière des taux d'ARN du gène AQP9. Si ce phénomène n'a jamais été précédemment publié, il faut noter qu'aucune étude n'a exploré son expression à 6 heures. Après 24 heures, les taux des échantillons traités rejoignent ceux des non traités, et à 48 heures de culture, on retrouve comme pour l'AQP3 une diminution significative des taux de transcrits après traitement par insuline.

Des études *in vitro* ont déjà montré le rôle répresser de l'insuline sur la transcription des gènes de l'AQP3 et de l'AQP9 [26] [36] [35], mais elles ne se sont portées que sur des tissus en lien évident avec le métabolisme glucidique et lipidique (foie, tissu adipeux, intestin). Cette régulation de l'expression des AQP3 et 9 par l'insuline dans les membranes fœtales apporte donc de nouvelles données sur les AQPs et leur régulation, et nous permet de confirmer notre hypothèse.

Pour ces 2 gènes, il a été montré que la voie de transcription PI3K conduit à cet effet répresser, mais tous les acteurs ne sont pas identifiés. Chez l'homme, Kuriyama et collaborateurs ont identifié la présence d'une séquence cis-régulatrice appelée IRE (*Insulin Response Element*) dans le promoteur du gène de l'AQP9. Higushi et collaborateurs firent de même pour le promoteur du gène de l'AQP3 (36). Ces IRE sont également retrouvés dans d'autres promoteurs de gènes comme Glucose-6-Phosphatase, PEPCCK, IGFBP-1 et IRS-2, et d'une autre aquaglycéroporine : l'AQP7. C'est en modifiant la fixation de facteurs de transcription sur ces IRE que l'insuline réprime la transcription de ces gènes [40]. Par exemple, Higushi et collaborateurs ont identifié le facteur de transcription Foxa2 (régulé par l'insuline) comme pouvant se fixer sur ces IRE [36].

Dans un contexte d'hyperinsulinisme associé à une insulino-résistance (DT2, obésité, syndrome métabolique), l'augmentation de l'expression ARN de certaines aquaglycéroporines est établie sur certains tissus touchés par la résistance à l'insuline [39] [41]. Cette perte de répression de la transcription

semble en partie se faire par l'inhibition de l'expression d'IRS-2. Cette diminution d'IRS-2 entraînant la perte du signal de l'insuline a été montrée chez une souris insulino-résistante, avec l'augmentation consécutive de la Glucose-6-Phosphatase (normalement inhibée par l'insuline), participant ainsi à l'hyperglycémie via activation de la néoglucogénèse [40]. De même, l'élévation de l'AQP7 dans le tissu adipeux malgré de hautes concentrations d'insuline, entraîne une libération plasmatique accrue de glycérol et d'acides gras libres [27] [40] [47]. Cet influx important dans le foie majoré l'hyperglycémie par néoglucogénèse. La diminution des AQP9 majoritairement présents dans le foie, contradictoire dans ce contexte d'hyperinsulinémie est vue comme un mécanisme compensatoire par certains auteurs, afin de lutter contre l'hyperglycémie, sans que ces mécanismes ne soient expliqués [27] [47]. Il semble donc y avoir une spécificité de l'expression des AQPs en fonction du tissu. A ce sujet, une augmentation de l'expression génique d'AQPs 3 et 9 a déjà été montrée en présence d'insuline sur des lignées cellulaires d'adipocytes de l'omentum et sur des hépatocytes HepG2 par Rodriguez et collaborateurs [39]. Toutefois, cette étude ne s'est faite que sur l'expression protéique par dosage semi-quantitatif par Western-Blot.

