

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand Frappier

**IMPACT DU DIABÈTE GESTATIONNEL MELLITUS ET D'UNE EXPOSITION À DE  
FAIBLES NIVEAUX DE POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE SYSTÈME  
DOPAMINERGIQUE PLACENTAIRE HUMAIN**

Par  
Jérémy Desrosiers

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Jacques Bernier, INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Gilles Robichaud, Université de Moncton

Directrice de recherche

Cathy Vaillancourt, INRS-Institut Armand Frappier

## **REMERCIEMENTS**

### **Dre Cathy Vaillancourt**

Merci Cathy pour tous tes précieux conseils et idées et pour m'avoir toujours encouragé dans mes moments d'incertitudes. Merci pour ta patience et ta compréhension, tu es une directrice exemplaire. J'ai beaucoup apprécié faire ma maîtrise sous ta direction, ce fut une expérience très enrichissante tant au plan de vue académique que moral et je n'oublierai jamais tout ce que tu m'as fait découvrir.

### **Dre Julie Lafond**

Merci Julie pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire lors de mon premier été à Montréal et par la suite pour mes études de PCR en temps réel. J'ai beaucoup appris au sein de ton équipe et dans les colloques annuels de BioMed qui m'ont également permis de présenter mes résultats.

### **Dr Rodney Ouellette**

Merci Rodney pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire à Moncton où j'ai fait mes premiers pas dans la recherche. J'ai bien apprécié mon expérience à l'IRMB.

### **Dave Lanoix**

Merci Dave pour m'avoir aidé avec l'immunohistochimie et la culture cellulaire primaire et de lignées. C'était un privilège de travailler à tes côtés et merci pour tes explications toujours claires et ta bonne humeur.

### **Madeleine Arseneault**

Merci Madeleine pour m'avoir appris la culture cellulaire à Moncton. J'ai bien aimé travailler dans la même équipe que toi.

### **Mélanie Viau**

Merci Mélanie pour m'avoir aidé à apprendre à utiliser le PCR en temps réel et la quantification par immunobuvardage de type Western. Merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir supporté tant au labo que chez nous. Ton amour et ta camaraderie joviale m'ont donné courage lorsque j'en ai eu besoin.

### **André-Anne Lacasse**

Merci André-Anne pour l'obtention de certains résultats d'immunobuvardage de type Western. J'ai bien apprécié ton humour et ta joie de vivre.

### **Talal Oufkir**

Merci Talal pour tes conseils. J'ai bien apprécié nos discussions scientifiques et morales.

### **Kathy Deroy**

Merci Kathy pour ta bonne humeur et tes conseils.

### **Jason Roussel et Brigitte Sonier**

Merci Jason et Brigitte pour m'avoir initié aux techniques de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western. Votre support et votre amour de la science m'ont grandement inspiré à persévérer.

## RÉSUMÉ

Nos travaux antérieurs ont démontré que les récepteurs D<sub>2</sub>-dopaminergiques (long et court) sont exprimés et fonctionnels dans le trophoblaste placentaire humain à terme. Par contre, la présence du récepteur D<sub>1</sub>-dopaminergique dans le système placentaire humain demeure controversée. Le premier but de cette étude est de confirmer ou infirmer la présence du récepteur D<sub>1</sub> dans le placenta humain. Des études récentes démontrent que le diabète gestationnel et l'exposition à différents polluants environnementaux altèrent la biodisponibilité de la dopamine et l'expression de ses récepteurs dans divers tissus. Le deuxième but de cette étude est de déterminer si le diabète gestationnel et la contamination maternelle à divers polluants environnementaux persistants affectent également l'expression des récepteurs de la dopamine dans le tissu placentaire.

**Les hypothèses de recherche** sont: (1) le récepteur dopaminergique D<sub>1</sub> est exprimé dans le placenta humain et (2) que les polluants environnementaux et le diabète gestationnel entraînent une altération de l'expression des récepteurs placentaires de la dopamine. Pour vérifier ces postulats, **les objectifs** sont 1) déterminer si le récepteur D<sub>1</sub> est exprimé dans le placenta humain; 2) comparer l'expression des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> dans les placentas de grossesses compliquées par le diabète gestationnel par rapport aux placentas de grossesses normales et 3) comparer l'expression des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> dans les placentas contaminés par de faibles concentrations de plomb, manganèse et pesticides par rapport à des placentas non-contaminés.

**Résultats :** Les analyses d'immunohistochimie démontrent que le récepteur D<sub>1</sub> est exprimé dans le trophoblaste villositaire de placentas humains normaux à terme. Les analyses de PCR en temps réel et d'immunobuvardage de type Western démontrent que l'expression des protéines des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> est augmentée dans le placenta proportionnellement à la contamination de plomb dans le cordon ombilical, alors que l'expression placentaire de l'ARNm du récepteur D<sub>2</sub> est diminuée. L'expression de l'ARNm du récepteur D<sub>1</sub> est également augmentée lorsque de faibles doses de DDE (métabolite du DDT) sont présentes dans le sang fœtal du cordon ombilical. Nos résultats démontrent également une augmentation du récepteur D<sub>1</sub> placentaire dans les grossesses diabétiques par rapport à la grossesse normale mais pas d'effet sur le récepteur D<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent que le diabète gestationnel ainsi qu'une faible exposition maternelle au plomb et au DDT environnemental affectent le système dopaminergique placentaire. Les résultats démontrent aussi l'expression du récepteur D<sub>1</sub> dans le placenta humain

et l'expression de RD2 dans le cytotrophoblaste villositaire pour la première fois. D'autres études sont nécessaires afin d'approfondir notre compréhension du rôle des récepteurs dopaminergiques placentaires et les effets des complications obstétricales et d'une exposition maternelle aux polluants environnementaux sur les fonctions placentaires.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MT : 3-méthoxytyramine

AC : adénylate cyclase

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ADH : hormone antidiurétique

COMT : catéchol-*O*-méthyltransférase

DAT : transporteur de la dopamine

DBH : dopamine- $\beta$ -hydroxylase

DDC: DOPA décarboxylase

DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DGM : diabète gestationnel mellitus

DOPAC : 3,4-dihydroxyphénylacétique

EMT : transporteur extraneuronal des monoamines

EPA : Environmental Protection Agency (États-Unis)

evCTB : cytotrophoblaste extra-villeux

GAD : décarboxylase d'acide glutamique

hCG : hormone chorionique gonadotrophique

hPL : hormone lactogénique placentaire humaine

IP<sub>3</sub> : inositol (1,4,5)-triphosphate

L-DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

MAO : monoamine oxydase

Mn : Manganèse

NET : transporteur de la norépinéphrine

NO : monoxyde d'azote

OCT3 : transporteur de cation organique

OGTT : test de tolérance au glucose oral

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Plomb

PCR : réaction en chaîne de la polymérase de *Thermophilus aquaticus*

PGH : hormone de croissance placentaire  
PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate  
PLC : phospholipase C  
PNMT : phényléthanolamine N-méthyl transférase  
PRL : prolactine  
RCPG : récepteur couplé aux protéines G  
RD<sub>1</sub> : récepteur dopaminergique D<sub>1</sub>  
RD<sub>2</sub> : récepteur dopaminergique D<sub>2</sub>  
RD<sub>3</sub> : récepteur dopaminergique D<sub>3</sub>  
RD<sub>4</sub> : récepteur dopaminergique D<sub>4</sub>  
RD<sub>5</sub> : récepteur dopaminergique D<sub>5</sub>  
SERT : transporteur de la sérotonine  
SNC : système nerveux central  
STB : syncytiotrophoblaste  
T3 : triiodothyronine  
TH : tyrosine hydroxylase  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha  
vCTB : cytotrophoblaste villositaire  
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VMAT : transporteur vésiculaire des monoamines

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
<b>1 – INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – Dopamine.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 – Biosynthèse, métabolisme et transport de la dopamine.....	2
1.1.2 – Rôles de la dopamine.....	4
1.1.3 – Récepteurs dopaminergiques .....	5
1.1.4 – Le récepteur dopaminergique de type D <sub>1</sub> .....	8
<b>1.2 – Le placenta humain .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 – Fonctions physiologiques du placenta humain .....	9
1.2.2 – Structure fonctionnelle du placenta.....	11
1.2.3 – Différenciation trophoblastique .....	12
1.2.4 – La dopamine et la grossesse.....	13
1.2.5 – La dopamine et le placenta .....	13
1.2.6 – Le récepteur dopaminergique D <sub>1</sub> et le placenta .....	15
<b>1.3 – Le diabète.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 – Les différents types de diabète mellitus.....	16
1.3.2 – Le diabète gestationnel mellitus et la dopamine.....	17
1.3.3 – Le diabète gestationnel mellitus et le placenta.....	18
<b>1.4 – Les polluants environnementaux .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 – Les polluants environnementaux et la grossesse .....	20
<b>1.5 - Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>23</b>
<b>2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 – Sujet et Matériel biologique .....</b>	<b>26</b>
2.1.1 – Volet diabète gestationnel.....	26

2.1.2 – Volet polluants .....	26
2.1.3 – Coupe histologique de placenta frais .....	27
<b>2.2 – Cellule placentaire humaine en culture .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 – Isolation et purification du trophoblaste villos .....	28
2.2.2 – Lignées cellulaires de choriocarcinomes humains.....	29
<b>2.3 – Immunofluorescence .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 – Immunohistochimie .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 – Analyse d’immunobuvardage de type western.....</b>	<b>31</b>
2.5.1 – Extraction des protéines totales .....	31
2.5.2 – Électrophorèse .....	32
<b>2.6 – Analyse de réaction en chaîne par polymérase (PCR).....</b>	<b>33</b>
2.6.1 – Extraction de l’ARN total.....	33
2.6.2 – PCR régulier .....	34
2.6.3 – PCR en temps réel .....	34
<b>2.7 – Analyses statistiques.....</b>	<b>35</b>
2.7.1 – Volet diabète gestationnel .....	35
2.7.2 – Volet polluants environnementaux .....	35
<b>3 - RÉSULTATS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 – Expression et localisation du RD1 et RD2 dans le placenta humain .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 – Volet diabète gestationnel .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 – Caractéristique de la population à l’étude.....	42
3.2.2 – Expression du RD <sub>1</sub> et RD <sub>2</sub> placentaire lors de grossesses diabétiques.....	42
<b>3.3 – Volet polluants environnementaux .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 – Caractérisation de la population à l’étude et de sa contamination.....	46
3.3.2 – Distribution des polluants dans le sang maternel, le cordon et le placenta .....	46
3.3.3 – Effets des polluants environnementaux sur les niveaux d’hormones maternelles .....	47
3.3.4 – Expression du RD <sub>1</sub> et RD <sub>2</sub> placentaires lors de grossesses contaminées par des polluants .....	47



<b>4 - DISCUSSION</b> .....	51
<b>5 - CONCLUSION</b> .....	60
<b>6 - PERSPECTIVES</b> .....	62
<b>7 - RÉFÉRENCES</b> .....	65
<b>8 - ANNEXE</b> .....	77

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1. Biosynthèse des catécholamines.....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2. Voies neuronales dopaminergiques.....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 3. Récepteurs et transporteurs dopaminergiques.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 4. Structure du placenta humain.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 5. Villosité chorionique et triple barrière placentaire.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 6. Les deux voies de différenciation du trophoblaste.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 7. Analyse immunohistochimique sur coupe congelée du récepteur de la dopamine de type D<sub>1</sub> dans le placenta humain normal à terme.....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 8. Localisation cellulaire par immunofluorescence du récepteur de la dopamine de type D<sub>1</sub> dans les lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire humain, BeWo et JEG-3.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 9. Expression du récepteur dopaminergique de type D<sub>1</sub> dans le trophoblaste placentaire humain à terme.....</b>	<b>40</b>
<b>Figure 10. Expression du récepteur dopaminergique de type D<sub>2</sub> dans le trophoblaste placentaire humain à terme.....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 11. Expression du récepteur de la dopamine de type D<sub>1</sub> dans des placentas issus de grossesses compliquées par le diabète gestationnel mellitus et normales.....</b>	<b>44</b>
<b>Figure 12. Expression du récepteur de la dopamine de type D<sub>2</sub> dans des placentas issus de grossesses compliquées par le diabète gestationnel mellitus et normales.....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 13. Expression des récepteurs dopaminergiques de types D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> en fonction du 75<sup>ième</sup> centile de la concentration des polluants environnementaux (Pb et DDE) et hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> dans le sang de cordon, le sang de la mère au 3<sup>ième</sup> trimestre et le placenta à terme.....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 14. Expression du récepteur dopaminergique de type D<sub>5</sub> dans le trophoblaste placentaire humain à terme.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 15. Expression des récepteurs dopaminergiques de type D<sub>3</sub> et D<sub>5</sub> dans le placenta humain à terme.....</b>	<b>78</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1. Récepteurs dopaminergiques .....</b>	<b>7</b>
<b>Tableau 2. Séquences des amorces de PCR .....</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 3. Caractéristiques générales des mères, des nouveau-nés et des placentas .....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 4. Caractéristiques générales de la population .....</b>	<b>48</b>
<b>Tableau 5. Niveau des polluants dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse, le sang de cordon et le tissu placentaire .....</b>	<b>48</b>
<b>Tableau 6. Distribution des polluants dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse, le sang de cordon et le placenta.....</b>	<b>49</b>
<b>Tableau 7. Corrélations de l'expression des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 en fonction des polluants environnementaux et des hormones maternelles. ....</b>	<b>49</b>

## **1 - INTRODUCTION**

# 1 - INTRODUCTION

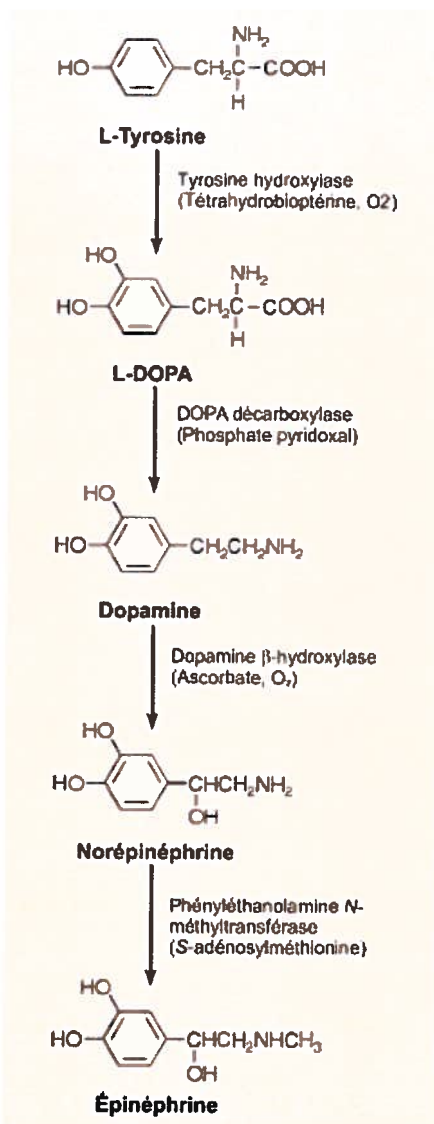
## 1.1 – Dopamine

La dopamine a été découverte en 1952 par Arvid Carlsson et Nils-Åke Hillarp au Laboratoire de Pharmacologie Chimique de l'Institut National du Cœur en Suède. Elle a été nommée ainsi en raison de son précurseur, 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) et de sa structure chimique de monoamine. Carlsson a reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2000 pour avoir démontré que la dopamine n'est pas seulement le précurseur de la norépinéphrine et l'épinéphrine mais qu'elle est aussi un neurotransmetteur en tant que tel [1]. Cependant, la synthèse chimique de la dopamine a été réalisée avant sa découverte endogène, en 1910 par George Barger et James Ewens au Laboratoire Wellcome à Londres, Grande-Bretagne, alors appelée facteur d'inhibition de la prolactine (PIF), hormone d'inhibition de la prolactine (PIH) ou prolactostatine [2].

### 1.1.1 – Biosynthèse, métabolisme et transport de la dopamine

La dopamine est une catécholamine synthétisée *in vivo* à partir de l'acide aminé tyrosine par une séquence de deux réactions chimiques catalysées par les enzymes tyrosine hydroxylase (TH) et DOPA décarboxylase (DDC) [3] (Figure 1). Ensuite, la dopamine peut être transformée en norépinéphrine par la dopamine- $\beta$  hydroxylase (DBH). Une fois relâchée dans le milieu interstitiel, la dopamine se lie à ses récepteurs spécifiques avant d'être captée par le transporteur vésiculaires des monoamines (VMAT) ou le transporteur de la dopamine (DAT) [4]. Elle est alors recyclée ou catabolisée par les enzymes monoamine oxydase (MAO) et catéchol-O méthyltransférase (COMT), qui transforment la dopamine en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) et 3-méthoxytyramine (3-MT), respectivement. Ces deux produits de catabolisme sont ensuite transformés par la COMT et la MAO, respectivement, en acide homovanillique (HVA) [5]. La production de dopamine dans le système nerveux central (SNC) est localisée dans les neurones exprimant l'enzyme TH et l'enzyme DDC, soit les neurones nigrostriatales, mésocorticales et tubérohypophysaires [6]. Cependant, lorsque les neurones contiennent l'enzyme DBH ou phényléthanolamine N-méthyl transférase (PNMT), la dopamine est transformée immédiatement en norépinéphrine et en épinéphrine, respectivement, comme c'est le

cas dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques. La TH est l'enzyme dont la réaction catalytique est considérée comme limitante car l'activité de DDC est beaucoup plus grande, convertissant très rapidement le L-DOPA cytosolique [3]. Divers cas de polymorphisme sont observés chez la TH menant à des pathologies comme des désordres du goitre, une forme de parkinson juvénile, l'ataxie et l'encéphalopathie sévère et précoce. Les effets phénotypiques des polymorphismes de DDC incluent des spasmes musculaires, l'irritabilité, l'obstruction nasale, l'hypotension, les reflux gastriques, l'instabilité thermique, l'hypoglycémie, l'hyperprolactinémie et des désordres de croissance [7].