CONCLUSION

En conclusion, notre étude a permis d'établir le profil d'expression des gènes des AQP_s 1, 3, 8, et 9 dans les membranes fœtales d'une population diabétique (DT1 et DT2). Les profils retrouvés sont comparables d'une part, pour les aquaglycéroporines 3 et 9 (ARN et protéines), et d'autre part pour les AQP_s classiques 1 et 8 (ARN). Le groupe DT2 présente une expression ARN significativement moins élevée pour les gènes des AQP_s 1, 3, et 9 par rapport au groupe témoin. Nous sommes partis du postulat que l'insuline participe à la régulation des 2 aquaglycéroporines 3 et 9, comme cela a déjà été démontré sur certains tissus (intestin et foie). Après avoir prouvé l'existence du récepteur à l'insuline et de ses 2 principaux substrats IRS-1 et 2 sur l'amnion et le chorion, nous avons établi une répression de l'expression de ces 2 AQP_s sur l'amnion après culture d'explant traités par de l'insuline. Nous confirmons ainsi l'hypothèse que cette répression génique des AQP_s 3 et 9 observée *in vivo*, est permise par l'hyperinsulinisme connu des patientes diabétiques de type 2. Ceci pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques du polyhydramnios en diminuant la diffusion facilitée de l'eau au sein des membranes fœtales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] DAVIDSON S., HASLETT C. *Médecine interne: principes et pratique*. 2^e éd.[s.l.] : Maloine, 2004. 1267 p. Disponible sur : ISBN : 9782224027896.
- [2] SHAW J. E., SICREE R. A., ZIMMET P. Z. « Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 ». *Diabetes Res. Clin. Pract* [En ligne]. janvier 2010,. Vol. 87, n°1, p. 4-14. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007> > (consulté le 21 mai 2011)
- [3] LEPERCQ J. « [Obstetrical management of progestational diabetes mellitus] ». *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. octobre 2002,. Vol. 31, n°6 Suppl, p. 4S11-14S7. Disponible sur :
- [4] HILLMAN N., HERRANZ L., VAQUERO P. M., VILLARROEL A., FERNANDEZ A., PALLARDO L. F. « Is pregnancy outcome worse in type 2 than in type 1 diabetic women? ». *Diabetes Care* [En ligne]. novembre 2006,. Vol. 29, n°11, p. 2557-2558. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.2337/dc06-0680> > (consulté le 22 mai 2011)
- [5] BELL R., BAILEY K., CRESSWELL T., HAWTHORNE G., CRITCHLEY J., LEWIS-BARNED N. « Trends in prevalence and outcomes of pregnancy in women with pre-existing type I and type II diabetes ». *BJOG* [En ligne]. mars 2008,. Vol. 115, n°4, p. 445-452. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01644.x> > (consulté le 22 mai 2011)
- [6] WAHABI H. A., ALZEIDAN R. A., BAWAZEER G. A., ALANSARI L. A., ESMAEIL S. A. « Preconception care for diabetic women for improving maternal and fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis ». *BMC Pregnancy Childbirth* [En ligne]. 2010,. Vol. 10, p. 63. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-10-63> > (consulté le 22 mai 2011)
- [7] LASSMANN-VAGUE V., BASDEVANT A., CATHELINÉAU G., FENICHEL P., LABORDE D., MOUROUX D., PINGET M., TCHOBROUTSKY C., UNAL D., VAMBERGUE A. « Grossesse et contraception chez la femme diabétique. Diabète gestationnel. ». In : *ALFEDIAM* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 1996. Disponible sur : < <http://www.alfediam.org/membres/recommandations/alfediam-grossesse.asp> >
- [8] KINSLEY B. « Achieving better outcomes in pregnancies complicated by type 1 and type 2 diabetes mellitus ». *Clin Ther* [En ligne]. 2007,. Vol. 29 Suppl D, p. S153-160. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.12.015> > (consulté le 18 juillet 2011)
- [9] ALI S., DORNHORST A. « Diabetes in pregnancy: health risks and management ». *Postgrad Med J* [En ligne]. juin 2011,. Vol. 87, n°1028, p. 417-427. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2010.109157> > (consulté le 19 juillet 2011)
- [10] MAHIEU-CAPUTO D., SENTILHES L., POPOVIC I., MARPEAU L., DESCAMPS P., MADELENAT P. « Physiologie du liquide amniotique ». *EMC (Elsevier Masson SAS)*. 2008,. Vol. 5-008-A-20,. Disponible sur :
- [11] HARMAN C. R. « Amniotic fluid abnormalities ». *Semin. Perinatol* [En ligne]. août 2008,. Vol. 32, n°4, p. 288-294. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2008.04.012> > (consulté le 18 juillet 2011)
- [12] IDRIS N., WONG S. F., THOMAE M., GARDENER G., MCINTYRE D. H. « Influence of polyhydramnios on perinatal outcome in pregestational diabetic pregnancies ». *Ultrasound Obstet Gynecol* [En ligne]. septembre 2010,. Vol. 36, n°3, p. 338-343. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1002/uog.7676> > (consulté le 18 juillet 2011)
- [13] LIU H., ZHENG Z., WINTOUR E. M. « Aquaporins and fetal fluid balance ». *Placenta* [En ligne]. octobre 2008,. Vol. 29, n°10, p. 840-847. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2008.07.010> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [14] BEALL M. H., VAN DEN WIJNGAARD J. P. H. M., VAN GEMERT M. J. C., ROSS M.