**Figure 1. Biosynthèse des catécholamines**

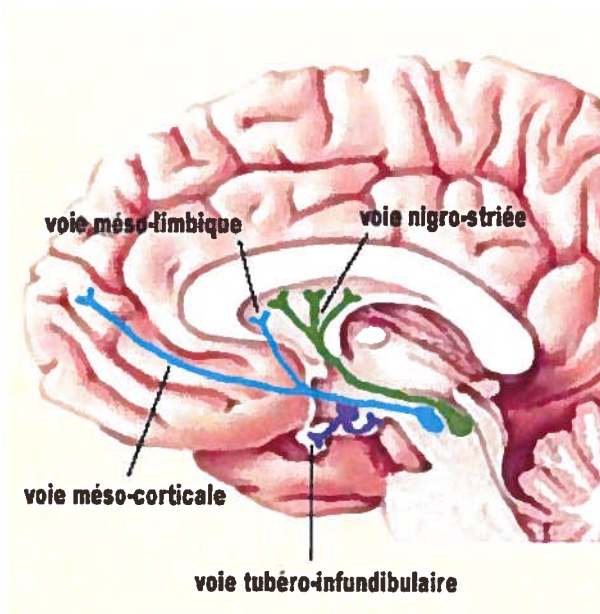
Figure tirée de [5] modifiée par Jérémie Desrosiers

### 1.1.2 – Rôles de la dopamine

Dans le SNC, la dopamine est un important neurotransmetteur impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions vitales. Différents circuits dopaminergiques neuronaux (figure 2) sont responsables d'assumer les fonctions de régulation des mouvements, de l'appétit, de la soif, du désir sexuel, de la motivation, de la douleur et de la cognition. Les circuits de neurones dopaminergiques originaires de la zona compacta dans la substantia nigra innervent le noyau caudé et le putamen du corpus striatum où l'on retrouve 80% de la dopamine dans le cerveau. Ce circuit neuronal assure le contrôle des mouvements volontaires et subit une neurodégénération spécifique des cellules productrices de dopamine dans la maladie de Parkinson [8]. Les neurones mésocorticales et mésolimbiques de l'aire tegmentale ventrale innervent le cortex frontal, le septum, le nucleus accumbens et le bulbe olfactif et un dérèglement de leurs fonctions est à l'origine des psychoses schizophréniques et de la dépression [6]. En effet, la majorité des drogues antipsychotiques ciblent les récepteurs et transporteurs dopaminergiques de cette région du cerveau. De plus, toutes les drogues récréatives capables d'induire une dépendance telles l'éthanol, la cocaïne, l'héroïne, la caféine et les amphétamines affectent une ou plusieurs composantes du système dopaminergique (récepteurs, transporteurs et enzymes métaboliques) [9]. Aussi considérée comme une neurohormone, la dopamine inhibe la sécrétion de prolactine (PRL) chez les cellules lactotrophes de l'hypophyse via l'activation des récepteurs dopaminergiques de type  $D_2$  ( $RD_2$ ) retrouvés au niveau de la membrane plasmique de ces cellules. En effet, comme toute hormone classique, la dopamine se rend à son site d'action en passant librement par la veine-porte hypophysaire, après avoir été sécrétée par les neurones tubérohypophysaires [10]. Il semble que la sécrétion de PRL soit régulée non seulement par la dopamine elle-même mais aussi par l'expression de  $RD_2$  [11].

En dehors du SNC, la dopamine joue le rôle d'une hormone dont les fonctions multiples sont tissu-dépendantes. Ses fonctions périphériques les mieux connues sont la modulation du flux sanguin, de la filtration glomérulaire, de l'excrétion du sodium ( $Na^+$ ) et de l'équilibre ionique cardiaque [12]. Par exemple, la dopamine inhibe l'activité de la pompe ionique  $Na^+/K^+$ -ATPase responsable de la rétention du sodium dans les reins [13]. Entre autres, la dopamine est impliquée dans l'érection chez le rat comme régulateur vasculaire dans le pénis [14]. De plus, la dopamine joue un rôle important dans la pathogenèse de l'hypertension en régulant le transport

épithélial du sodium et par son interaction avec certaines hormones vasoactive telles que l'aldostérone, l'angiotensine, les autres catécholamines, l'endothéline, l'ocytocine, la prolactine, la pro-opiomélanocortine, la rénine, et la vasopressine [15]. Récemment, il a été démontré que la dopamine inhibe la perméabilisation endothéliale des vaisseaux sanguins par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) suite à l'activation du RD<sub>2</sub> [16]. Dans le système nerveux entérique, l'activation des neurones par le SNC stimule l'expression de la TH, la première enzyme de biosynthèse de la dopamine, suggérant un rôle de la dopamine dans la régulation des influx nerveux et du flux sanguin du système gastro-intestinal [17].



**Figure 2. Voies neuronales dopaminergiques**

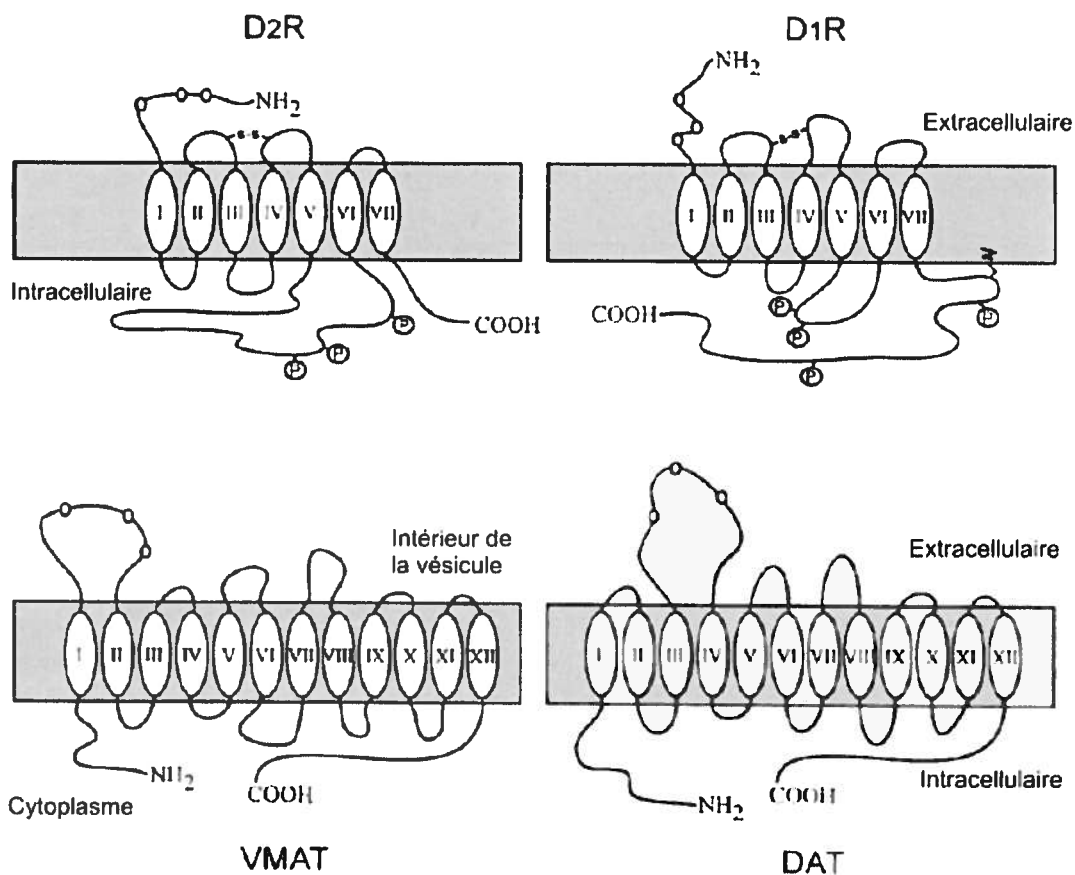
Figure tirée de [18]

### 1.1.3 – Récepteurs dopaminergiques

La dopamine exerce ses fonctions en se liant spécifiquement à ses récepteurs à sept domaines transmembranaires, soit des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La présence de deux différents récepteurs de la dopamine, nommés RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub>, a été publiée en 1977 dans la revue Nature [19]. RD<sub>2</sub> a été le premier récepteur dopaminergique à être cloné chez le rat [20] et chez l'humain [21]. Le clonage des récepteurs RD<sub>1</sub> [22], RD<sub>3</sub> [23], RD<sub>4</sub> [24] et RD<sub>5</sub> [25] a suivi



au début des années 1990. La famille des récepteurs dopaminergiques, se divise en deux sous-familles classées selon l'homologie de leur séquence (tableau 1), leur structure tertiaire (figure 3) et leur pharmacologie (figure 3). Les récepteurs RD<sub>1</sub> et RD<sub>5</sub> font partie de la catégorie D<sub>1</sub>-like alors que RD<sub>2</sub>, RD<sub>3</sub> et RD<sub>4</sub> font partie de la catégorie D<sub>2</sub>-like. Les récepteurs de la catégorie D<sub>1</sub>-like sont couplés à des protéines G qui stimulent l'adénylate cyclase (AC) alors que les protéines G des récepteurs de la catégorie D<sub>2</sub>-like inhibent l'AC suite à l'activation du récepteur par son ligand [3]. Il a récemment été démontré que le RD<sub>3</sub> contrôle la concentration extracellulaire de dopamine via la régulation du DAT [26]. Chez le rat, la concentration relative des récepteurs dopaminergiques au niveau du SNC a été déterminée ainsi : RD<sub>1</sub>>RD<sub>2</sub>>RD<sub>3</sub>>RD<sub>5</sub>>RD<sub>4</sub> [27].



**Figure 3. Récepteurs et transporteurs dopaminergiques**

D<sub>2</sub>R : récepteur dopaminergique de type D2

D<sub>1</sub>R : récepteur dopaminergique de type D1

VMAT : transporteur vésiculaire des monoamines

DAT : transporteur de la dopamine

Tiré de [3] et modifié par Jérémie Desrosiers

**Tableau 1. Récepteurs dopaminergiques**

Récepteurs	D <sub>1</sub> -like		D <sub>2</sub> -like		
	RD <sub>1</sub>	RD <sub>5</sub>	RD <sub>2</sub> (court/long)	RD <sub>3</sub>	RD <sub>4</sub>
Acides aminés	446	477	414/443	400	387
Homologie RD <sub>1</sub>	100%	82%	44%	44%	42%
Homologie RD <sub>2</sub> court	44%	49%	100%	76%	54%

Tiré de [6] et modifié par Jérémie Desrosiers

### 1.1.3.1 – Signalisation cellulaire des récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs dopaminergiques sont couplés à des protéines G trimériques composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  est responsable de conférer la spécificité de la protéine G dans la production de seconds messagers, alors que les sous-unités  $\beta\gamma$  servent surtout à ancrer la protéine G à la membrane plasmique, à réguler l'affinité du récepteur pour son ligand et à moduler la phosphorylation du récepteur par les kinases spécifiques mais elles peuvent aussi activer des seconds messagers [28]. Effectivement, la classe G<sub>s</sub> de sous-unité  $\alpha$  est nommée ainsi car ces protéines G stimulent la production d'AMPc après l'activation du récepteur par son ligand, alors que lorsque le récepteur est couplé à une protéine G<sub>i</sub>, la stimulation du récepteur résulte en l'inhibition de la production d'AMPc. Une autre classe de sous-unités  $\alpha$  des protéines G, G<sub>q/11</sub>, stimule la phospholipase C  $\beta$  [28]. Récemment, il a été démontré que sGi2, une protéine G $\alpha$ i2 ayant subi un épissage alternatif lui conférant une distribution intracellulaire plutôt que membranaire, est capable de réguler la disponibilité des récepteurs RD<sub>2</sub> à la membrane plasmique [29]. En ce qui concerne les récepteurs dopaminergiques, la signalisation cellulaire impliquée suite à la liaison du ligand est traditionnellement associée à l'activation (RD<sub>1</sub> et RD<sub>5</sub>) ou l'inhibition (RD<sub>2,3,4</sub>) de l'AC via les protéines G<sub>s/olf</sub> et G<sub>i/o</sub>, respectivement. Cependant, d'autres cascades signalétiques ont été associées aux récepteurs dopaminergiques, soit les voies des sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G, les protéines G<sub>z</sub> et G<sub>q/11</sub> [30]. De plus, la formation d'un complexe hétéro-oligomère de récepteurs dopaminergiques à la membrane plasmique des neurones, notamment entre RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub>, constitue une unité de signalisation distincte de celle engendrée par des récepteurs RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> seuls ou formant des homo-oligomères, c'est-à-dire des complexes de

récepteurs du même type [31]. Suite à l'activation d'un des deux différents types de récepteurs dans le complexe hétéro-oligomérique, l'internalisation du complexe s'ensuit de façon dose-dépendante. Étonnamment, l'activation d'un récepteur cause la phosphorylation du récepteur adjacent même lorsque d'un différent type. Cependant, seule l'activation simultanée de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> génère un signal calcique [31]. Ce signal calcique est causé par l'activation du complexe hétéro-oligomère couplé à la protéine G<sub>q/11</sub> qui active la phospholipase C (PLC), l'enzyme responsable de cliver le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol (1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>), causant la libération de calcium intracellulaire suite à l'activation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> [32]. La voie de signalisation de G<sub>q/11</sub> peut également être activée par RD<sub>5</sub> et il est possible que le récepteur RD<sub>1</sub> soit directement couplé à la protéine G<sub>q/11</sub> ou dans un complexe hétéro-oligomère avec un autre récepteur dont l'identité n'est pas encore connue [32]. Des résultats obtenus en utilisant l'agoniste de RD<sub>1</sub> SKF83959, capable de stimuler la voie G<sub>q/11</sub>, démontrent une amélioration de la locomotion chez les modèles animaux du Parkinson [33]. De plus, il a été démontré que les RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> sont moins souvent liés ensemble pour former un complexe hétéro-dimérique dans les cerveaux de patients souffrant de la schizophrénie et de la maladie d'Huntington que dans la population générale [34]. Alors que les désordres psychiatriques et troubles de neurodégénérescence associés au système dopaminergique du SNC ont plutôt ciblé les voies classiques d'activation et d'inhibition de l'AC ou le transport de dopamine, l'étude des complexes de récepteurs dopaminergiques et l'activation de la PLC et la libération de calcium permettra de développer des cibles thérapeutiques adaptées aux besoins des patients avec moins d'effets secondaires indésirables [32].

#### **1.1.4 – Le récepteur dopaminergique de type D<sub>1</sub>**

Le gène du RD<sub>1</sub> humain est transcrit en un ARNm de 3373 pb qui est traduit en une protéine de 446 acides aminés avec un poids moléculaire apparent de 75 kDa. Dans le SNC, c'est le récepteur dopaminergique avec la plus grande distribution [6]. Cependant, l'affinité du RD<sub>1</sub> pour la dopamine est environ dix fois moins forte que celle du RD<sub>5</sub> [35]. La localisation du RD<sub>1</sub> dans le cerveau humain se concentre surtout dans le noyau caudé et le putamen, où la densité des récepteurs est la plus grande, alors que la substantia nigra et le cortex cérébral expriment ce

récepteur de façon plus diffuse [36]. Les rôles du récepteur D<sub>1</sub> incluent le contrôle moteur (substantia nigra et striatum) et le traitement de l'information (cortex limbique) [36].

En périphérie, le RD<sub>1</sub> a été localisé dans les vaisseaux coronariens et le myocarde du cœur et dans les vaisseaux sanguins et les tubes proximaux et distaux des reins [37]. Dans la rétine, le RD<sub>1</sub> semble réguler le transport de potassium en modulant l'activité des pompes K<sup>+</sup> ATPase, permettant d'augmenter la sécrétion de sodium et d'eau [38]. Au niveau de la cornée, chez le lapin, le récepteur RD<sub>1</sub> est exprimé dans l'épithélium et l'endothélium vasculaire, suggérant un rôle possible de régulation métabolique de la cornée par le système dopaminergique [39]. L'expression du récepteur a également été confirmée dans les vaisseaux sanguins de la muqueuse de l'estomac où la dopamine a un effet vasoconstricteur [40]. Plus récemment, le récepteur a été localisé sur les muscles lisses des artérioles de la muqueuse stomacale [41]. De plus, l'endothélium microvasculaire du cerveau humain exprime le RD<sub>1</sub> [42]. Au niveau du système immunitaire, la stimulation périphérique simultanée des RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> induit une réponse immunitaire accentuée au niveau de la rate [43]. L'expression de RD<sub>1</sub> a été démontrée dans les vésicules séminales chez l'humain, suggérant un rôle de ce récepteur dopaminergique dans la fonction de l'éjaculation [44].

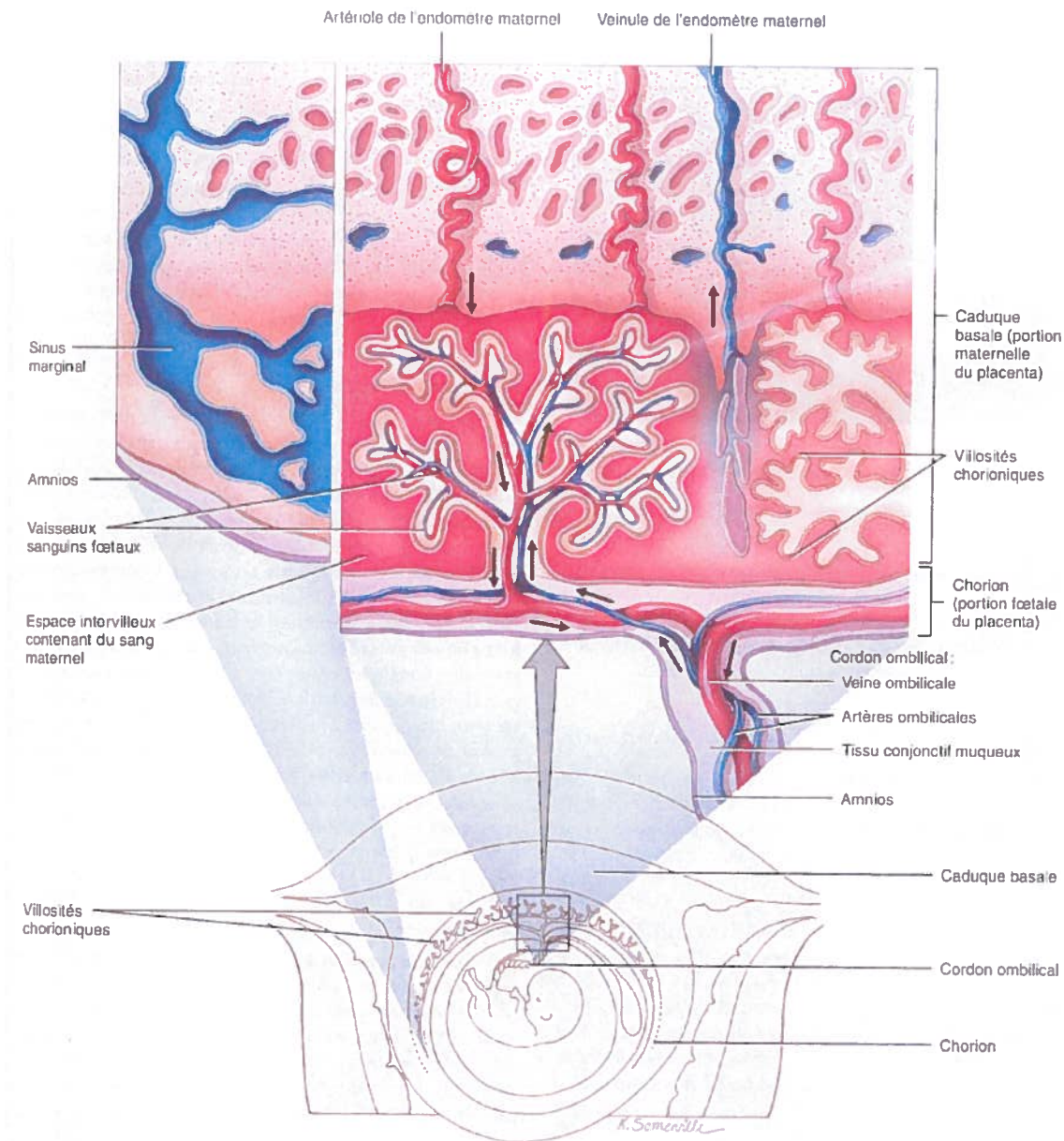
## **1.2 – Le placenta humain**

Le placenta humain (Figure 4) est un organe temporaire composé d'une partie maternelle (caduque) au site d'implantation utérine et d'une partie fœtale (chorion) comprenant les villosités crampons ancrées dans l'endomètre utérin et les villosités flottantes où s'effectuent les échanges entre le système sanguin maternel et fœtal. Chez l'humain, le placenta est de type hémomonochorial, ce qui signifie que les villosités chorioniques sont en contact direct avec le sang maternel [45].