- G. « Regulation of amniotic fluid volume ». *Placenta* [En ligne]. septembre 2007., Vol. 28, n°8-9, p. 824-832. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2006.12.004> > (consulté le 29 mai 2011)
- [15] BRYANT-GREENWOOD G. D. « The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function ». *Placenta*. janvier 1998., Vol. 19, n°1, p. 1-11. Disponible sur :
- [16] GOLDENBERG R., HAUTH J., ANDREWS W. « Intrauterine infection and preterm delivery ». *N Engl J Med*. mai 2000., Vol. 342, p. 1500-1507. Disponible sur :
- [17] KENDAL-WRIGHT C. E. « Stretching, mechanotransduction, and proinflammatory cytokines in the fetal membranes ». *Reprod Sci* [En ligne]. décembre 2007., Vol. 14, n°8 Suppl, p. 35-41. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1177/1933719107310763> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [18] BEALL M. H., WANG S., YANG B., CHAUDHRI N., AMIDI F., ROSS M. G. « Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition ». *Placenta* [En ligne]. juin 2007., Vol. 28, n°5-6, p. 421-428. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2006.06.005> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [19] AGRE P. « Aquaporin water channels (Nobel Lecture) ». *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* [En ligne]. 20 août 2004., Vol. 43, n°33, p. 4278-4290. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200460804> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [20] KRUSE E., UEHLEIN N., KALDENHOFF R. « The aquaporins ». *Genome Biol* [En ligne]. 2006., Vol. 7, n°2, p. 206. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-2-206> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [21] ISHIBASHI K., HARA S., KONDO S. « Aquaporin water channels in mammals ». *Clin. Exp. Nephrol* [En ligne]. avril 2009., Vol. 13, n°2, p. 107-117. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-008-0118-6> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [22] DAMIANO A. E. « Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes ». *Placenta* [En ligne]. mars 2011., Vol. 32 Suppl 2, p. S207-211. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.012> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [23] ISHIBASHI K. « New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12 ». *Handb Exp Pharmacol* [En ligne]. 2009., n°190, p. 251-262. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_13 > (consulté le 24 juillet 2011)
- [24] KING L. S., KOZONO D., AGRE P. « From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology ». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* [En ligne]. septembre 2004., Vol. 5, n°9, p. 687-698. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1469> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [25] JUNG J. S., PRESTON G. M., SMITH B. L., GUGGINO W. B., AGRE P. « Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model ». *J. Biol. Chem*. 20 mai 1994., Vol. 269, n°20, p. 14648-14654. Disponible sur :
- [26] ASAI M., HIGUCHI S., KUBOTA M., IGUCHI K., USUI S., HIRANO K. « Regulators for blood glucose level affect gene expression of aquaporin 3 ». *Biol. Pharm. Bull*. mai 2006., Vol. 29, n°5, p. 991-996. Disponible sur :
- [27] RODRÍGUEZ A., CATALÁN V., GÓMEZ-AMBROSI J., FRÜHBECK G. « Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control ». *Cell Cycle*. 15 mai 2011., Vol. 10, n°10, p. 1548-1556. Disponible sur :
- [28] MANN S. E., RICKE E. A., YANG B. A., VERKMAN A. S., TAYLOR R. N. « Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes ». *Am. J. Obstet. Gynecol*. octobre 2002., Vol. 187, n°4, p. 902-907. Disponible sur :
- [29] WANG S., KALLICHANDA N., SONG W., RAMIREZ B. A., ROSS M. G. « Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption ». *Am. J. Obstet. Gynecol* [En ligne]. novembre 2001., Vol. 185, n°5, p. 1226-1231. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2001.117971> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [30] WANG S., CHEN J., BEALL M., ZHOU W., ROSS M. G. « Expression of aquaporin 9 in

- human chorioamniotic membranes and placenta ». *Am. J. Obstet. Gynecol* [En ligne]. décembre 2004,. Vol. 191, n°6, p. 2160-2167. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2004.05.089> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [31] WANG S., AMIDI F., BEALL M., GUI L., ROSS M. G. « Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture ». *J. Soc. Gynecol. Investig* [En ligne]. avril 2006,. Vol. 13, n°3, p. 181-185. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsigi.2006.02.002> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [32] PRAT C., BLANCHON L., BOREL V., GALLOT D., HERBET A., BOUVIER D., MARCEAU G., SAPIN V. « Ontogeny of aquaporins in the human fetal membranes ». *En attente de publication*. 2011,. Disponible sur :
- [33] NODA Y., SASAKI S. « Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex ». *Biochim. Biophys. Acta* [En ligne]. août 2006,. Vol. 1758, n°8, p. 1117-1125. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.004> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [34] BUSTAMANTE M., HASLER U., KOTOVA O., CHIBALIN A. V., MORDASINI D., ROUSSELOT M., VANDEWALLE A., MARTIN P.-Y., FÉRAILLE E. « Insulin potentiates AVP-induced AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells ». *Am. J. Physiol. Renal Physiol* [En ligne]. février 2005,. Vol. 288, n°2, p. F334-344. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00180.2004> > (consulté le 31 juillet 2011)
- [35] LIU H., MEI Z.-C., XIAO X. « [Effects of insulin and LY294002 inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells] ». *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. juin 2010,. Vol. 18, n°6, p. 455-458. Disponible sur :
- [36] HIGUCHI S., KUBOTA M., IGUCHI K., USUI S., KIHOTO T., HIRANO K. « Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin ». *J. Cell. Biochem* [En ligne]. 1 novembre 2007,. Vol. 102, n°4, p. 1051-1058. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21350> > (consulté le 31 juillet 2011)
- [37] OKAHIRA M., KUBOTA M., IGUCHI K., USUI S., HIRANO K. « Regulation of aquaporin 3 expression by magnesium ion ». *Eur. J. Pharmacol* [En ligne]. 24 juin 2008,. Vol. 588, n°1, p. 26-32. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.063> > (consulté le 31 juillet 2011)
- [38] QI H., LI L., ZONG W., HYER B. J., HUANG J. « Expression of aquaporin 8 is diversely regulated by osmotic stress in amnion epithelial cells ». *J. Obstet. Gynaecol. Res* [En ligne]. décembre 2009,. Vol. 35, n°6, p. 1019-1025. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1447-0756.2009.01061.x> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [39] RODRÍGUEZ A., CATALÁN V., GÓMEZ-AMBROSI J., GARCÍA-NAVARRO S., ROTELLAR F., VALENTÍ V., SILVA C., GIL M. J., SALVADOR J., BURRELL M. A., CALAMITA G., MALAGÓN M. M., FRÜHBECK G. « Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade ». *J. Clin. Endocrinol. Metab* [En ligne]. avril 2011,. Vol. 96, n°4, p. E586-597. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-1408> > (consulté le 24 juillet 2011)
- [40] KISHIDA K., SHIMOMURA I., KONDO H., KURIYAMA H., MAKINO Y., NISHIZAWA H., MAEDA N., MATSUDA M., OUCHI N., KIHARA S., KURACHI Y., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y. « Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel ». *J. Biol. Chem* [En ligne]. 28 septembre 2001,. Vol. 276, n°39, p. 36251-36260. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M106040200> > (consulté le 31 juillet 2011)
- [41] KURIYAMA H., SHIMOMURA I., KISHIDA K., KONDO H., FURUYAMA N., NISHIZAWA H., MAEDA N., MATSUDA M., NAGARETANI H., KIHARA S., NAKAMURA T., TOCHINO Y., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y. « Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9 ». *Diabetes*. octobre 2002,. Vol. 51, n°10, p. 2915-2921. Disponible sur :
- [42] MANN S. E., DVORAK N., GILBERT H., TAYLOR R. N. « Steady-state levels of

- aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios ». *Am. J. Obstet. Gynecol* [En ligne]. mars 2006,. Vol. 194, n°3, p. 884-887. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2005.07.004> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [43] ZHU X.-Q., JIANG S.-S., ZOU S.-W., HU Y.-C., WANG Y.-H. « [Expression of aquaporin 3 and aquaporin 9 in placenta and fetal membrane with idiopathic polyhydramnios.] ». *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. décembre 2009,. Vol. 44, n°12, p. 920-923. Disponible sur :
- [44] HUANG J., QI H.-BO. « [Expression of aquaporin 8 in human fetal membrane and placenta of idiopathic polyhydramnios] ». *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. janvier 2009,. Vol. 44, n°1, p. 19-22. Disponible sur :
- [45] ZHU X., JIANG S., HU Y., ZHENG X., ZOU S., WANG Y., ZHU X. « The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios ». *Early Hum. Dev* [En ligne]. octobre 2010,. Vol. 86, n°10, p. 657-663. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.07.012> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [46] ZHU X. Q., JIANG S. S., ZHU X. J., ZOU S. W., WANG Y. H., HU Y. C. « Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios ». *Placenta* [En ligne]. août 2009,. Vol. 30, n°8, p. 670-676. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.05.010> > (consulté le 23 juillet 2011)
- [47] CATALÁN V., GÓMEZ-AMBROSI J., PASTOR C., ROTELLAR F., SILVA C., RODRÍGUEZ A., GIL M. J., CIENFUEGOS J. A., SALVADOR J., VENDRELL J., FRÜHBECK G. « Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver ». *Obes Surg* [En ligne]. juin 2008,. Vol. 18, n°6, p. 695-701. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1007/s11695-008-9453-7> > (consulté le 21 août 2011)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	8
BIBLIOGRAPHIE	10
1. GROSSESSE CHEZ LA FEMME DIABETIQUE	10
1.1 Définitions	10
1.2 Epidémiologie	10
1.3 Prise en charge	11
1.4 Complications	12
2. PHYSIOPATHOLOGIE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE	12
2.1 Formation et flux.....	12
2.2 Composition	13
2.3 Rôles	14
2.4 Pathologies.....	14
2.5 Régulation du volume amniotique.....	16
3. MEMBRANE FŒTALE ET AQUAPORINES	16
3.1 Membranes	16
3.1.1 Structure	16
3.2 Aquaporines	18
3.2.1 Présentation.....	18
3.2.2 Structure – Fonction.....	19
3.2.4 Régulation	22
3.2.5 Régulation	24
4. OBJECTIFS	25
MATERIELS - METHODES	26
1. COLLECTION DE MEMBRANES	26
2. COLLECTION DE MEMBRANES	27
3. PCR QUANTITATIVE.....	27
4. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES TOTALES	29
5. ELISA.....	29

6. CULTURE D'EXPLANTS EN PRESENCE D'INSULINE	29
7. PCR	31
8. STATISTIQUES.....	31
RESULTATS	33
1. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQPs AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES DES FEMMES DIABETIQUES (DT1 ET DT2) OU NON	33
1.1 Expression qualitative des ARN	33
1.2 Quantification de l'expression des gènes des aquaglycéporines ...	34
1.2.1 Etude de l'AQP3.....	34
1.2.2 Etude de l'AQP9.....	35
1.3 Quantification de l'expression des gènes des aquaporines « classiques »des aquaglycéporines	37
1.3.1 Etude de l'AQP1.....	37
1.3.2 Etude de l'AQP8.....	38
2. ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES AQUAGLYCEROPORINES PAR L'INSULINE AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES	39
2.1 Expression des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline	39
2.2 Quantification de l'expression transcriptionnelle des gènes des aquaglycéporines 3 et 9 au sein des membranes fœtales	40
2.2.1 Etude de l'AQP3.....	40
2.2.2 Etude de l'AQP9.....	42
DISCUSSION	44
CONCLUSION	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
TABLE DES MATIERES	54
TABLE DES ILLUSTRATIONS	56
TABLE DES TABLEAUX	57
SERMENT DE GALIEN.....	58