### **1.2.1 – Fonctions physiologiques du placenta humain**

Le placenta humain est responsable d'acheminer les nutriments et l'oxygène vers le fœtus et d'éliminer ses déchets métaboliques vers le système sanguin maternel. Également, le placenta sécrète plusieurs hormones peptidiques et stéroïdiennes participant à l'adaptation de la physiologie maternelle et aussi à la différenciation et à la prolifération des cellules placentaires

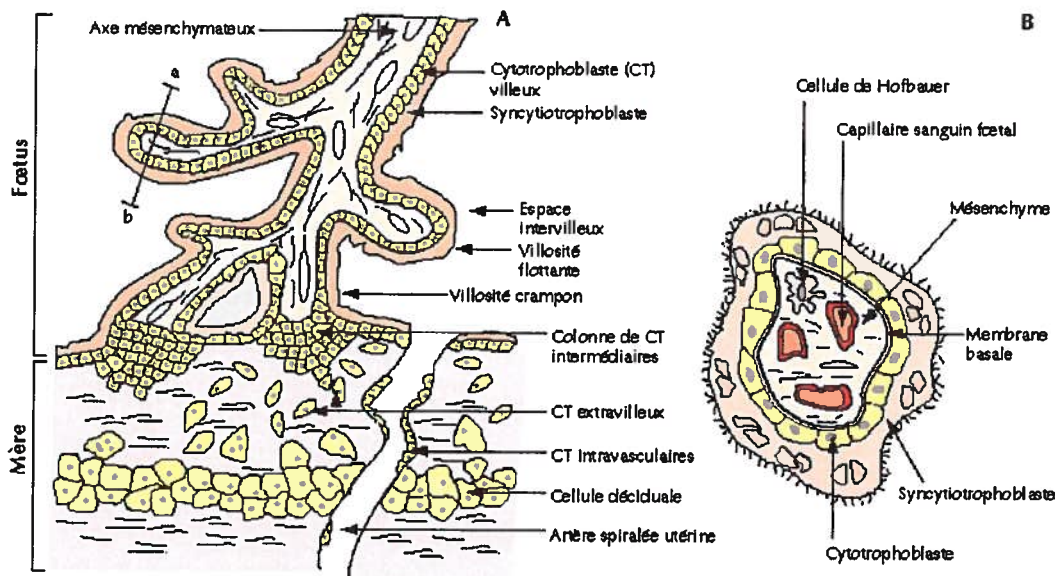
telles que l'hormone lactogénique placentaire (hPL), l'hormone chorionique gonadotrophique (hCG), la progestérone et l'estrogène [46]. La production de ces hormones est nécessaire pour une grossesse normale et une expression anormale de la hPL ou hCG est souvent associé à un mauvais développement placentaire et des complications obstétricales. De plus, le placenta protège le fœtus d'une attaque du système immunitaire maternel en induisant une tolérance immunologique envers les antigènes fœtaux [47].



**Figure 4. Structure du placenta humain.**  
Tiré de [48]

### 1.2.2 – Structure fonctionnelle du placenta

Les fonctions placentaires sont assurées par l'unité fonctionnelle du placenta, la villosité chorionique (figure 5A). Le syncytiotrophoblaste (STB) de la villosité chorionique est responsable d'assurer l'échange des nutriments et métabolites car c'est ce type cellulaire qui est en contact direct avec le sang maternel. En effet, la structure digitiforme des villosités augmente considérablement la surface d'échange entre la circulation maternelle et fœtale pour atteindre 14 m<sup>2</sup> avec un réseau d'irrigation sanguine s'étalant jusqu'à 50 km [45]. Afin d'accroître davantage la surface d'échange entre la circulation maternelle et la circulation foetale, la membrane cellulaire du STB est polarisée avec la surface apicale en bordure en brosse. De plus, les membranes apicales et basales du STB contiennent plusieurs récepteurs et transporteurs responsables de réguler la fonction placentaire endocrine et les échanges nutritionnels assurant la santé du placenta et du fœtus [49]. Également, les hormones peptidiques et stéroïdiennes de la grossesse sont produites par le syncytium trophoblastique. Les hormones peptidiques en question sont, entre autres, la hCG, la hPL et l'hormone de croissance placentaire (PGH) alors que les hormones stéroïdiennes sont la progestérone et l'œstrogène [49]. La barrière placentaire est composée de la couche trophoblastique qui comprend le STB et le cytotrophoblaste villositaire (vCTB), de la couche mésenchymateuse qui comprend le mésenchyme et les cellules de Hofbauer et de la couche endothéliale des vaisseaux sanguins fœtaux (Figure 5B)[45].



**Figure 5. Villosité chorionique et triple barrière placentaire**

Tiré de [45]

### 1.2.3 – Différenciation trophoblastique

Les cellules souches de cytotrophoblaste (CTB) se différencient premièrement en cytotrophoblaste vilieux (vCTB) et extra-vilieux (evCTB), soit les deux voies de différenciation du trophoblaste (figure 6). Les evCTB vont par la suite se différencier directement en cellules géantes ou vont envahir les artères utérines pour effectuer un remodelage de celles-ci, devenant les cellules endovasculaires des artères spiralées et permettant un influx sanguin adéquat aux besoins du placenta et du fœtus. Les cellules du vCTB se fusionnent ensemble, formant un syncytium de trophoblastes *in vivo* et *in vitro*, ce qui facilite l'étude du phénomène de syncytialisation en laboratoire. Le syncytiotrophoblaste STB multinucléé est constamment renouvelé par la fusion cellulaire des cellules mononucléées du vCTB sous-jacents. La différenciation morphologique des vCTB en STB est accompagnée d'une différenciation fonctionnelle, soit l'activation des gènes exclusivement exprimés dans le STB, tels la hCG et la hPL [49]. Le processus de fusion des cytotrophoblaste vCTB n'est pas complètement compris mais l'échange de molécules entre les cellules à travers les jonctions serrées comme la connexine-43 semble jouer un rôle clé dans l'initiation de la syncytialisation [50]. La syncytine, une protéine rétrovirale endogène humaine exprimée dans les vCTB et les evCTB, pourrait contribuer à amorcer le processus de fusion [51] [52].

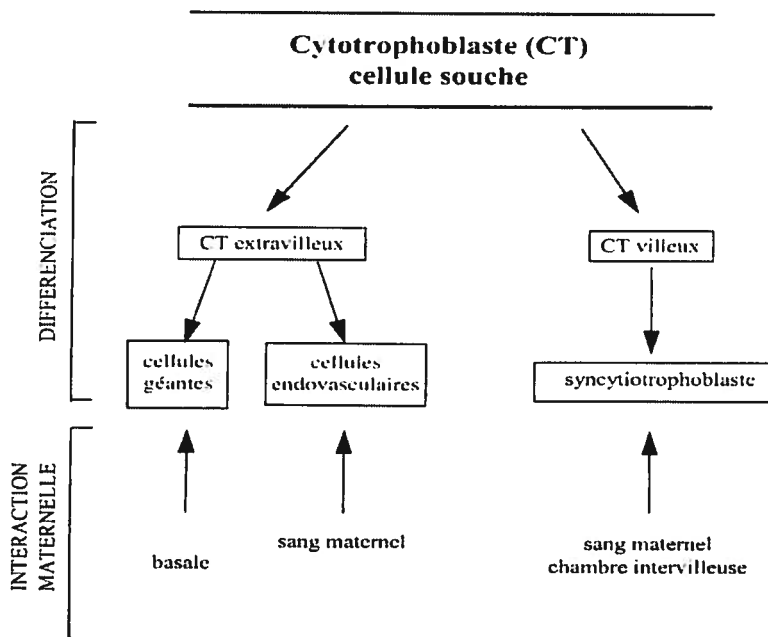


Figure 6. Les deux voies de différenciation du trophoblaste

Tiré de [49]

#### **1.2.4 – La dopamine et la grossesse**

La concentration de dopamine dans le liquide amniotique et les membranes fœtales augmente grandement vers la fin de la grossesse [53]. De plus, les cellules amniotiques épithéliales humaines (HAEC) expriment tous les enzymes de biosynthèse de la dopamine et sont responsables de produire la dopamine dans le liquide amniotique [54]. Or, il est connu que l'accouchement est déclenché par la production de prostaglandines produites par les cellules de l'amnios et des membranes fœtales. Chez l'être humain, il a été démontré que la dopamine stimule la libération de prostaglandines dans la caduque, une membrane fœtale générée par une modification de la muqueuse utérine maternelle au site d'implantation, suggérant un rôle important de la dopamine dans l'initiation de la parturition [55]. Également, les HAEC expriment l'ARNm et les sites de liaisons du RD<sub>1</sub> [56] et l'ARNm et les sites de liaison du RD<sub>2</sub> [57]. Dans une étude récente démontrant la capacité de ces cellules à transformer le L-DOPA en dopamine, la possibilité de greffer ces cellules dans le cerveau de patients atteints du Parkinson pour rétablir la fonction dopaminergique détériorée est proposée, contournant effectivement les considérations morales associées au prélèvement de cellules souches d'origine fœtale [58]. Chez des rats âgés de 2 mois nés par césarienne, le niveau de dopamine est augmenté dans le cortex préfrontal de 50% alors qu'il est diminué de 40% dans le striatum et le nucleus accumbens, suggérant une vulnérabilité du système dopaminergique fœtal lors de l'accouchement [59].

#### **1.2.5 – La dopamine et le placenta**

La dopamine traverse la barrière placentaire entre la circulation maternelle et fœtale [60]. Il a été démontré que le placenta humain exprime le transporteur extraneuronal des monoamines (EMT), une protéine amphiphile trans-membranaire transporteur de cation organique (OCT3) qui transporte sélectivement la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline, l'adrénaline et l'histamine [61]. De plus, l'expression du transporteur de la norépinéphrine (NET) et du transporteur de la sérotonine (SERT) dans le STB humain a été démontrée, ce qui constitue une route d'entrée alternative pour la dopamine dans la circulation fœtale [4] [62]. En effet, le placenta humain n'exprime pas le DAT et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des NET a confirmé que ce transporteur constitue la voie majeure d'entrée de la dopamine dans la circulation fœtale [63]. Également, l'expression des ARNm et de la protéine de l'enzyme de biosynthèse de la dopamine



DDC a été démontrée dans le placenta humain, cependant, cette enzyme est dépourvue d'activité enzymatique pour transformer son substrat en dopamine, tel que déterminé par des études de cinétique enzymatique [64]. L'expression de la TH a été confirmée dans le placenta humain et son expression est augmentée dans les cas de grossesses compliquées par la pré-éclampsie, une maladie caractérisée par un mauvais remodelage des artères spiralées utérines et une protéinurie associée à l'hypertension sanguine maternelle [65]. Cette découverte supporte les évidences d'une augmentation des catécholamines, notamment de la norépinéphrine, dans la circulation sanguine maternelle lors de pré-éclampsie [66].

Certaines études animales ont démontré que RD<sub>2</sub> est détectable dans le liquide amniotique et le placenta de singe [67]. Il a été démontré que les cellules trophoblastiques du placenta humain expriment le RD<sub>2</sub> [68] et que la dopamine inhibe la production de hPL via l'inhibition de l'AC suite à l'activation de ce récepteur [69]. Les résultats d'études subséquentes démontrent que l'expression de RD<sub>2</sub> varie dans le placenta au cours de la grossesse normale et que l'expression est diminuée dans les cas de grossesses pathologiques (pré-éclampsie et môle hydatidiforme) [70]. L'expression de RD<sub>2</sub> dans le placenta humain a été confirmée par une autre étude en 2001 qui suggère que ce récepteur joue un rôle anti-angiogénique [71]. Alors que l'identité exacte des protéines G couplées au RD<sub>2</sub> dans le placenta humain n'est pas connue, deux protéines G sensibles à la toxine de pertussis, probablement G<sub>12</sub> et G<sub>13</sub>, sont couplées au récepteur [72]. Une analogie endocrinienne entre le placenta humain et l'axe hypothalamo-hypophysaire a été renforcée par l'étude des effets de la dopamine sur la libération hypophysaire de PRL et placentaire de hPL [72]. En effet, la dopamine inhibe la sécrétion de hPL en activant RD<sub>2</sub> dans le placenta tout comme l'inhibition de la sécrétion de PRL par la dopamine dans l'hypophyse se fait via RD<sub>2</sub> et dans les deux cas, on observe l'inhibition de l'AC et de l'influx de calcium [69; 73; 72]. L'expression de l'ARNm du RD<sub>4</sub> a également été démontrée dans le placenta humain [74].

Des études animales appuient l'analogie du placenta et de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Chez le placenta de rat, la dopamine inhibe l'expression d'ARNm de Pit-1, un facteur de transcription reconnu pour moduler l'expression des gènes de la PRL et de l'hormone de croissance dans l'hypophyse, et de l'hormone lactogène placentaire – II (PL-II), l'analogue de la hPL chez le rat [75].

### **1.2.6 – Le récepteur dopaminergique D<sub>1</sub> et le placenta**

Dans le placenta de rat, l'ARNm de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> ont été co-localisés avec une expression dans les trophoblastes et les cellules géantes du jour 12 à 16 [76]. De plus, l'équipe de Ferreira-de-Almeida a démontré l'expression de RD1 dans le cordon ombilical humain [77]. Également, l'expression de RD<sub>1</sub> dans la caduque pariétale a été démontrée chez l'être humain en utilisant un agoniste des récepteurs dopaminergiques D<sub>1</sub>-like [78]. Dans le placenta humain, l'utilisation de l'antagoniste SCH23390 spécifique à RD<sub>1</sub> a permis de révéler l'existence des sites de liaisons à la dopamine causant une augmentation de l'AMPc qui n'est pas renversée par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$  et du RD<sub>2</sub> (sulpiride) [79]. Il est connu que la dopamine se lie aux récepteurs adrénergiques  $\alpha_{2A}$  avec une affinité 3 fois moins forte que la norépinéphrine et que la dopamine est capable d'induire des changements dans la concentration intracellulaire de calcium et d'AMPc via ce récepteur [80]. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs adrénergiques permet donc de s'assurer que l'agoniste de la dopamine lie spécifiquement le récepteur dopaminergique. Cependant, l'expression protéique du RD<sub>1</sub> dans le placenta humain n'a jamais été confirmée.

### **1.3 – Le diabète**

Le diabète (signifie en grec 'passer à travers') est une maladie métabolique chronique caractérisée par l'excrétion de grandes quantités d'urine et qui est divisée en deux groupes, soit le diabète insipide (urine sans goût) et le diabète mellitus (urine sucrée). Le diabète insipide est caractérisé par une incapacité des reins à absorber l'eau et résulte d'une absence de production de l'hormone antidiurétique (ADH) par l'hypophyse ou de l'insensibilité des reins à l'ADH. Le diabète mellitus est associé à une insuffisance partielle ou totale du pancréas à produire de l'insuline ou une insensibilité de l'organisme à l'insuline. La condition résultante est l'hyperglycémie et un flux sanguin restreint par l'inhibition de l'expression du vasodilatateur oxyde d'azote (NO) et l'activation de l'expression des hormones vasoconstrictrices angiotensine II et endothéline-1 par l'hyperglycémie, avec augmentation de la perméabilité vasculaire en raison de l'augmentation d'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [81]. Cette augmentation de la perméabilité de l'endothélium conduit à la détérioration

microvasculaire oculaire et rénale et l'athérosclérose macrovasculaire responsables de causer la détérioration visuelle, les maladies rénales, les infarctus du myocarde, les accidents cérébrovasculaires et les amputations des membres caractéristiques du diabète [81].

### **1.3.1 – Les différents types de diabète mellitus**

Depuis 1999, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue trois types de diabète mellitus, soit de type 1, de type 2 et le diabète gestationnel mellitus (DGM). Il est généralement reconnu qu'un taux de glucose sanguin à jeun supérieur à 6,1 mmol/l est une bonne indication que le patient est diabétique.

#### **1.3.1.1 – Le diabète mellitus de type 1**

Le diabète mellitus de type 1 est une maladie auto-immunitaire caractérisée dans 90% des cas par la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas par des anticorps dirigés contre les cellules  $\beta$ , l'insuline ou la décarboxylase d'acide glutamique (GAD), résultant en une dépendance d'insuline exogène pour la survie de l'individu menacée par la kétéoacidose et le coma [82].

#### **1.3.1.2 – Le diabète mellitus de type 2**

Le diabète mellitus de type 2 est la plus commune des formes de diabète (85% des cas) et est caractérisé par un désordre de l'action de l'insuline ou de sa sécrétion, en proportions variables. Les causes de ce désordre métabolique sont inconnues mais l'obésité, la sédentarité et l'âge augmentent le risque de développer un diabète de type 2 [83].

#### **1.3.1.3 – Le diabète gestationnel mellitus (DGM)**

Le DGM est une hyperglycémie reconnue pour la première fois durant la grossesse. Elle affecte jusqu'à 10% des grossesses dans les pays industrialisés. Il est possible que le DGM soit précédé d'une intolérance au glucose ou d'un diabète de type 2 indétectable avant la grossesse mais qui est révélé ou exacerbé durant la grossesse [84]. Le test de tolérance au glucose oral (OGTT) entre la 24<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine de grossesse permet de diagnostiquer le DGM. Dans

le test OGTT à 100g de glucose (selon l'association américaine du diabète), le diagnostic du DGM est positif si au moins deux seuils de glucose sur quatre sont dépassés; les limites de concentration sanguine de glucose sont 5.3 mmol/L à jeûn, 10 mmol/L après 1 heure, 8.6 mmol/L après 2 heures et 7,8 mmol/L après 3 heures [85]. Ces valeurs sont supérieures à la limite normale de 6.1 mmol/L pour le OGTT parce que le diabète induit un état diabétogénique normal permettant au placenta de transporter facilement le glucose maternel vers la circulation sanguine fœtale. Certaines hormones produites par le placenta, telles la hPL, la progestérone, l'œstrogène, le cortisol et la prolactine ont comme fonction normale de stimuler la production d'insuline par le pancréas maternel mais dans les cas de diabète gestationnel ces hormones sont plus fortement produites et bloquent l'action de l'insuline [86]. De plus, des études récentes démontrent que le placenta sécrète davantage de facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), d'interleukine-6 et de leptine lors de cas de DGM, suggérant une implication de ces molécules dans l'exagération de la résistance naturelle à l'insuline durant la grossesse compliquée par le DGM [87]. Chez une femme ayant déjà souffert de DGM, il est intéressant de noter que le taux de récurrence est entre 36% et 70% dépendamment des groupes ethniques étudiés et des tests de diagnostique utilisés [88]. De plus, dans les cas de grossesse compliquées par le DGM, le risque de développer le diabète de type 2 est augmenté chez l'enfant à l'âge adulte et chez la mère. Par ailleurs, il existe une forte association entre l'index de masse corporelle et le risque de développer le DGM, tout comme pour le diabète de type 2 [88].

### **1.3.2 – Le diabète gestationnel mellitus et la dopamine**

Chez le rat, l'hyperglycémie maternelle durant la grossesse et l'allaitement mène à des altérations des systèmes catécholaminergiques (dont la dopamine) dans l'hypothalamus de la progéniture [89]. L'élévation du glucose fœtal lors du DGM semble prédisposer l'enfant à devenir obèse ou diabétique [90]. Cependant, d'autres études suggèrent que c'est plutôt l'insuline qui, en trop grande quantité dans la circulation fœtale durant le DGM, induisent chez l'enfant la macrosomie caractéristique à la naissance et programment le développement de l'obésité et du diabète de type 2 à se manifester après l'enfance [91]. Or, il est connu que les neurones dopaminergiques de l'hypothalamus possèdent des récepteurs à l'insuline et à la leptine à leur membrane plasmique et que leur activation inhibent la sécrétion de dopamine [92]. Cependant, des études animales démontrent que l'hyperinsulinémie en condition

hyperglycémique ou hypoglycémique augmente la concentration de dopamine dans le nucleus accumbens du rat adulte mais cette augmentation de la dopamine est plus rapide dans les cas d'hypoglycémie [93]. Également, l'inhibition de la capture de la dopamine par son transporteur observée après une exposition aux amphétamines semble être régulée par l'insuline, suggérant une altération du transport de la dopamine en conditions hypoinsulinémiques [94]. Des études récentes démontrent que l'élévation de dopamine et de norépinéphrine dans les cellules mésangiales de reins de souris diabétiques est associée à une augmentation de l'expression de la TH et une inhibition de la MAO, suggérant une implication de la dopamine dans l'étiologie du diabète [95]. En effet, des études sur le rat ont démontré une augmentation du niveau de norépinéphrine dans les reins [96]. Ces résultats indiquent que le diabète module le système dopaminergique du SNC et suggèrent que l'environnement fœtal hyperglycémique et hyperinsulinémique caractéristique du DGM puisse programmer le développement de maladies futures chez la progéniture par la modulation du système dopaminergique.

### **1.3.3 – Le diabète gestationnel mellitus et le placenta**

Morphologiquement, le placenta issu du DGM présente plus de nécrose et de lésions vasculaires que les placentas issus d'une grossesse normale [97]. La présence d'espèces d'oxygène réactives (ROS) est directement corrélée au DGM [98]. En effet, les ROS retrouvés dans le placenta lors du DGM diminuent les antioxydants cellulaires comme le glutathion et la superoxyde dismutase et oxydent les lipides membranaires des cellules placentaires [99]. Une étude récente chez le placenta humain démontre que les ROS inhibent l'activité de la polycystine-2 (PC2), un canal cationique susceptible de constituer un mécanisme de transport du calcium de la circulation maternelle à la circulation fœtale [100]. Un autre effet du DGM sur le placenta est l'inhibition de l'expression des récepteurs du VEGF-1, 2 et 3 par rapport aux grossesses normoglycémiques, un effet probablement dû à l'augmentation systémique du ligand VEGF durant l'hyperglycémie [101].

## 1.4 – Les polluants environnementaux

Il existe une panoplie de polluants environnementaux auxquels nous sommes tous exposés en raison de leur constante production industrielle et/ou de leur persistance dans l'environnement. Les polluants organiques persistants (POP) sont tous d'origine industrielle et ont comme caractéristique de s'incorporer dans les tissus adipeux et ainsi s'accumuler dans la chaîne alimentaire. D'autres polluants, comme le plomb (Pb) et le manganèse (Mn) sont naturels mais les activités industrielles humaines amplifient la fréquence et le degré d'exposition à ces substances au point où elles s'accumulent dans les os et autres tissus pour plusieurs années. L'intoxication au Pb, appelée saturnisme, est connue depuis l'antiquité et continue aujourd'hui à affecter les travailleurs miniers. L'intoxication au Mn, appelée manganisme, cause des symptômes semblables à la maladie de Parkinson, c'est-à-dire, des tremblements et une dégénérescence des neurones dopaminergiques, notamment chez les soudeurs. De plus, la combinaison de plusieurs polluants environnementaux peut avoir des effets synergiques et causer une toxicité plus grande que la somme des deux effets toxiques individuels comme c'est le cas pour l'induction de neurotoxicité d'un mélange de Pb et de Mn [102]. Le Pb et le Mn sont retrouvés à plusieurs endroits dans trois lacs du fleuve Saint-Laurent et le port de Montréal [103]. Malgré les nombreuses études démontrant les effets négatifs du DDT sur la faune et la santé humaine et le fait que son utilisation a été interdite dans les pays développés, la production de ce pesticide aux États-Unis persiste pour des fins d'exportation dans les pays affectés par la malaria et le typhus [104]. La distribution mondiale du DDT est ubiquitaire grâce à son utilisation systématiquement effrénée en tant qu'insecticide entre 1939 et 1970 dans l'ensemble des pays développés [105]. Les caractéristiques physico-chimiques du DDT lui confère une grande volatilité, une très longue demie-vie et son caractère liposoluble le rend persistant dans la chaîne alimentaire [105]. Le DDT est donc emporté par le vent lors de l'épandage dans la haute atmosphère d'où il peut atteindre toutes les régions de la Terre en suivant les courants d'air, comme l'atteste la présence de DDT dans les oeufs de pingouins et le tissu adipeux de jeunes phoques de l'antarctique, une région où le DDT n'a jamais été appliqué directement [106]. Une étude récente des POP de sols canadiens en milieu urbain et rural révèle que le DDT est le plus concentré [107]. Également au Canada, les anciens sites d'épandage du DDT, typiquement des

régions agricoles, dégagent de grandes quantités de DDT dans l'air, même après plus de 30 ans que son utilisation soit bannie [108].

#### **1.4.1 – Les polluants environnementaux et la grossesse**

La grande demande en nutriments du fœtus nécessite la mobilisation maternelle des réserves de gras et du calcium osseux, libérant alors soudainement dans la circulation sanguine maternelle et fœtale, les polluants environnementaux accumulés dans ces tissus pendant plusieurs années par la mère. Par conséquent, l'exposition du placenta et du fœtus aux polluants environnementaux pendant la grossesse est souvent sous-estimée dans les modèles toxicologiques. En accord avec la théorie de la programmation fœtale, il est maintenant clair que plusieurs étapes du neurodéveloppement fœtal sont vulnérables à l'action des polluants environnementaux, notamment les pesticides et certains métaux comme le Pb, et que l'exposition à ces polluants pendant des moments critiques de la grossesse peut prédisposer le fœtus à développer des troubles comportementaux qui se manifesteront à l'adolescence ou à l'âge adulte [109]. Alors que les effets toxiques d'exposition aiguë aux polluants environnementaux sur les sujets adultes sont relativement bien connus, les effets d'expositions chroniques à faibles doses de polluants environnementaux et leurs conséquences directes et indirectes sur le développement fœtal, la physiologie de la grossesse et le fonctionnement placentaire demeurent peu étudiés. Aussi est-il important de noter que l'effet synergique de différents polluants environnementaux est très rarement étudié car la variété de polluants auxquels nous sommes exposés à divers degrés est immense et les réponses individuelles aux expositions chroniques varient grandement. Une série d'études menée sur un groupe de mères ayant subi une faible exposition environnementale au Pb a démontré que la concentration de PRL est corrélée négativement au Pb du sang de cordon ombilical [110] et que le Pb dans le sang maternel est corrélé négativement au transport de calcium dans les STB, probablement par un mécanisme de compétition stérique pour le site de liaison du calcium des transporteurs calciques placentaires [111]. De plus, la caduque humaine sécrète une PRL déciduale identique à la PRL hypophysaire [112]. Également, dès la 7<sup>ième</sup> semaine de grossesse, l'hypophyse fœtale produit de la PRL indépendamment de la sécrétion maternelle et cette sécrétion est orchestrée par le système dopaminergique hypophysaire [113]. Il est possible que le Pb diminue la concentration de dopamine, causant une augmentation de la PRL dont la libération n'est plus inhibée par la dopamine tant au niveau placentaire que dans

l'axe hypothalamo-hypophysaire fœtal ou maternel. Le taux sanguin maternel de Mn augmente grandement durant la grossesse en raison de la mobilisation calcique maternelle et est encore plus élevé dans le cordon ombilical (circulation fœtale) que le sang de la mère [114]. Ainsi, même une faible exposition au Pb durant la grossesse influence la production de PRL chez le fœtus, ce qui démontre une sensibilité accrue du système dopaminergique placentaire et fœtal aux polluants environnementaux durant la grossesse [110]. Il existe une forte corrélation entre le DDT maternel sanguin et le DDT retrouvé dans le cordon ombilical du nouveau-né, démontrant le transport du DDT via le placenta [115]. Cependant, le DDT semble s'accumuler préférentiellement dans le lait de la mère quoiqu'une corrélation existe entre le taux de DDT placentaire et le taux de DDT présent dans le lait maternel [116]. Dans le placenta humain, le DDT est environ 20 fois plus concentré que dans le sang maternel alors que le DDE, métabolite du DDT, est environ 100 fois plus concentré dans le placenta humain que dans le sang maternel et il a été démontré que le DDE inhibe le transport du  $\text{Ca}^{++}$  chez les STB [117]. Un article récent utilisant des explants de placenta humain (culture primaire) démontre qu'une courte exposition (24h) au DDT et au DDE stimule la sécrétion de progestérone mais qu'une exposition prolongée (72h) inhibe sa sécrétion, alors que la sécrétion de hCG est inhibée dans les cas d'exposition courte ou prolongée [118]. Puisque le DDT a un effet œstrogénique capable de stimuler la production de progestérone et diminuer en conséquence la hCG, l'auteur suggère l'existence d'un système endocrinien régulant l'expression des stéroïdes et de hCG. Des études précédentes par le même groupe de recherche ont démontré une perturbation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes de la grossesse par l'exposition au DDT et ces métabolites [119]. Or, il a été démontré que l'estrogène régule également l'expression de la PL-II, l'équivalent chez le rat de la hPL [75].

#### **1.4.1.1 – Les polluants environnementaux et la dopamine**

L'exposition au Pb et au Mn compris dans des déchets miniers mène à des altérations du système dopaminergique dans le striatum de rat [120]. Encore chez les rats, les modifications comportementales et l'abaissement des niveaux de dopamine sont plus importantes dans les cas d'exposition simultanée aux deux métaux que la somme des effets des métaux individuellement, il s'agit d'un effet toxique synergique [121]. Chez l'être humain, l'augmentation de PRL dans le



sang, dont la libération est sous le contrôle de la dopamine, est commune dans les cas d'exposition au Pb et au Mn [122]. Chez le rat, le DDT induit une augmentation de la concentration des métabolites de la DA dans le SNC accompagnée de tremblements et de l'hyperexcitabilité des neurones en maintenant ouverts les canaux ioniques Na<sup>+</sup> responsables de propager le potentiel d'action des neurones [123]. Il existe plusieurs études épidémiologiques et animales démontrant un lien entre l'exposition aux pesticides organochlorés comme le DDT et l'augmentation du risque de développer le Parkinson, une maladie neurodégénérative affectant spécifiquement les neurones dopaminergiques du système nigrostriatal [124]. Récemment, il a été démontré que le DDT et ses métabolites, DDE et DDD, altèrent le transport de la dopamine en inhibant le DAT et le VMAT *in vitro* chez le rat quoique aucune altération du système dopaminergique nigrostriatal n'ait été observée *in vivo* pendant la durée de l'étude [124].

## 1.5 - Hypothèses et objectifs

La dopamine est retrouvée dans le placenta humain et ce tissu exprime le RD<sub>2</sub>, spécifiquement dans le trophoblaste [125]. Les études animales révèlent que l'ARNm de RD<sub>1</sub> est exprimé dans le placenta de rat et de singe [76]. Chez l'humain, l'expression de RD<sub>1</sub> a été démontrée dans le cordon ombilical [77] et la caduque [78]. Ces résultats suggèrent fortement l'expression de RD<sub>1</sub> dans le placenta humain. Pourtant, l'expression de RD<sub>1</sub> dans le placenta humain n'a jamais été démontrée et demeure controversée. Il est donc important de clarifier cette dichotomie dans la littérature scientifique.

Hypothèse 1 : Nous proposons que le trophoblaste humain à terme exprime le RD<sub>1</sub>.

Il a été démontré que les niveaux de dopamine dans l'hypothalamus de fœtus de rat sont perturbés en conditions hyperglycémiques, comme dans le cas du DGM [89]. De plus, l'expression des récepteurs de l'insuline et de la leptine sur les neurones dopaminergique, capables d'inhiber la sécrétion de dopamine après leur activation, suggère un rôle régulateur du système dopaminergique sur le transport et le métabolisme du glucose [92]. En raison de la forte incidence du DGM (10%) [87] et de l'altération concomitante des récepteurs dopaminergiques hypothalamiques [89], il est important d'étudier l'expression des récepteurs dopaminergiques placentaires en conditions normales et hyperglycémiques (DGM) afin de mieux comprendre et traiter la condition pathologique du DGM.

Hypothèse 2 : Nous proposons que le DGM entraîne une altération de l'expression placentaire des récepteurs dopaminergiques.

Les études animales révèlent que le niveau de dopamine est diminué dans les cas d'exposition aux polluants environnementaux tels le Pb et le Mn [121]. Chez l'humain, le Pb et le Mn induisent une augmentation de la PRL, régulée négativement par la dopamine [122]. Encore chez l'humain, le DDT réduit le transport de dopamine et prédispose à développer le Parkinson [124]. Puisque les contaminations environnementales au Pb, Mn et aux pesticides tels le DDT sont omniprésentes dans les tissus de pratiquement toutes les populations humaines et

animales de la Terre, il est primordial de comprendre les interactions biochimiques qui expliquent la perturbation de la dopamine interstitielle et des récepteurs dopaminergiques ainsi que les mécanismes de toxicité affectant le système dopaminergique placentaire. Une attention particulière doit être apportée à ce problème en raison de la sensibilité accrue du fœtus aux polluants environnementaux et du phénomène de bioaccumulation de ces polluants environnementaux tout au cours de la vie de la mère et du largage relativement soudain de ces polluants simultanément avec le calcium osseux et les lipides dans la circulation sanguine maternelle durant la grossesse.

Hypothèse 3 : Nous proposons que des polluants environnementaux entraînent une altération de l'expression placentaire des récepteurs dopaminergiques.

Pour vérifier ces hypothèses, les objectifs spécifiques sont :

- 1) Déterminer l'expression de  $RD_1$  dans le tissu placentaire et les cellules primaires du placenta humain obtenus de grossesses normales à terme et les lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire par les techniques d'immunohistochimie, de RT-PCR, d'immunobuvardage de type Western et d'immunofluorescence.
- 2) Évaluer l'effet du DGM sur l'expression des récepteurs dopaminergiques  $RD_1$  et  $RD_2$  dans le placenta par analyse de PCR en temps réel et d'immunobuvardage de type Western.
- 3) Évaluer l'effet d'une faible exposition maternelle aux polluants environnementaux (Pb, Mn, DDT) sur l'expression des récepteurs dopaminergiques placentaires  $RD_1$  et  $RD_2$  par analyse de PCR en temps réel et d'immunobuvardage de type Western.

## **2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 – Sujet et Matériel biologique**

#### **2.1.1 – Volet diabète gestationnel**

Les femmes ont été recrutées avant leur 10<sup>ième</sup> semaine de grossesse à la clinique FIDES ou au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc (Montréal, Qc, Canada). Le protocole a été approuvé par les comités institutionnels pour les sujets humains et les femmes ont fournies leur consentement écrit. Chaque femme a complété un formulaire administré sous forme d'entrevue qui contenait des informations sur l'histoire médicale, les habitudes de consommation (boisson et cigarette), ainsi que les caractéristiques physiques générales avant la grossesse (âge, poids, taille) et durant la grossesse (gain de poids, âge gestationnel). Le poids et la taille du nouveau-né et le poids du placenta ont aussi été notés. Dans cette étude, 10 cas de DGM ont été diagnostiqués (selon les critères de Association Américaine pour le Diabète) et comparés à 10 femmes non-DGM dans le groupe contrôle. Les femmes avec le DGM ont été traitées soit par un ajustement de la diète, soit par un supplément d'insuline ou une combinaison des deux. Les femmes présentant des pathologies (autres que le DGM), les fumeuses et les femmes sous médication (autres que l'insuline) ont été exclues de l'étude. Après l'accouchement, les placentas ont été immergés dans un milieu de culture minimal riche en glucose (DMEM-HG, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) contenant des antibiotiques (5 µg/mL amphotéricine, 50 µg/mL gentamycine et 0,12 mg/mL pénicilline), puis gardés à 4°C et utilisés dans l'heure suivante. Après avoir retiré l'amnio, le chorion et les membranes déciduales, le tissu placentaire à été coupé en section de 5 cm<sup>2</sup> et immédiatement gelé dans l'azote liquide, puis conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

#### **2.1.2 – Volet polluants**

Cette étude menée sur une cohorte de l'étude de Santé Canada 'Effets de la consommation de poisson du fleuve Saint-Laurent sur l'équilibre hormonal et le transfert de calcium durant la grossesse' a été approuvée par les comités éthiques concernés. Le recrutement des femmes enceintes s'est tenu sur une période de deux ans (2000-2002) dans un Centre Local de Services Communautaires (CLSC) de la région de Valleyfield. Les femmes qui acceptaient de participer à

l'étude répondaient à un premier questionnaire par téléphone, sur la base duquel un premier triage était fait. Les critères d'exclusion incluaient une exposition en milieu de travail à des substances toxiques, la prise de médication affectant les niveaux hormonaux, des antécédents de maladies cardiovasculaires ou de désordres neurologiques et le diabète déclaré avant la grossesse. À chaque trimestre de grossesse, les participantes fournissaient un échantillon sanguin et le placenta ainsi que le sang de cordon ont été récupérés à l'accouchement par une infirmière formée. Deux semaines après l'accouchement, un deuxième questionnaire incluant des informations médicales et obstétricales a été administré sous forme d'entrevues. À la lumière de ces informations, les femmes ayant eu le DGM ou une grossesse multiple furent retirées de l'étude.

Le sang maternel au premier trimestre, au deuxième trimestre et à l'accouchement ainsi que le sang de cordon ont été collectés par une infirmière dans des tubes héparinés. Le plasma a été séparé par centrifugation et transféré dans des tubes de verre. Tous les échantillons plasmatiques furent congelés à -20°C jusqu'à l'analyse. Pour le tissu placentaire, les membranes chorionique et amniotique ont été d'abord retirées, puis le placenta a été découpé en morceaux d'environ 5 cm<sup>2</sup>, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C. La détermination des concentrations de différents métaux et pesticides dans le plasma et le tissu placentaire a été effectuée par le Centre de Toxicologie du Québec à l'aide de techniques chromatographiques et spectrométriques appropriées à chaque substance. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau 5. Les niveaux d'hormones (PRL, les hormones thyroïdiennes triiodothyronine [T<sub>3</sub>] et thyroxine [T<sub>4</sub>], hormone thyrotrophine [TSH]) dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse ont été déterminés avec des trousse cliniques de radioimmunoessai par le service de biochimie clinique de l'hôpital St-François d'Assise à Québec.

### **2.1.3 – Coupe histologique de placenta frais**

La préparation du tissu placentaire a été effectuée en retirant les membranes foetales et des coupes de 5 mm<sup>3</sup> ont été préparées à partir de la portion villosité du placenta, en évitant d'endommager la structure. Les coupes ont été recouvertes de Tissue Tek OCT (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), congelées dans l'isopentane et conservées à -80°C.

## 2.2 – Cellule placentaire humaine en culture

### 2.2.1 – Isolation et purification du trophoblaste vilieux

Les placentas humains à terme (37-41 semaines de gestation) ont été obtenus immédiatement après l'accouchement vaginal spontané de grossesses normales en accord avec le comité d'éthique de l'hôpital CHUM-St-Luc. Les villosités placentaires ont été coupées et lavées pour retirer le sang. Les cellules trophoblastiques ont été isolées en utilisant une série de digestion à la trypsine-DNase I type IV suivie d'une séparation sur gradient de Percoll selon la méthode décrite par [126]. Les cellules isolées ont par la suite été immunopurifiées selon la méthode de [127] modifiée par un membre de notre laboratoire [128]. Brièvement, les cellules trophoblastiques vilieuses isolées ont été suspendues dans du sérum bovin foetal (FBS; Gibco, Burlington, ON, Canada) et le pourcentage de viabilité ainsi que le nombre de cellules a été déterminé par l'exclusion au bleu de trypan. En moyenne,  $1,4 \times 10^8$  cellules ont été obtenues à partir de 30 à 35 g de tissu vilieux. Les cellules ont été aliquotées dans des vials cryogéniques dans un milieu de congélation (10% DMSO dans du FBS) à une densité de  $1 \times 10^7$  cellules/mL, placées dans une unité de congélation Mr Frosty (Nalgene-Nunc, Rochester, NY, USA), et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour 4-12 h. Les cellules ont ensuite été transférées dans la phase vapeur d'un congélateur à azote liquide et conservées pour un maximum d'une semaine avant l'immunopurification.