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Constitution du liquide amniotique. Mouvements de fluides à mi-gestation.....	1E
rrreur ! Signet non défini.	
Figure 2 : Structure des membranes fœtales.....	17
Figure 3 : Arbre phylogénétique séparant les aquaporines et les aquaglycéroporines.....	19
Figure 4 : Structure des aquaporines.....	21
Figure 5 : Vue simplifiée de la voie d'activation PI3K / Akt / mTOR.....	23
Figure 6 : Photographie d'un produit de la délivrance.....	30
Figure 7 : Photographie d'un produit de la délivrance.....	35
Figure 8 : Expression ARN (A) et protéique (B) du gène de l'AQP3 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin (n= 37), diabète de type 1 (DT1) (n= 35), diabète de type 2 (DT2) (n= 16)	36
Figure 9 : Expression ARN du gène de l'AQP1 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin (n= 37), diabète de type 1 (DT1) (n= 35), diabète de type 2 (DT2) (n= 16).....	37
Figure 10 : Expression ARN du gène de l'AQP8 au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin (n= 37), diabète de type 1 (DT1) (n= 35), diabète de type 2 (DT2) (n= 16)	38
Figure 11 : <i>Expression ARN des gènes des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline au sein de l'amnion et du chorion : Récepteur de l'insuline, IRS-1 et IRS-2.....</i>	39
Figure 14 : Etude de l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de l'AQP3 dans l'amnion.	41
Figure 15 : Etude de l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de l'AQP9 dans l'amnion.....	43

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des amorces spécifiques utilisées pour les PCR (quantitatives et qualitatives).....	28
Tableau 2 : Expression des ARNm des AQP _s au sein des membranes fœtales en fonction des groupes définis : Témoin, diabète de type 1 (DT1), diabète de type 2 (DT2).....	3
.....	Erreur

! Signet non défini.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

LEMARIÉ Romain :

EXPRESSION DES AQUAPORINES AU SEIN DES MEMBRANES FŒTALES CHEZ LA PARTURIENTE DIABÉTIQUE

Thèse Pharmacie

Limoges

2011

Présentée à Clermont-Ferrand

RESUMÉ :

Notre étude vise à préciser le rôle des aquaporines (AQPs) au sein des membranes fœtales chez les parturientes diabétiques. Les AQPs sont essentielles à la régulation du volume amniotique mais n'ont jamais été explorées dans cette population particulièrement sujette au polyhydramnios.

A partir de 88 membranes fœtales, réparties selon 3 populations (37 témoins, 35 diabètes de type 1 (DT1), et 16 de type 2 (DT2)), nous avons établi un profil d'expression des gènes des AQPs 1, 3, 8, 9 et 11. L'expression des gènes du récepteur à l'insuline et de ses 2 principaux substrats IRS-1 et 2 a été établie par PCR sur des membranes fœtales séparées en ses 2 feuillettes (amnion et chorion). Des fragments de ces membranes ont été mis en culture en présence ou non d'insuline (10 ou 100 nM), et l'expression ARN des gènes des AQPs 3 et 9 a été quantifiée.

Les profils d'expression quantitatifs des gènes sont identiques dans les 3 groupes (AQPs 1, 3, 8, 9 et 11). Quantitativement, l'expression des transcrits des gènes des AQPs 1, 3 et 9 est significativement plus faible dans le groupe DT2. A l'échelle protéique, les AQPs 3 et 9 suivent la même tendance. L'expression des gènes de 3 acteurs de la voie de signalisation de l'insuline a été mise en évidence au sein des membranes fœtales. Enfin, la culture d'explants d'amnion a démontré une répression significative par l'insuline de l'expression ARN des gènes AQPs 3 et 9. Nous confirmons l'hypothèse que cette répression génique des AQPs 3 et 9 observées in vivo, est permise par l'hyperinsulinisme connu des patientes DT2. Ceci pourrait participer aux mécanismes du polyhydramnios en diminuant la diffusion facilitée de l'eau au sein des membranes fœtales.

MOTS-CLEFS : Aquaporines, Membranes fœtales, Diabète, Polyhydramnios, Insuline.

MEMBRES DU JURY :

Président : Professeur Alexis Desmoulières

Membres : Professeur Marie-Paule Vasson

Professeur Denis Gallot

Professeur Vincent Sapin

DATE DE LA SOUTENANCE : 23 septembre 2011