Les cellules cytotrophoblastiques mononucléées ont été purifiées par une méthode immunomagnétique tel que décrit précédemment [128]. Les cellules ont été séparées à l'aide d'un cytomètre magnétique automatisé autoMACS™ (Miltenyi Biotec). Le rendement et la viabilité des cytotrophoblastes vilieux immunopurifiés (déplétés des cellules non-trophoblastiques qui expriment HLA-ABC) a été déterminé par exclusion au bleu de trypan. Le rendement typique après la cryopréervation et l'immunopurification varie de 75% à 85% de la population de départ. La pureté a été évaluée par cytométrie en flux (FACScan; Becton Dickson, NJ, USA) en utilisant l'anticorps monoclonal anti-cytokératine-7-humain conjugué à la fluorescein isothiocyanate (FITC) (Abcam, Cambridge, MA, USA) comme décrit précédemment [128]. Toutes les préparations de cytotrophoblastes vilieux utilisées dans cette étude étaient au moins 98% pures.

Les cytotrophoblastes villeux immunopurifiés ont été inoculés à une densité de  $1,6 \times 10^6$  cellules/puits dans des microplaques 24 puits CellBIND (Corning Life Science, Corning, NY, USA) pour isolation de l'ARN et  $4,5 \times 10^6$  cellules/puits dans des microplaques 6 puits CellBIND 6-wells pour l'isolation des protéines. Les cellules ont été gardées à 37°C dans un atmosphère humide de 5% de 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est constitué de DMEM-HG, 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), 10% FBS et un mélange d'antibiotique de 1X pénicilline-streptomycine-néomycine (PSN) (Sigma-Aldrich). Les cellules trophoblastiques ont été cultivées pour un maximum de quatre jour et le milieu a été changé quotidiennement. Les cellules trophoblastiques au premier jour de culture (24 h) représentent morphologiquement et biochimiquement des cellules cytotrophoblastiques villeuses. Après 72 h de culture, les cellules se différencient par agrégation et fusion pour devenir des syncytiotrophoblastes multinucléés qui produisent les hormones lactogène placentaire humain (hPL) et gonadotrophine chorionique humaine (hCG). Chaque jour, le milieu de culture a été prélevé et centrifugé et le supernageant à été conservé à -20°C jusqu'à la mesure de hPL et hCG par ELISA (DRG International Mountainside, NJ, USA) selon les instructions du manufacturiers.

### **2.2.2 – Lignées cellulaires de choriocarcinomes humains**

Les cellules JEG-3 et BeWo ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). Les cellules JEG-3 cells ont été maintenues dans un milieu minimal essentiel Eagle's (MEM) supplémenté de 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium, 10% FBS et 1X PSN. La lignée cellulaire a été maintenue dans le milieu DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) supplémenté de 2 mM L-glutamine, 10% FBS et 1X PSN. Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasque de culture CellBind T75 (Corning Life Science) à 37°C dans un atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules atteignaient une confluence de 90-95%, un passage était effectué en utilisant la trypsine-EDTA.

## **2.3 – Immunofluorescence**

Les cellules JEG-3 et BeWo ont été mises en culture au jour 1 dans une plaque de 6 puits à une densité de 20 000 cellules. Au jour 2 (24 h plus tard), les cellules sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS Ca/Mg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et séchées. Ensuite, les cellules



ont été fixées pendant 1 heure avec 10% de formaldéhyde (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) et leur membrane plasmique a été perméabilisée sur glace avec 0.2% de détergeant Triton X-100 (Sigma-Aldrich) pendant 2 minutes. Les cellules ont alors été lavées avec le tampon lavage (0,5 % BSA, 0,05 % Tween 20 dans PBS Ca/Mg) avant d'être incubées pendant 30 minutes dans 0,3 % de peroxyde d'hydrogène dilué dans du méthanol, afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les sites non-spécifiques ont été bloqués 10 minutes avec 10 % de FBS dilué dans du PBS. Ensuite, l'anticorps primaire anti-RD<sub>1</sub> (Chemicon) est dilué à 1,2 % dans la solution d'anticorps (1 % BSA, 0,1 % Tween 20 dans PBS Ca/Mg) et incubé avec les cellules perméabilisées pendant la nuit à 4°C. Au jour 3, les cellules ont été lavées 3 fois avec le tampon de lavage pendant 5 minutes et les lamelles ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin d'âne conjugué à Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) (dilué à 0,5 % dans la solution d'anticorps) pendant une heure à 37°C. Les cellules ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes, rincées au PBS Ca/Mg et laissée sécher à l'air sous la hotte. Les noyaux ont été colorés avec 300 nM de DAPI durant 3 minutes. Ensuite, une goutte de tampon d'équilibration (Molecular Probes) est ajoutée sur les lamelles pendant 10 minutes et une goutte de Slow Fade Light (avec glycérol) (Molecular Probes) est déposée sur la lame et la lamelle y est déposée les cellules vers le bas. La lamelle a ensuite été scellée avec du vernis à ongles. L'immunofluorescence a été analysée avec un microscope à épifluorescence Leica DMRE équipé d'une caméra CCD Cooke SenSicam High Performance. Les images ont été observées à 630 X avec objectif à immersion.

## 2.4 – Immunohistochimie

Des cryosections (8 µm d'épaisseur) ont été effectués sur des lames SuperFrost Plus (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada), séchées toutes la nuit, puis fixées avec 4% paraformaldéhyde – 0,2% d'acide picrique tel que décrit par notre laboratoire [128]. Les sections ont été perméabilisées avec une solution de 1% Triton X-100. L'immunomarquage à été effectué en utilisant la trousse Universal DakoCytomation LSAB<sup>®</sup> + et Peroxidase (LSAB+ Kit, HRP) (DakoCytomation, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du fabricant. Les sites de liaison d'antigènes non-spécifiques ont été bloqués avec une solution de blocage (0,5 % sérum d'âne – 0,1 % Tween 20 dans du PBS) pendant 1 h à température de la pièce. Les sections ont été incubées toutes la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire spécifique dilué dans la solution de blocage selon les concentrations suivantes: anti-RD<sub>1</sub> (1:500, Chemicon), anti-CD34 (1:500,

NeoMarkers, Fremont, CA, USA) et anti-hCG (1:500, Millipore, Mississauga, ON, Canada). Les contrôles positifs sont la cytokératine-7, un marqueur spécifique des trophoblastes [129], hCG, un marqueur des syncytiotrophoblastes [130] et le CD-34, un marqueur spécifique de l'endothélium vasculaire des capillaires fœtaux [131]. Le contrôle négatif a été réalisé en omettant d'incuber les coupes de tissu avec les anticorps primaires. Les sections ont été incubées avec la trousse Avidin-biotin M78 (Biomed, Foster City, CA, USA), puis avec l'anticorps secondaire universel Link suivie de la Streptavidine-peroxydase tel que spécifié par le manufacturier. Les sections ont été marquées à l'aide de la solution chromogène de 3-3' diaminobenzidine (DAB) et contre-marquées avec la solution d'hématoxyline selon Mayer's (Sigma-Aldrich). Les sections ont été visualisées et photographiées à l'aide d'un microscope Leitz Diaplan équipé d'un appareil photo numérique Nikon Cool Pix 990 (Nikon Instrument, Melville, NY, USA).

## **2.5 – Analyse d'immunobuvardage de type western**

### **2.5.1 – Extraction des protéines totales**

Les protéines totales ont été extraites du tissu placentaire congelé, des lignées cellulaires et des cellules trophoblastiques en culture primaire. Brièvement, les cellules ont été solubilisées dans un tampon de radioimmunoprécipitation (RIPA) froid (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% Nadeoxycholate, 150 mM NaCl et 1 mM EDTA) contenant des inhibiteurs de protéases et phosphatases (Sigma-Aldrich) et récoltées. Les protéines totales ont été extraites du tissu placentaire congelé en utilisant le réactif T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) supplémenté d'inhibiteur de protéases. Brièvement, le tissu placentaire congelé a d'abord été émincé sur glace sèche, puis vortexé dans un tampon de lyse hypertonique (17 mM Tris-HCl pH 7.3 – 0.144 M NH<sub>4</sub>Cl) et centrifugé pour retirer les cellules sanguines. Le culot a ensuite été homogénéisé dans le T-Per supplémenté de 1 µL de fluorure de phénylméthylsulfonide (PMSF)/mL T-Per et de 2 µL d'un cocktail d'inhibiteur de protéases/mL T-Per (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter-Elvehjem (30 va-et-vient sur glace) avant d'être centrifugé à 10000 x g pour 5 minutes à 4°C. La concentration protéique dans le surnageant a été déterminé par quantification spectrométrique (SpectraMax M5 avec le logiciel SoftMax Pro v5, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) en utilisant le réactif d'acide bicinchoninique (BCA) (Pierce Biotechnology) avec le

BSA (albumine de sérum bovin) comme standard. Les protéines ont ensuite été congelées rapidement dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C.

### 2.5.2 – Électrophorèse

Les protéines totales ont été diluées dans le tampon de Laemmli (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20% glycérol, 4% sodium dodécyl sulfate (SDS) et 0,2 % bleu de bromophénol) et dénaturées 5 minutes à 95°C. Ensuite, les protéines totales (60  $\mu$ g par puit) ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, gel de séparation de 10% et gel de tassement de 4%) suivi d'un transfert sur une membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF) Immobilon-P (Millipore, Mississauga, ON, Canada). Les sites de liaison non spécifique ont été bloqués en incubant les membranes dans le tampon tris-saline-tween (TBS-T) contenant 5% de lait écrémé toute la nuit à 4°C avec agitation. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires, soit l'anti-RD<sub>1</sub> (1:100 toute la nuit à 4°C) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), l'anti-RD<sub>2</sub> (1:100, toute la nuit à 4°C) (Santa Cruz Biotechnology) ou l'anti-glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) (1:500, 20 min, température de la pièce) (Millipore). L'anti-RD<sub>2</sub> reconnaît la forme longue et courte de RD<sub>2</sub>. Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes dans le TBS-T puis rincées 2 fois à l'eau distillée avant l'ajout de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (HRP), soit l'anti-souris ou l'anti-lapin (1:20 000, Millipore) pendant 1h pour RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> et 20 min pour GAPDH. Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois pendant 5 min dans le TBS-T et rincées 2 fois à l'eau distillée avant la détection à l'aide du substrat de chemiluminescence (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) selon les instructions de la compagnie. Les protéines ont été visualisées avec l'appareil FluorChem (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) et les analyses densitométriques ont été effectuées en mesurant l'intensité lumineuse des bandes spécifiques à l'aide du programme AlphaFC (Alpha Innotech). Dans le cas du volet polluants, les membranes ont été strippées 20 minutes à température de la pièce avec la solution Re-Blot plus Mild solution (Millipore), lavées pendant 10 minutes dans du TBS contenant 5% de lait écrémé et rincées 3 fois à l'eau avant d'être incubées avec l'anticorps anti-GAPDH. L'expression protéique est exprimée comme étant le ratio de la densité de la bande spécifique de la protéine d'intérêt par rapport à la densité de la bande spécifique de la protéine de référence, soit GAPDH. Dans le cas du volet diabète gestationnel, les membranes ont été colorées avec une

solution d'AmidoBlack (Sigma). L'expression protéique est exprimée comme étant le ratio de la bande spécifique de la protéine d'intérêt par rapport à l'intensité de la coloration AmidoBlack. Les données ont été normalisées par rapport aux grossesses non-DGM (en % des non-DGM).

## 2.6 – Analyse de réaction en chaîne par polymérase (PCR)

### 2.6.1 – Extraction de l'ARN total

L'ARN total a été extrait des vCTB et des STB en culture primaire (jour 1 et 4 de culture respectivement), des lignées cellulaires de choriocarcinomes JEG-3 et BeWo et tissu placentaire congelé avec la trousse RNeasy mini (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) suivant les instructions du fabricant. L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie à 260 nm (Spectramax, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) et la pureté a été évaluée par le ratio 260/280 nm. La trousse Omniscript RT (Qiagen) a été utilisée pour obtenir l'ADNc à partir de 2 µg d'ARN total suivant les instructions du fabricant. L'ADNc a été conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation. Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques pour RD<sub>1</sub>, RD<sub>2</sub> (forme longue et courte) et la protéine de liaison de la boîte tata (TBP) (gène de référence) dessinées avec Primer Premier 5.0 (Biosoft International, Palo Alto, CA) en se basant sur la séquence humaine d'ADN et synthétisées par Chemicon. Les séquences des amorces sont décrites dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Séquences des amorces de PCR**

Gène (Nomenclature GenBank)	Numéro GenBank	Séquence		Produit (pb)
		5'-sens-3'	5'-antisens-3'	
RD <sub>1</sub> (DRD1)	NM_000794	TGCCGTTATCAGGTTCCG	GAGGGGCTTGTGGGTTT	378
RD <sub>2</sub> (DRD2)	NM_000795	CATCGCTGTCATCGTCTTCG	CTGGGAGGCTGACGATCA	100
TBP (TBP)	NM_003194	CACGAACCACGGCACTGAT	TTGGGTGGGTGAGCAC AAGG	215

### 2.6.2 – PCR régulier

Les PCR ont été réalisés à l'aide d'un thermocycleur T3000 (Biometra, Goettingen, Allemagne) en utilisant la trousse PCR core kit (Qiagen) avec 2 µL d'ADNc ou d'eau pour le contrôle négatif. Les échantillons ont été dénaturés à 94°C pendant 8 minutes, suivi de 40 cycles de 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'appariement à 57°C (RD<sub>1</sub>) ou 62°C (RD<sub>2</sub>) et 1 minute d'élongation à 72°C. Une élongation finale de 7 min à 72°C complétait la réaction. Les amplicons ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % contenant 0,01 µL de bromure d'éthidium par mL de gel et visualisés sous lumière UV à l'aide de l'appareil FluorChem (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

### 2.6.3 – PCR en temps réel

Les PCR en temps réel ont été effectués à l'aide de la trousse LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) avec 1 µL d'ADNc ou d'eau comme contrôle négatif à l'aide de l'appareil LightCycler 480 System (Roche Diagnostics). Les échantillons ont été dénaturés 5 min à 95°C et amplifiés par 50 cycles de i) dénaturation, 5 s à 95°C; ii) appariement, 5 s à 56°C pour RD<sub>1</sub>, 61°C pour RD<sub>2</sub> ou 60°C pour TBP; iii) extension finale, 10 s à 72°C avec l'acquisition des données de fluorescence à cette étape. L'amplification a été suivie d'une courbe de fonte pour évaluer la pureté et la spécificité des produits de PCR. Cette étape consistait à chauffer les échantillons à 95°C pour 5 s, puis diminuer à la température d'appariement pour 30 s avant une acquisition de la fluorescence constante alors que la température augmente lentement pour atteindre 95°C. Le PCR a été conclu par un refroidissement final à 40°C. Les ratios d'expression ont été générés grâce au logiciel de quantification relative du LightCycler 480 (Roche Diagnostics) par la méthode du  $\Delta\Delta CT$  avec correction de l'efficacité de la réaction et normalisation par rapport au gène de référence, en l'occurrence TBP. La spécificité des amorces a été confirmée en vérifiant la longueur des amplicons obtenus par migration sur gel d'agarose contenant 0,001% de bromure d'éthidium et visualisation sous rayons ultraviolets, tel que décrit dans la section 2.6.2.

## **2.7 – Analyses statistiques**

### **2.7.1 – Volet diabète gestationnel**

Les caractéristiques générales de la population ont été analysées par un test de t, tandis qu'un test de Mann-Whitney a été employé pour analyser les différences d'expression placentaire selon la condition DGM ou non-DGM à l'aide du logiciel Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Des valeurs de  $P < 0,05$  ont été considérées significativement différentes.

### **2.7.2 – Volet polluants environnementaux**

Les corrélations de Spearman ont été effectuées par Marie Désy du service de biostatistiques de l'INRS-Institut-Armand-Frappier à l'aide du logiciel SPSS version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les différences d'expression selon le 75<sup>e</sup> centile de la contamination ont été analysées par un test de Mann-Whitney à l'aide du logiciel Prism. Des valeurs de  $P < 0,05$  ont été considérées significativement différentes.

### **3 - RÉSULTATS**

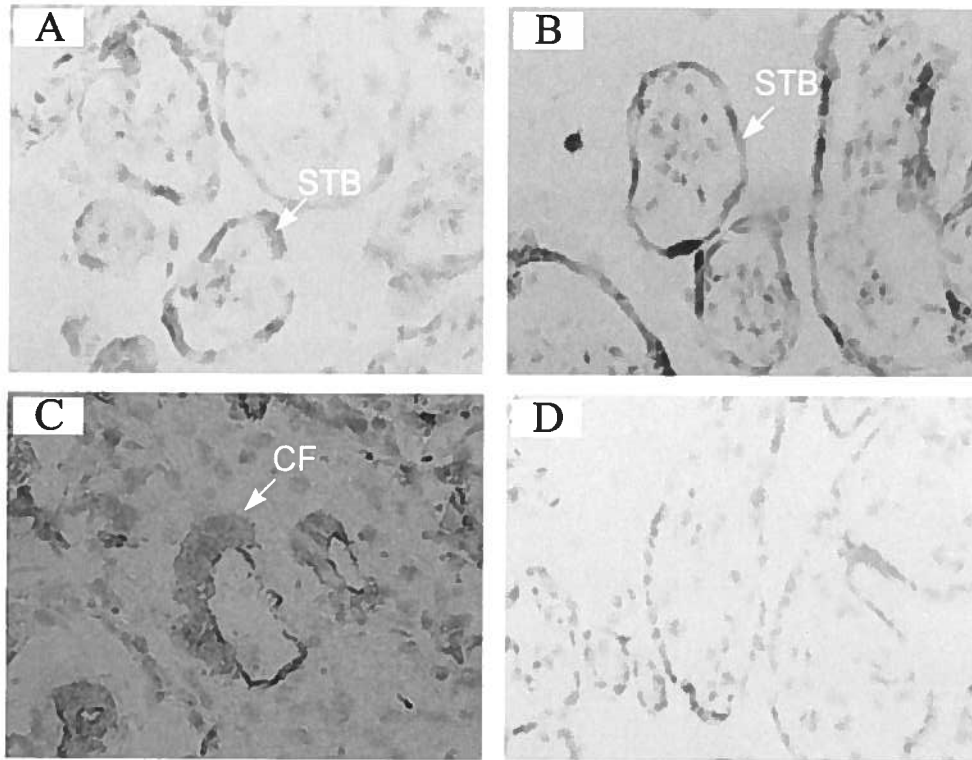
## 3 - RÉSULTATS

### 3.1 – Expression et localisation du RD1 et RD2 dans le placenta humain

Le premier objectif de cette étude était de démontrer l'expression du RD<sub>1</sub> dans le placenta humain à terme. Grâce aux résultats d'immunohistochimie (Figure 7), la localisation tissulaire du RD<sub>1</sub> dans le placenta humain à terme est clairement observée dans le STB et une coloration plus pâle est également observée sous les STB (Figure 7A). Il pourrait s'agir des cellules cytotrophoblastiques villosité (vCTB), des capillaires fœtaux (CF) ou des cellules stromales du mésenchyme. La différenciation morphologique du vCTB en STB est accompagnée d'une différenciation fonctionnelle qui constitue un marqueur spécifique aux STB [130], c'est-à-dire l'expression de hCG que nous avons utilisée comme contrôle positif des STB (Figure 7B). Un marqueur spécifique de l'endothélium des CF, CD34 [129], a été utilisé pour les cibler (Figure 7C). Le contrôle négatif a été obtenu sans l'ajout d'anticorps primaire dans la procédure normale (Figure 7D). La technique d'immunofluorescence nous a permis de déterminer la localisation cellulaire du RD<sub>1</sub> dans les lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire humain, JEG-3 et BeWo, (Figure 8). Les deux lignées cellulaires expriment RD<sub>1</sub> et il semble être localisé principalement à la membrane plasmique.

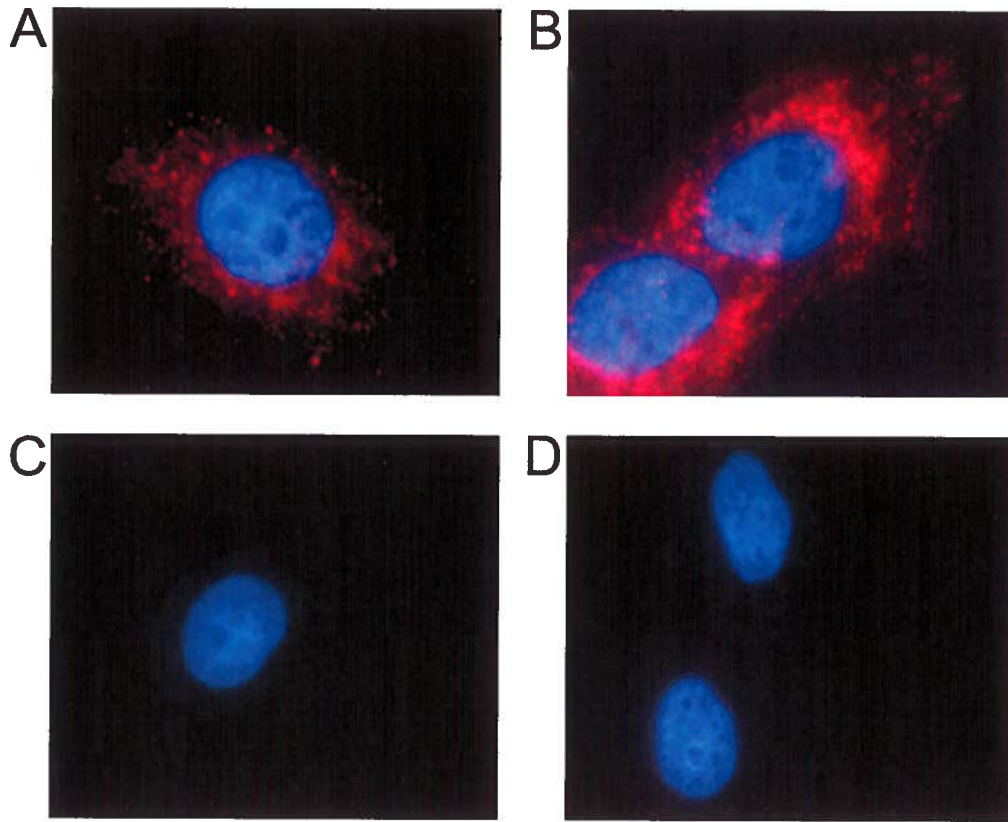
Pour déterminer si RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> sont exprimés dans le vCTB, les techniques de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western ont été utilisées (Figure 9 et 10). L'expression d'ARNm et de protéines du RD<sub>1</sub> a été démontrée dans les échantillons de vCTB, STB, JEG-3, BeWo, placenta normal et cerveau de rat (contrôle positif) (Figure 9). L'expression d'ARNm du RD<sub>2</sub> a été démontrée dans les échantillons de vCTB, STB, JEG-3, BeWo et les échantillons de placenta normal, cerveau de rat et rein de rat servent de contrôle positif (Figure 10A). L'expression de la protéine du RD<sub>2</sub> a été démontrée dans les échantillons de vCTB, STB, JEG-3 et placenta normal (contrôle positif) (Figure 10B). Puisque l'expression du RD<sub>2</sub> dans le placenta humain a déjà été démontrée, il a servi de contrôle positif.



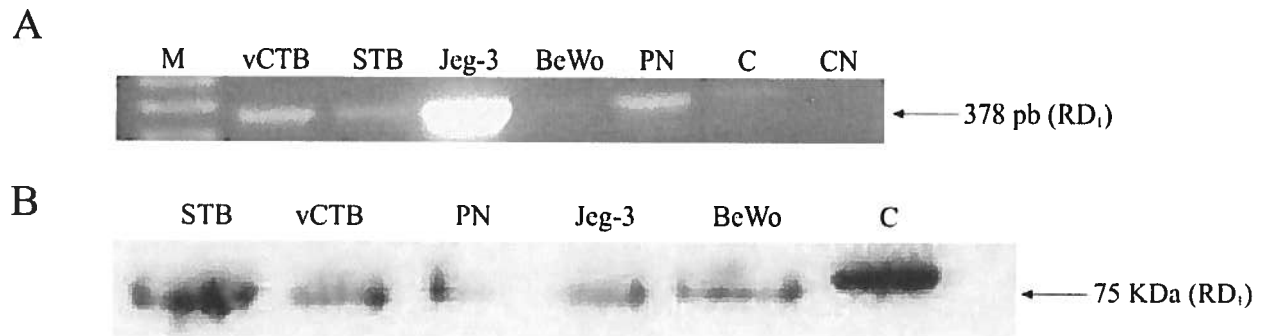


**Figure 7. Analyse immunohistochimique sur coupe congelée du récepteur de la dopamine de type D<sub>1</sub> dans le placenta humain normal à terme.**

A) Marquage immunohistochimique de RD1; B) hCG, marqueur spécifique des cellules syncytiotrophoblastique (STB); C) CD34, marqueur spécifique de l'endothélium des capillaires fœtaux (CF) et D) contrôle négatif (CN) sans anticorps primaire. Le marquage spécifique apparaît en brun et les noyaux cellulaires en bleu (coloré à l'hématoxyline). n = 3; 600X

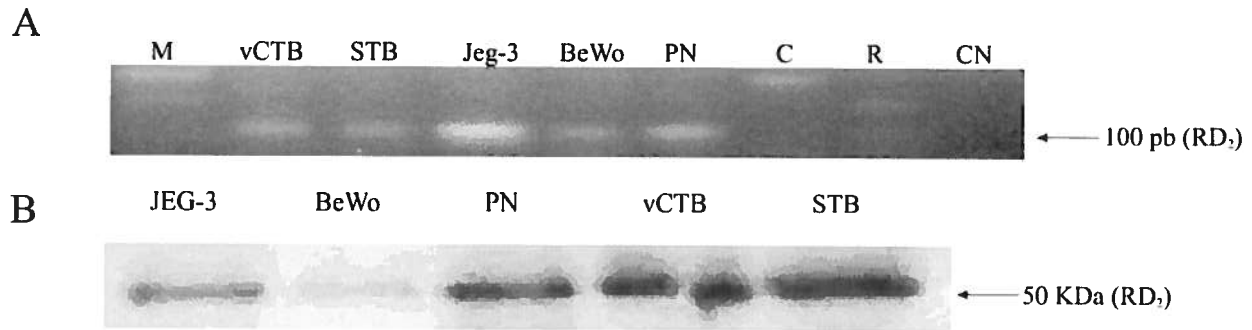


**Figure 8. Localisation cellulaire par immunofluorescence du récepteur de la dopamine de type  $D_1$  dans les lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire humain, BeWo et JEG-3.** Expression de  $RD_1$  (en rouge) dans les cellules BeWo (A) et JEG-3 (B). Contrôles négatifs, sans anticorps primaire pour BeWo (C) et JEG-3 (D). Les noyaux ont été colorés avec le DAPI (en bleu),  $n = 3$ ; 630X



**Figure 9. Expression du récepteur dopaminergique de type D1 dans le trophoblaste placentaire humain à terme.**

Expression de l'ARNm de RD<sub>1</sub> (A) déterminée par RT-PCR et de la protéine de RD<sub>1</sub> (B) déterminée par immunobuvardage de type Western dans le système placentaire humain à terme. Cytotrophoblaste villositaire (vCTB), syncytiotrophoblaste (STB), les lignées de choriocarcinome humain JEG-3 et BeWo, placenta normal (PN), cerveau de rat (C) comme contrôle positif et contrôle négatif (CN); l'échelle du marqueur (M) est de 50 paires de bases.



**Figure 10. Expression du récepteur dopaminergique de type D2 dans le trophoblaste placentaire humain à terme.**

Expression de l'ARNm de RD<sub>2</sub> (A) déterminée par RT-PCR et de la protéine de RD<sub>2</sub> (B) déterminée par immunobuvardage de type Western dans le système placentaire humain à terme. Cytotrophoblaste villositaire (vCTB), syncytiotrophoblaste (STB), les lignées de choriocarcinome humain JEG-3 et BeWo, placenta normal (PN), cerveau (C) et rein (R) de rat comme contrôle positif et contrôle négatif (CN); l'échelle du marqueur (M) est de 50 paires de bases.

## **3.2 – Volet diabète gestationnel**

### **3.2.1 – Caractéristique de la population à l'étude**

Tel que démontré dans le tableau 3, il n'y a pas de différence significative entre les grossesses DGM et non-DGM quant à l'âge maternel, l'âge gestationnel, le gain de poids (GDP) durant la grossesse, la taille et le poids du nouveau-né et le poids du placenta. Toutefois, l'indice de masse corporel (IMC) est significativement plus élevé lors de grossesses DGM comparativement aux grossesses non-DGM ( $P = 0,001$ ). Selon l'IMC, les femmes ayant eu le DGM faisaient de l'embonpoint ou étaient obèses, tandis que le poids des femmes non-DGM était normal.

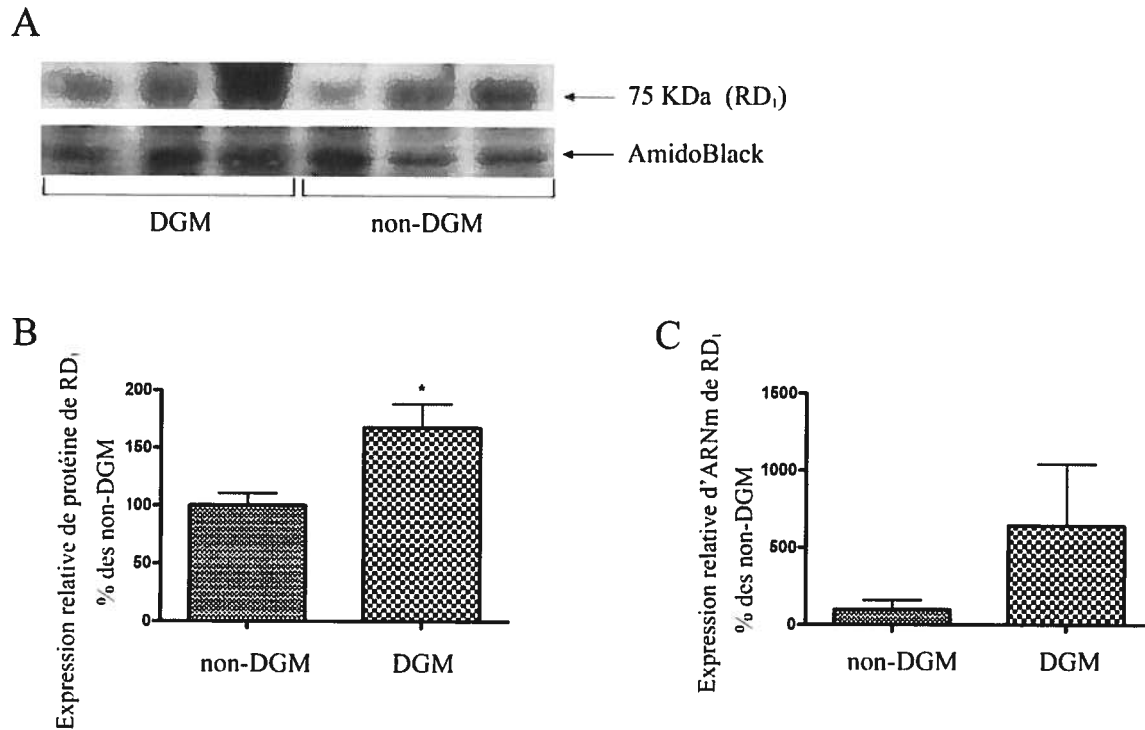
### **3.2.2 – Expression du RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> placentaire lors de grossesses diabétiques**

Les résultats du volet DGM démontrent qu'il y a augmentation de l'expression protéique du récepteur RD<sub>1</sub> placentaire dans les grossesses diabétiques (DGM) par rapport à la grossesse normale (non-GDM) (figure 11B) alors qu'une augmentation d'environ six fois dans l'expression de son ARNm (figure 11C) est également observée quoique cette augmentation ne soit pas statistiquement significative. Il n'y a pas de différence statistiquement significative pour l'expression de RD<sub>2</sub> dans les grossesses diabétiques (GDM) par rapport aux grossesses non-GDM (Figure 12B et 12C).

**Tableau 3. Caractéristiques générales des mères, des nouveau-nés et des placentas**

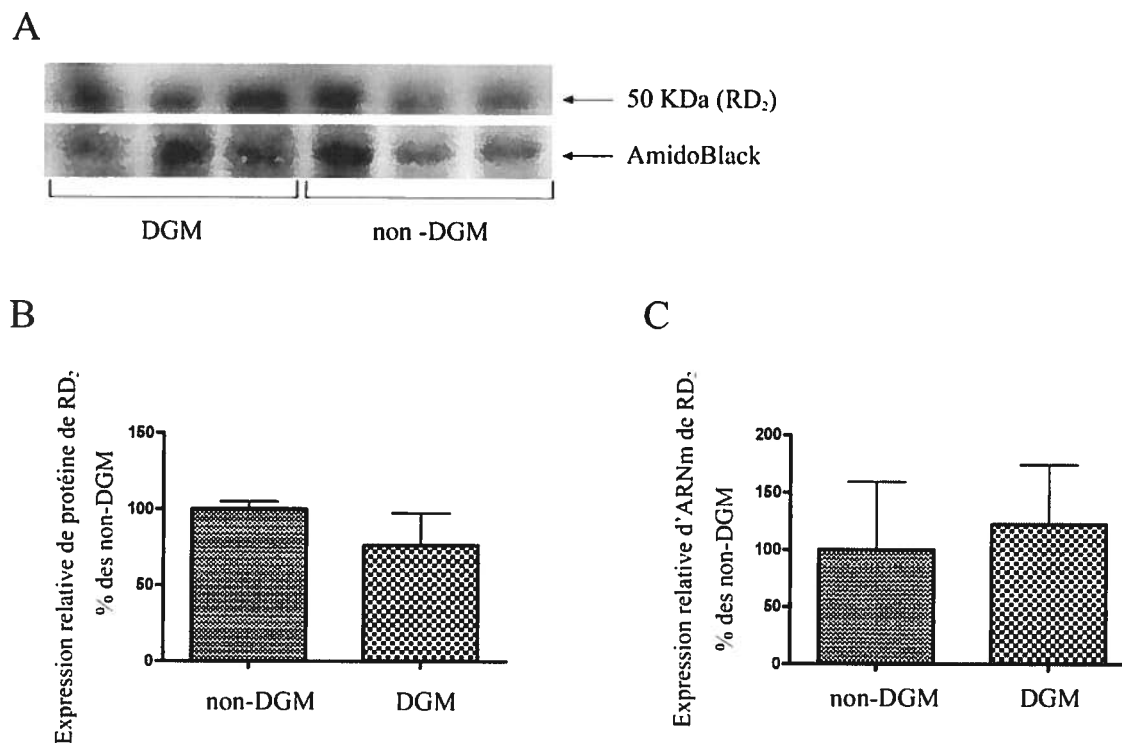
	Non- DGM (n=10)		DGM (n=10)	
<b>Mère</b>				
Âge (années)	30,70	± 3,56	30,20	± 4,10
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21,04	± 2,75	30,06	± 6,48*
GDP (kg)	9,94	± 3,44	11,31	± 5,71
Âge gestationnel (semaines)	37,10	± 1,10	38,80	± 1,03
<b>Nouveau-né</b>				
Sexe (F: M)	6: 4		5: 5	
Taille (cm)	49,85	± 1,45	51,53	± 1,64
Poids (kg)	2,99	± 0,38	3,41	± 0,37
<b>Placenta</b>				
Poids (kg)	0,51	± 0,12	0,59	± 0,16

Diabète gestationnel mellitus (GDM), indice de masse corporel (IMC) avant la grossesse et gain de poids (GDP) durant la grossesse. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart-type. \*  $P = 0.001$  selon un test de t.



**Figure 11. Expression du récepteur de la dopamine de type D<sub>1</sub> dans des placentas issus de grossesses compliquées par le diabète gestationnel mellitus et normales.**

Photo représentative d'un immunoblot obtenu pour le RD<sub>1</sub> dans le placenta de grossesses normales (non-DGM) et compliquées par le DGM. (A) Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine RD<sub>1</sub>, normalisée avec la coloration des protéines totales par AmidoBlack. (B) Analyse de l'expression de l'ARNm de RD<sub>1</sub> par RT-PCR en temps réel, normalisée avec le gène de la protéine de liaison de la boîte Tata (TBP) (C). Pour les protéines n=10 (GDM); n=10 (non-GDM). Pour l'ARNm, n=5 (GDM); n=10 (non-GDM). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart à la moyenne et en pourcentage des non-DGM, qui ont une valeur arbitraire de 100%. \* $P < 0,05$  est significativement différent des non-GDM par le test non-paramétrique Mann-Whitney.



**Figure 12. Expression du récepteur de la dopamine de type D<sub>2</sub> dans des placentas issus de grossesses compliquées par le diabète gestationnel mellitus et normales.**

Photo représentative d'un immunobuvardage obtenu pour le RD<sub>2</sub> dans le placenta de grossesses normales (non-DGM) et compliquées par le DGM. (A) Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine RD<sub>2</sub>, normalisée avec la coloration des protéines totales par AmidoBlack. (B) Analyse de l'expression de l'ARNm de RD<sub>2</sub> par RT-PCR en temps réel, normalisée avec le gène de la protéine de liaison de la boîte Tata (TBP) (C). Pour les protéines, n=10 (GDM); n=10 (non-GDM). Pour l'ARNm, n=5 (GDM); n=10 (non-GDM). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart à la moyenne et en pourcentage des non-DGM, qui ont une valeur arbitraire de 100%. \**P* < 0,05 est significativement différent des non-GDM par le test non-paramétrique Mann-Whitney.



### **3.3 – Volet polluants environnementaux**

#### **3.3.1 – Caractérisation de la population à l'étude et de sa contamination**

Le Tableau 4 indique que les 30 femmes faisant partie de cette étude avaient entre 17 et 35 ans (moyenne 25 ans) et ont accouché après une durée de grossesse normale à terme de 36 à 42 semaines (moyenne 39 semaines). Le poids du placenta est de 380 à 800 g (moyenne 579 g). Le poids et le périmètre crânien des nouveau-nés sont respectivement de 2,12 à 4,12 kg (moyenne 3,30 kg) et de 32 à 37 cm (moyenne 34 cm) et la distribution des filles et des garçons est équivalente. Certaines femmes ont rapporté avoir consommé modérément de l'alcool ou fumé la cigarette durant la grossesse. La majorité des femmes ayant fumé durant la grossesse (78 %) se retrouvent parmi celles présentant des niveaux de Mn placentaire plus élevés que la moyenne (résultat non montré).

Les concentrations des principaux polluants dosés dans les trois compartiments étudiés, soit le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse, le sang de cordon et le placenta, sont présentées dans le tableau 5. En règle générale, les gouvernements canadien et américain recommandent des niveaux acceptables de polluants dans l'eau potable, les produits de consommation et l'air en milieu de travail. Une recommandation pour la concentration sanguine a cependant été émise pour le Pb par l'agence américaine 'Environmental Protection Agency' (EPA). Elle est de 10 µg/L de sang chez l'enfant et de 40 µg/L de sang chez l'adulte. Dans cette étude, les niveaux de polluants dans le sang maternel sont faibles, comme dans d'autres études similaires [110]. Pour le DDT, la concentration dans le sang de cordon ou dans le placenta était trop faible pour être détectée par la méthode de dosage employée.

#### **3.3.2 – Distribution des polluants dans le sang maternel, le cordon et le placenta**

Les concentrations de Pb, Mn et de DDE dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse corrélaient positivement et significativement avec les concentrations de ces mêmes polluants dans le sang de cordon (Tableau 6). Dans le cas du Pb, même si aucune corrélation n'a été observée entre sa concentration dans le sang maternel et celle dans le sang de cordon, des corrélations positives et significatives sont obtenues entre la concentration de ce métal dans le

sang maternel et le placenta, ainsi qu'entre le sang de cordon et le placenta. Une corrélation positive significative est aussi observée entre le sang de cordon et le placenta pour ce qui est de la concentration de DDE.

### **3.3.3 – Effets des polluants environnementaux sur les niveaux d'hormones maternelles**

L'effet des hormones PRL, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> et TSH dans la circulation maternelle au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse sur l'expression de la protéine et de l'ARNm de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> dans le placenta a aussi été évaluée par des corrélations de Spearman. L'expression de l'ARNm de RD<sub>1</sub> est significativement diminuée par T<sub>3</sub> dans le sang maternel au 3<sup>ème</sup> trimestre. Inversement, l'expression de l'ARNm de RD<sub>2</sub> est significativement augmentée par T<sub>3</sub> dans le sang maternel au 3<sup>ème</sup> trimestre.

### **3.3.4 – Expression du RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> placentaires lors de grossesses contaminées par des polluants**

Les résultats de l'objectif 3 démontrent que l'expression des protéines RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> est augmentée dans le placenta proportionnellement à la contamination de Pb dans le cordon ombilical, alors que l'expression placentaire de l'ARNm de RD<sub>2</sub> est diminuée proportionnellement à la contamination de Pb dans le placenta (Tableau 7). De plus, l'expression de l'ARNm de RD<sub>1</sub> est augmentée lorsque de faibles doses de DDE (métabolite du DDT) sont présentes dans le placenta. Pour les autres polluants environnementaux analysés statistiquement, soit le manganèse, l'hexachlorobenzène, les congénères de PCB et l'arochlor, il n'y a eu aucune corrélation observée (résultats non-montrés).

Pour les corrélations statistiquement significatives, nous avons formé deux groupes d'exposition soit inférieur ou supérieur au 75<sup>ème</sup> centile (<75<sup>ème</sup> centile et >75<sup>ème</sup> centile) de la concentration du polluant environnemental dans le sang maternel au 3<sup>ème</sup> trimestre, le sang de cordon et le placenta (Figure 13). Les mêmes tendances sont observées que dans le Tableau 7. Une augmentation significative de l'ARNm de RD<sub>2</sub> lorsque la concentration de l'hormone T<sub>3</sub> est supérieure au 75<sup>ème</sup> centile (Figure 13E).

**Tableau 4. Caractéristiques générales de la population**

Caractéristiques	n	moyenne (min - max)	Proportion
<b>Mères</b>			
Âge (année)	28	25 (17 – 35)	
Alcool durant la grossesse (oui : non)	28		1 : 27
Cigarette durant la grossesse (oui : non)	28		9 : 19
<b>Nouveau-nés</b>			
Âge gestationnel (semaines)	28	39 (36 – 42)	
Poids du placenta (g)	28	579 (380 – 800)	
Poids à la naissance (kg)	28	3,30 (2,12 – 4,12)	
Sexe (F : M)	28		13 : 15
Périmètre crânien (cm)	25	34 (32 – 37)	

**Tableau 5. Niveau des polluants dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse, le sang de cordon et le tissu placentaire**

	Concentration (moyenne ± écart-type)		
	Sang maternel 3 <sup>e</sup> trimestre	Sang de cordon	Placenta
<b>Métaux</b>	(µmol/L)	(µmol/L)	(µg/g)
Pb	0,089 ± 0,036	0,060 ± 0,032	0,005 ± 0,006
Mn	0,319 ± 0,107	0,692 ± 0,296	0,067 ± 0,023
<b>Pesticides</b>	(µg/L)	(µg/L)	(µg/g)
DDE	0,44 ± 0,26	0,16 ± 0,12	35,78 ± 44,71
DDT	0,03 ± 0,02	—	—

Abréviations : Plomb (Pb), Manganèse (Mn), Dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), — : Aucune variation de la concentration

**Tableau 6. Distribution des polluants dans le sang maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse, le sang de cordon et le placenta.**

	3 <sup>e</sup> trimestre vs cordon		3 <sup>e</sup> trimestre vs placenta		Cordon vs placenta	
	R	P	R	P	R	P
Pb	0,177	0,407	0,668**	0,000	0,503**	0,009
Mn	0,532**	0,009	0,075	0,714	0,216	0,299
DDE	0,345	0,091	0,019	0,923	0,492*	0,011

Corrélations de Spearman : \*P<0,05, \*\*P<0,01, n varie de 23 à 27

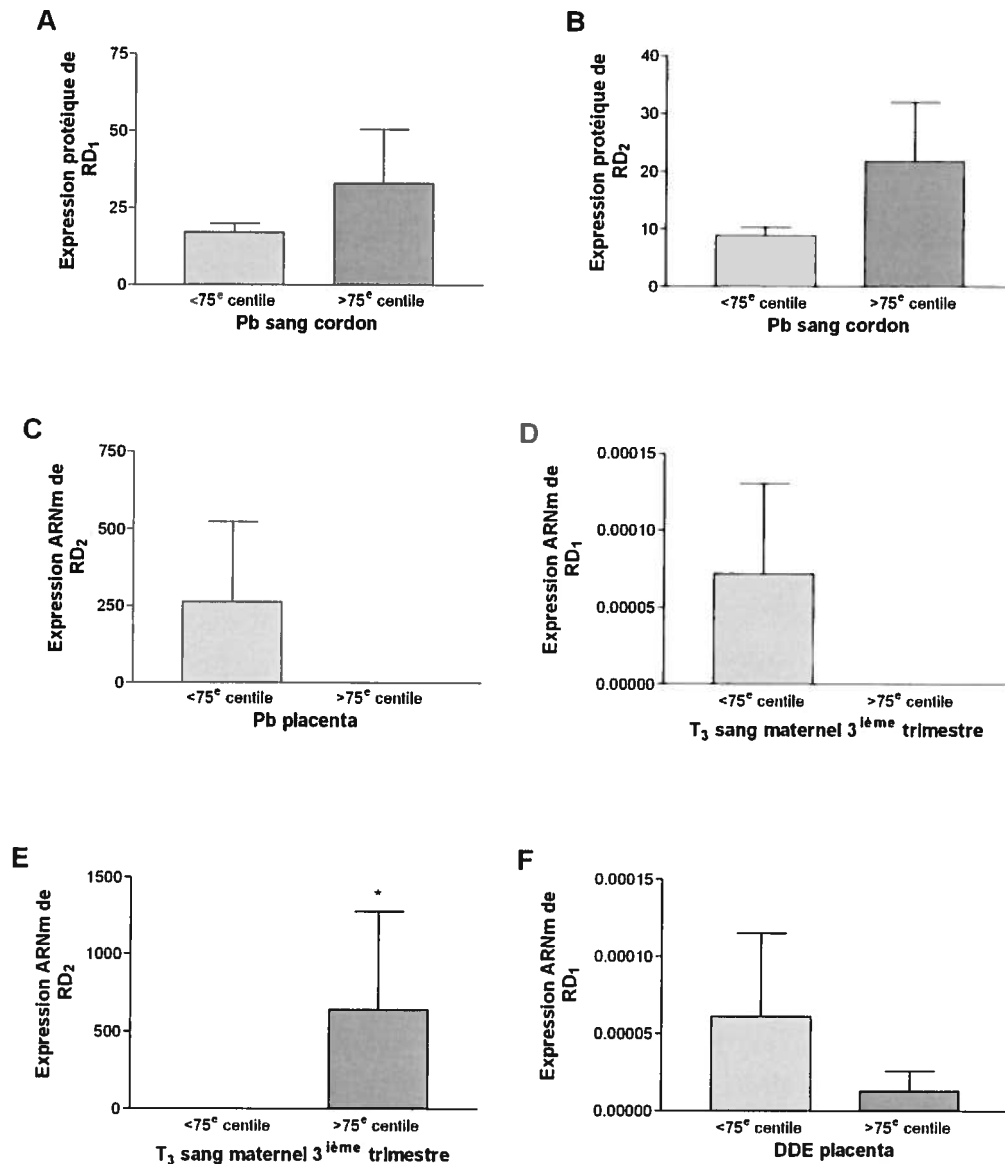
Abréviations : Plomb (Pb), Manganese (Mn), Dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), Coefficient de corrélation (R), Probabilité (P)

**Tableau 7. Corrélations de l'expression des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 en fonction des polluants environnementaux et des hormones maternelles.**

	RD <sub>1</sub>				RD <sub>2</sub>			
	protéine		ARNm		protéine		ARNm	
	R	P	R	P	R	P	R	P
Pb sang cordon	0,547*	0,010	0,051	0,822	0,512*	0,018	-0,192	0,357
Pb placenta	0,157	0,474	-0,029	0,894	0,157	0,457	-0,421*	0,032
Pb sang maternel 3 <sup>ième</sup> trimestre	0,108	0,634	-0,196	0,395	0,091	0,688	-0,349	0,094
Mn sang cordon	0,086	0,712	0,134	0,563	0,238	0,298	0,020	0,928
Mn placenta	0,029	0,894	-0,059	0,788	-0,128	0,561	-0,133	0,553
Mn sang maternel 3 <sup>ième</sup> trimestre	0,202	0,368	-0,281	0,217	0,343	0,118	0,263	0,215
T <sub>3</sub> sang maternel 3 <sup>ième</sup> trimestre	0,380	0,081	-0,450*	0,036	0,380	0,081	0,397*	0,049
DDE placenta	0,299	0,166	0,695**	0,000	0,136	0,538	0,175	0,392

Corrélation de Spearman : P\* < 0.05 ; P\*\* < 0.01 n = 21-26

Plomb (Pb), triiodothyronine (T3), dichlorodiphényldichloroéthane (DDE), coefficient de corrélation (R), probabilité (P)



**Figure 13. Expression des récepteurs dopaminergiques de types D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> en fonction du 75<sup>ième</sup> centile de la concentration des polluants environnementaux (Pb et DDE) et hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> dans le sang de cordon, le sang de la mère au 3<sup>ième</sup> trimestre et le placenta à terme.**

L'expression de protéines a été quantifiée par immunobuvardage de type Western alors que l'expression d'ARNm a été quantifiée par PCR en temps réel. Le 75<sup>e</sup> centile de la concentration de polluants dans le sang de la mère ou le sang de cordon a été utilisé pour distinguer deux groupes d'exposition. Moyenne ± SEM, \*  $P < 0,05$  au test de Mann-Whitney.

## **4 - DISCUSSION**

## 4 – DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude était de démontrer l'expression de RD<sub>1</sub> dans le trophoblaste du placenta humain à terme. Les résultats de la présente étude démontrent clairement que le placenta humain à terme et les lignées cellulaires de choriocarcinomes placentaires expriment le RD<sub>1</sub> tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, mettant fin à la controverse débattant si le RD<sub>1</sub> est exprimé ou non dans ce tissu depuis 1986 [79]. Spécifiquement, RD<sub>1</sub> est exprimé dans les échantillons de vCTB, STB, JEG-3, BeWo et placenta normal. Beaucoup d'études précédentes du RD<sub>1</sub> chez le placenta humain utilisent des agonistes et antagonistes, ce qui a alimenté des soupçons que le RD<sub>1</sub> y était réellement exprimé. Ces soupçons sont apparus, entre autres, lorsqu'il a été démontré que l'activation du récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> induisait une diminution de l'affinité du RD<sub>2</sub> pour la DA, remettant en question l'efficacité et la spécificité des agonistes et antagonistes utilisés [132]. Une étude de Ferré *et coll.* démontre que la DA stimule l'adénylate cyclase et que cet effet est bloqué par l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques de catégorie D<sub>1</sub> (c'est-à-dire, RD<sub>1</sub> et RD<sub>5</sub>), SCH23390 [79] mais l'expression de RD<sub>1</sub> n'est pas encore confirmée. Une autre étude démontre la présence de sites de liaisons pour l'agoniste spécifique du RD<sub>1</sub>, SKF38393, dans le placenta humain à terme [133]. Entre temps, il a été démontré que le récepteur de l'adénosine A<sub>1</sub> atténue la transduction signalétique du RD<sub>1</sub> [134], renforçant les soupçons que l'utilisation des agonistes et antagonistes des récepteurs dopaminergiques peut donner des résultats difficiles à interpréter si plusieurs récepteurs sont activés par le même ligand. Il est maintenant connu que la dopamine se lie aux récepteurs adrénergiques et qu'elle induit une augmentation de l'AMPc et la libération de Ca<sup>++</sup> chez plusieurs espèces de vertébrés (poissons, oiseaux et mammifères) [80]. Dans le placenta humain, la stimulation de la production d'AMPc suite à l'activation des récepteurs β-adrénergiques par les agonistes de la DA a été démontrée [135]. Les agonistes dopaminergiques utilisés dans l'étude des récepteurs dopaminergiques devraient être préalablement testés avec les récepteurs adrénergiques pour assurer leur spécificité. Notamment, la présence du RD<sub>1</sub> dans la caduque pariétale humaine a été démontrée grâce à de telles études de liaisons

avec l'antagoniste SCH23390, l'agoniste SKF38393 et la dopamine [78]. Également, des sites de liaison de RD<sub>1</sub> et/ou RD<sub>5</sub> ont été trouvés dans l'artère ombilicale humaine en utilisant le SCH23390 [77]. L'analyse par hybridation *in situ* a permis de démontrer l'expression de RD<sub>1</sub> dans cellules épithéliales amniotiques humaines, qui sont d'origine fœtale [56]. Plus spécifiquement, mes résultats d'immunohistochimie démontrent que le RD<sub>1</sub> est fortement exprimé dans le vCTB et le STB ainsi que dans les capillaires fœtaux (endothélium) à une plus faible densité. Nos résultats sont en accord avec la littérature scientifique des études animales. En effet, l'expression de l'ARNm de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> a été démontrée en utilisant la technique d'hybridation *in situ* dans les trophoblastes et cellules géantes du placenta de rat [76]. Les résultats de cette étude ont également permis de confirmer l'expression du RD<sub>2</sub> dans le vCTB et le STB de placenta humain à terme. L'expression de RD<sub>2</sub> a déjà été rapportée dans la littérature mais les échantillons de placenta utilisés dans l'étude comprenaient toutes les cellules placentaires, ne permettant pas de distinguer les cellules trophoblastiques (vCTB et le STB) [70]. Le contrôle positif pour RD<sub>1</sub> était le cerveau de rat alors que pour RD<sub>2</sub>, le placenta a servi de contrôle positif, son expression ayant déjà été démontrée dans ce tissu [70].

Les résultats des études d'immunofluorescence réalisées sur les lignées cellulaires trophoblastiques, suggèrent que le RD<sub>1</sub> est localisé au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytosol. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, il est généralement reconnu qu'un RCPG, comme le RD<sub>1</sub>, se localise à la membrane mais sa production doit s'effectuer dans les vésicules du réticulum endoplasmique, alors il est possible d'en retrouver dans les vésicules cytosoliques où il peut être stocké ou recyclé [136]. Cependant, il a récemment été découvert que certains RCPG ne sont pas fixés à la membrane plasmique grâce à un groupement palmitoyl mutable par l'ajout d'un ou plusieurs acides aminés qui rendent la queue N-terminale du RCPG hydrosoluble ou hydrophobe ; il s'agit d'un interrupteur régulant la localisation des RCPG [137]. Il est important de noter que la technique de microscopie à épifluorescence utilisée dans cette étude, contrairement à la microscopie confocale, ne permet pas de discerner la profondeur et donc la localisation intracellulaire exacte.



Il a déjà été démontré que la dopamine inhibe la production d'AMPc via l'activation du RD<sub>2</sub>, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de hCG [138] et de hPL [139] dans le placenta humain à terme. Le rôle du RD<sub>1</sub> placentaire pour sa part n'a jamais été étudié. Il est connu que le RD<sub>1</sub> est couplé à une activation de l'AC et de la production d'AMPc [3]. Ainsi, nous proposons que le RD<sub>1</sub> puisse être impliqué dans l'activation de la sécrétion de la hPL et de la hCG dans le STB du placenta humain. Ceci reste cependant à être étudié. Supportant le rôle de stimulateur de la sécrétion hormonale du RD<sub>1</sub>, il a été démontré que la DA stimule la sécrétion de l'hormone rénine dans le rein via l'activation du RD<sub>1</sub> [140]. L'activation du RD<sub>1</sub> stimule également la sécrétion des catécholamines en activant des canaux calciques de facilitation dans les cellules chromaffines adrénérgiques, formant une boucle de rétroaction positive [141]. Dans le placenta, la DA est transportée de la circulation maternelle mais il n'est pas clair si elle est aussi produite *in situ* par le placenta et produite également par le fœtus. Cependant, si le placenta produit effectivement de la DA, il est fortement possible que RD<sub>1</sub> puisse réguler la sécrétion des catécholamines de la même façon que dans les reins. Lors du développement embryonnaire du SNC, RD<sub>1</sub> est fortement exprimé dans le cortex cérébral où il régule le cycle cellulaire des cellules souches, favorisant la croissance cellulaire [142]. Au niveau du système immunitaire, la dopamine inhibe la prolifération des cellules leucémiques K562 mais induit leur différenciation et l'apoptose [143]. Également, le RD<sub>1</sub> inhibe la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses des parois endothéliales vasculaires induite suite à l'activation du récepteur adrénérgique  $\alpha 1$  [144]. Un autre rôle associé à RD<sub>1</sub> durant la neurogénèse est l'induction de la migration cellulaire des cellules neuronales [145]. Nous émettons l'hypothèse que RD<sub>1</sub> soit également impliqué dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire dans les cellules trophoblastiques et endothéliales du placenta humain.

La présence du RD<sub>1</sub> observée au niveau des capillaires fœtaux suggère que la dopamine puisse réguler le flux sanguin en modulant la vasoconstriction de l'endothélium fœtal. Dans ce sens, l'hypothèse que la dopamine affecte le flux sanguin de l'utérus au placenta a déjà été proposée pour expliquer le rôle de la dopamine présente en grande quantité dans le liquide amniotique [79]. Il existe également plusieurs études

démontrant l'effet vasoactif de la dopamine dans plusieurs espèces et différents tissus. Par exemple, la dopamine est vasoconstrictrice dans le cœur chez le chien [146] et régule la pression sanguine en inhibant le transport de sodium dans les tubules proximaux rénaux et en causant la vasodilatation des muscles lisses des parois endothéliales. Dans les cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire de rat, l'activation des récepteurs dopaminergiques induit la vasodilatation [144]. Dans les cellules endothéliales du cordon ombilical humain, RD<sub>1</sub> a un effet vasodilatateur [147; 148]. En outre, une étude démontre que l'expression du RD<sub>1</sub> est abolie dans l'artère du cordon ombilical dans les grossesses compliquées par la pré-éclampsie, une maladie caractérisée par une augmentation de la pression sanguine et un flux sanguin utéro-placentaire restreint [149]. Les auteurs suggèrent que l'effet vasodilatateur du RD<sub>1</sub> soit perdu dans la pré-éclampsie, ce qui augmenterait la pression sanguine maternelle et la résistance du placenta à une irrigation sanguine adéquate. Dans le placenta, le transport de nutriments constitue une fonction primordiale pour la croissance et la survie du fœtus, alors la régulation du flux sanguin maternel et fœtal doit être optimale. Le rôle de la dopamine dans la régulation du flux sanguin placentaire mérite d'être étudié davantage.

Le deuxième objectif de cette étude consistait à évaluer l'effet du DGM sur l'expression des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> dans le placenta humain à terme. Dans les grossesses compliquées par un DGM, on observe une augmentation statistiquement significative de la protéine du RD<sub>1</sub> placentaire comparativement aux grossesses non-DGM. Une tendance d'augmentation de l'ARNm de RD<sub>1</sub> non statistiquement significative appuie l'augmentation de la protéine. Ces résultats suggèrent une altération du système dopaminergique placentaire qui pourrait entraîner la diminution de la hPL et la progestérone [150] et l'augmentation de hCG observées lors du DGM [151]. Nous avons émis l'hypothèse que le RD<sub>1</sub> stimule la sécrétion de hPL et hCG mais seulement la sécrétion de l'hCG est augmentée durant le DGM, alors que celle de l'hPL est diminuée. Il est alors possible que la hPL soit plutôt sous la régulation positive du RD<sub>2</sub> ou qu'elle soit régulée négativement par RD<sub>1</sub> alors que la hCG serait plutôt régulée positivement par RD<sub>1</sub>. Pour les analyses de PCR en temps réel, autant pour l'étude du DGM que l'étude des polluants environnementaux, le gène de référence choisi est TBP en raison de sa

stabilité et de son expression constante [152]. Pour les analyses d'immunobuvardage de type Western de l'étude du DGM, la coloration des protéines totales AmidoBlack a été utilisée pour normaliser l'expression de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> puisque le signal est proportionnel à la quantité de protéines de chaque échantillon alors que l'expression de certains gènes de référence classiques, notamment GAPDH, fluctuent grandement durant le DGM chez l'embryon de rat [153] et dans le tissu adipeux [154].

Des études animales révèlent que la densité du RD<sub>1</sub> est diminuée dans l'ensemble du cerveau lors du diabète [155]. Chez les rats injectés à l'alloxan et la streptozocine, deux modèles animaux du diabète, la concentration de dopamine est augmentée alors que la densité du RD<sub>1</sub> dans le striatum est diminuée [156]. Si le niveau de dopamine dans le placenta est augmenté dans le cas de DGM, la densité du RD<sub>1</sub> devrait diminuer si les mêmes mécanismes d'autorégulation régissent l'expression de ce récepteur dans le tissu placentaire et neuronal. Puisque nous observons le contraire, il se peut que le niveau de dopamine placentaire soit diminué durant le DGM ou que l'expression de RD<sub>1</sub> soit régulée par un mécanisme similaire au système cardiovasculaire, c'est-à-dire que l'augmentation de dopamine induit davantage l'expression de RD<sub>1</sub> [157]. Une étude comparant les reins de rats normaux aux reins de rats obèses Zucker, un modèle de diabète de type 2 avec hypertension, a révélé que la densité des récepteurs RD<sub>1</sub> ne change pas chez les modèles diabétiques de rat mais que ces récepteurs perdent leur affinité pour un agoniste sélectif, le SCH-23390 [158]. Toutefois, dans les reins de souris, les cellules mésangiales sont exposées à des plus hautes concentrations de dopamine dans les cas de diabète en raison de l'augmentation d'expression des enzymes de biosynthèse dopaminergique et de la baisse d'expression des enzymes cataboliques [95]. Dans le placenta il n'y a pas de consensus à savoir si la dopamine est synthétisée *in situ* comme dans le rein, mais il est généralement accepté que la dopamine entre dans le placenta par la circulation maternelle. Or, il est possible qu'une augmentation de la concentration de dopamine dans le SNC et le système rénal de la mère et du fœtus augmente par conséquent la quantité de dopamine sanguine et placentaire. Une augmentation de la dopamine placentaire pourrait expliquer la hausse d'expression du RD<sub>1</sub> observée dans ces travaux de maîtrise, puisque l'activation de ce récepteur stimule l'expression de RD<sub>1</sub> dans

les artères chez l'humain [157]. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'augmentation de RD<sub>1</sub> dans le placenta humain est que l'augmentation observée de RD<sub>1</sub> lors du DGM résulte du découplage d'une grande proportion des récepteurs aux protéines G et de l'inactivation fonctionnelle de ces récepteurs, stimulant la production de davantage de RD<sub>1</sub> afin de compenser cette perte de fonction. Cette hypothèse est supportée par une étude démontrant que les radicaux libres diminuent la sensibilité du récepteur d'insuline dans le rein de rat obèse par la phosphorylation du RD<sub>1</sub>, causant un découplage des récepteurs aux protéines G et la perte de leurs fonctions [159]. Le rôle du RD<sub>1</sub> et de la dopamine dans l'étiologie du DGM reste à être investigué davantage. Également, il semble y avoir un lien entre le RD<sub>2</sub> et le métabolisme du glucose car l'utilisation de la bromocriptine, un agoniste de RD<sub>2</sub>, permet de diminuer la glycémie chez les personnes atteintes du diabète de type II et permet de diminuer les réserves de gras chez les personnes obèses [160]. Une autre étude chez l'humain démontre que la bromocriptine diminue la résistance à l'insuline, l'insensibilité au glucose et la concentration de lipides sanguins [161]. Il est intéressant de souligner le fait que les circuits neuronaux dopaminergiques de l'hypothalamus soient sous-activés chez des sujets obèses, que l'inhibition de RD<sub>2</sub> par des antagonistes induit le diabète de type II et l'obésité chez des personnes saines et que l'activation de RD<sub>2</sub> par des agonistes améliore la condition métabolique des personnes obèses ou atteintes du diabète de type II [162]. Il est important de noter que la glycémie maternelle a été traitée avec de l'insuline chez les participantes de cette étude atteintes de DGM durant la grossesse, ce qui peut expliquer pourquoi nous n'observons aucune variation de l'expression de l'ARNm et de la protéine de RD<sub>2</sub> durant le DGM.

Le troisième objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'une faible exposition maternelle à des polluants environnementaux sur l'expression des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> dans le placenta humain à terme. Nos résultats démontrent une corrélation positive entre le Pb dans le sang du cordon ombilical et l'expression protéique de RD<sub>1</sub> et RD<sub>2</sub> par rapport aux contrôles et une corrélation négative entre l'expression de l'ARNm de RD<sub>2</sub> et le niveau de Pb dans le placenta. Il est possible que les variations d'expression des récepteurs dopaminergiques placentaires observées chez les sujets exposés au Pb soient

accompagnées de variations de l'expression des hormones placentaires telles la hPL. Des études démontrent que l'expression de la hPL placentaire et la PRL hypophysaire est affectée par l'exposition à des métaux comme le Cadmium (Cd), le Pb et le Mn. Par exemple, le Cd inhibe l'expression des hormones lactogènes placentaire – II et –IV, les hormones équivalentes à la hPL chez le rat [163]. L'exposition au Pb dans le milieu de travail induit une diminution de la dopamine dans l'hypothalamus, causant une augmentation de la concentration de PRL hypophysaire [164] via l'activation du RD<sub>2</sub> [10]. Dans une étude chez l'être humain, l'exposition à de faibles concentrations de Pb chez des femmes enceintes a révélé qu'une corrélation négative existe entre le Pb sanguin maternel et la PRL maternelle [110]. Puisque le RD<sub>2</sub> inhibe la production de hPL par le placenta de manière similaire à son action sur la PRL hypophysaire, il est possible que le Pb affecte aussi la production de hPL. Une étude animale chez des ratons de 12 semaines dont la mère a bu de l'eau contaminée au Pb durant la grossesse démontre que la capacité des neurones du néostriatum à relâcher la dopamine dans le milieu extra-cellulaire est atténuée, ceci étant associé avec une augmentation du stress oxydatif, par rapport à des rejetons dont la mère a bu de l'eau sans Pb [165]. Cette altération du système dopaminergique est-elle due à l'effet direct du Pb sur le SNC fœtal ou résulte-elle d'un dysfonctionnement dans l'expression de la hPL, une hormone clé dans le succès de la grossesse?

Nos résultats révèlent aussi une corrélation négative entre les niveaux maternels de l'hormone thyroïdienne T<sub>3</sub> et l'expression de l'ARNm du RD<sub>1</sub> alors qu'une corrélation positive est observée pour l'ARNm de RD<sub>2</sub>. Ces données sont en accord avec la littérature démontrant une corrélation négative entre le taux de Pb sanguin maternel et le taux de T<sub>3</sub>, même lorsque ces contaminations sont très faibles [166].

L'exposition au Mn induit aussi une diminution de la sécrétion hypophysaire de PRL [122]. Il a été démontré qu'une corrélation existe entre le taux de Mn et le taux de PRL dans le sang de cordon à l'accouchement après une faible exposition maternelle au Mn environnemental [114].

Une forte corrélation positive a été observée entre l'exposition placentaire au DDE et l'expression d'ARNm de RD<sub>1</sub>. Le DDT perturbe la synthèse des hormones stéroïdiennes et cause une diminution de la hCG dans le placenta humain [119]. Les variations d'expression de RD<sub>1</sub> pourraient expliquer les variations d'expression des hormones placentaires dans les cas d'exposition aux polluants environnementaux. Une étude récente a démontré que le DDT inhibe les transporteurs de la DA, DAT et VMAT, dans le SNC [124]. Par contre, dans le placenta, les transporteurs DAT et VMAT ne sont pas exprimés et la dopamine utilise le NET pour passer de la circulation maternelle à la circulation fœtale. Néanmoins, le SNC fœtal exprime DAT et VMAT et il est donc raisonnable d'assumer que le DDT puisse entraver le système dopaminergique fœtal en inhibant ces transporteurs.

Les résultats du deuxième et du troisième objectifs de cette étude ont été obtenus avec un nombre faible de participantes. Alors que les différences d'expression des récepteurs dopaminergiques observées dans cette étude ne se sont pas toutes révélées statistiquement significatives, une tendance a été observée dans plusieurs analyses et des études futures utilisant une plus grande cohorte permettrait de confirmer ou infirmer les tendances observées. Il est important de noter aussi que l'expression de RD1 et RD2 dans le placenta humain est assez faible (jusqu'à 50 cycles de PCR en temps réel) et que plusieurs échantillons ont dû être exclus de l'analyse statistique pour cette raison.

## **5 - CONCLUSION**

## 5 – CONCLUSION

Les résultats du premier objectif de cette étude démontrent que le RD<sub>1</sub> et le RD<sub>2</sub> sont exprimés (ARNm et protéine) dans le placenta humain provenant de grossesse normale à terme et spécifiquement dans le STB et le vCTB. Pour le second objectif de cette étude, les résultats démontrent que l'expression placentaire du RD<sub>1</sub> est augmentée dans le DGM. Les résultats du troisième objectif permettent de démontrer une augmentation de l'expression placentaire du RD<sub>1</sub> du RD<sub>2</sub> lors d'une contamination au Pb dans le cordon ombilical, une diminution de l'expression de l'ARNm de RD<sub>2</sub> lors d'une contamination au Pb dans le placenta et une augmentation du RD<sub>1</sub> lors d'une contamination placentaire au DDE. Ces travaux démontrent pour la première fois que le RD<sub>1</sub> est exprimé dans le trophoblaste placentaire humain à terme et suggèrent un rôle important pour ce récepteur dans la régulation du développement et des fonctions placentaires. Les résultats obtenus durant ce projet de maîtrise suggèrent aussi un rôle important des récepteurs de la dopamine dans le placenta humain, où ils sont présents et modulés par le DGM et certains polluants environnementaux retrouvés dans la circulation maternelle. Ces travaux suggèrent également que le DGM, les métaux et les pesticides, en affectant l'expression du RD<sub>1</sub> et du RD<sub>2</sub>, puissent altérer les fonctions placentaires et entraîner des conséquences indirectes sur le développement du fœtus, tout comme le Pb inhibe le transport de calcium de la circulation maternelle vers la circulation foetale placentaire et le DDT inhibe la sécrétion placentaire de hCG. Il est important de poursuivre ces travaux pour discerner le rôle de la dopamine et particulièrement du RD<sub>1</sub> et du RD<sub>2</sub> dans toutes les cellules placentaires, et ce durant l'ensemble de la grossesse. La poursuite de ces recherches permettrait de mieux cibler les implications de la variation d'expression des récepteurs dopaminergiques dans les cas de DGM et d'exposition aux polluants environnementaux et pourrait aider à clarifier l'étiologie du DGM et préciser quels mécanismes biochimiques sont affectés par les polluants environnementaux auxquels nous sommes exposés.



## **6 - PERSPECTIVES**

## 6 – PERSPECTIVES

Les résultats de ce projet de maîtrise ont permis de démontrer l'expression de RD<sub>1</sub> dans le placenta humain à terme mais l'activité de ce récepteur, les protéines G auxquelles il est couplé et les mécanismes de régulation de l'expression de ce récepteur dans le placenta humain à terme n'ont pas été déterminés. L'utilisation d'agonistes et antagonistes spécifiques à RD<sub>1</sub> ou RD<sub>2</sub> dans des études de liaison permettrait de déterminer l'activité du récepteur (par essai d'AMPc) et les voies de signalisations impliquées après l'activation du récepteur (immunobuvardage de type Western avec des anticorps sensibles à la phosphorylation). Une exposition des cellules trophoblastiques primaires (STB et vCTB) en culture *in vitro* à diverses concentrations de DA et d'agonistes spécifiques de ses récepteurs permettrait de déterminer si la dopamine exerce un contrôle régulateur sur l'expression de ses récepteurs dans le placenta humain à terme.

De plus, l'étude des différents récepteurs dopaminergiques placentaire mérite d'être approfondie. En effet, mes résultats préliminaires indiquent que l'ARNm de RD<sub>3</sub> et RD<sub>5</sub> sont exprimés dans le placenta humain à terme (Figures 14 et 15) et il est connu que RD<sub>4</sub> est également exprimé dans ce tissu [74]. Cependant, la confirmation de l'expression de tous les récepteurs dopaminergiques dans le placenta humain par RT-PCR et immunobuvardage de type Western demeure incomplète. L'analyse par immunohistochimie des autres récepteurs dopaminergiques permettrait de localiser leur expression dans le placenta afin de mieux comprendre leurs fonctions respectives. Également, l'étude de l'expression de tous les récepteurs dopaminergiques placentaires aux différents trimestres de la grossesse, en utilisant les placentas issus d'avortements thérapeutiques permettrait de mieux comprendre le rôle de la dopamine dans l'évolution de la grossesse et la croissance du fœtus. De plus, la caractérisation des voies de signalisation des récepteurs de la dopamine dans le placenta humain permettrait de comprendre le rôle de chaque récepteur et de choisir plus judicieusement le traitement pharmacologique adéquat pour traiter les pathologies liées au dérèglement du système dopaminergique placentaire.

Afin de déterminer si le placenta est un organe producteur de dopamine, l'étude de l'expression des enzymes de biosynthèse de la dopamine dans le placenta humain par RT-PCR, immunobuvardage de type Western et immunohistochimie devra être réalisée, puisque les études précédentes sont contradictoires. Si en effet, ces enzymes de biosynthèse sont exprimés dans certaines cellules du placenta humain (trophoblaste, cellules géantes, cellules immunitaires ou endothélium fœtal), l'analyse de leur activité enzymatique en conditions normales et pathologiques permettra de mieux comprendre le système dopaminergique placentaire. La quantification de la dopamine placentaire par HPLC pourrait aussi s'avérer importante en conditions normales et pathologiques.

Également, des études de liaison des récepteurs de la dopamine seraient utiles pour étudier l'affinité des récepteurs pour leurs ligands lors d'expositions à des polluants environnementaux ou dans des cas de DGM par rapport aux grossesses normales afin de déterminer si l'altération d'expression des récepteurs est associée à une altération de l'affinité. Notamment, ces études devraient être menées sur une plus nombreuse cohorte afin d'augmenter les chances d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour mieux comprendre l'effet individuel des polluants environnementaux sur l'expression des récepteurs dopaminergiques placentaires, l'utilisation des lignées cellulaires immortelles de choriocarcinome placentaire, JEG-3 et BeWo, permettrait d'étudier le phénomène pendant plusieurs semaines, contrairement aux cellules primaires qui meurent spontanément après environ 8 jours de culture. De plus, les cellules JEG-3 et BeWo ne se différencient pas comme les cellules en culture primaire (vCTB au jour 1 et STB au jour 4), permettant de les exposer au Pb, au Mn et au DDE pendant plus longtemps. L'utilisation des cellules trophoblastiques primaires dans les études de toxicité pourrait tout de même être tentée pour comprendre les effets délétères immédiats des polluants environnementaux sur la différenciation et la migration trophoblastique associés à l'altération des récepteurs de la DA. Enfin, il est important de connaître les différents rôles des récepteurs de la dopamine et des effets de l'environnement sur leur expression et leurs fonctions pour diminuer l'incidence des complications obstétricales par le meilleur moyen possible, soit la prévention.

## **7 - RÉFÉRENCES**

## 7 – RÉFÉRENCES

- [1] Benes, F. M. (2001) Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 46-47.
- [2] Fahn, S. (2006) The history of Levodopa as it Pertains to Parkinson's disease, Kyoto.
- [3] Ben-Jonathan, N. and Hnasko, R. (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 22, 724-763.
- [4] Eisenhofer, G. (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther*, 91, 35-62.
- [5] Michael J. Kuhar, P. R. C., and Philip D. Lambert (1999) *Basic Neurochemistry*, Lippincott Williams and Wilkins.
- [6] Marsden, C. A. (2006) Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S136-144.
- [7] Hyland, K. (2007) Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *J Nutr*, 137, 1568S-1572S; discussion 1573S-1575S.
- [8] Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Fisher, S. K., *et al.* (1999) *Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical aspects* 6th edition, American Society for neurochemistry.
- [9] Koob, G. F. (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction*, 101 Suppl 1, 23-30.
- [10] Ugryumov, M. V. (2000) The differentiation of dopaminergic neurons in situ, in vivo, and in transplants. *Neurosci Behav Physiol*, 30, 37-43.
- [11] Zabavnik, J., Wu, W. X., Eidne, K. A., *et al.* (1993) Dopamine D2 receptor mRNA in the pituitary during the oestrous cycle, pregnancy and lactation in the rat. *Molecular and cellular endocrinology*, 95, 121-128.
- [12] Crocker, A. (1994) Dopamine - Mechanisms of action. *Australian Prescriber*, 17, 17-21.
- [13] Efendiev, R., Das-Panja, K., Cinelli, A. R., *et al.* (2007) Localization of intracellular compartments that exchange Na,K-ATPase molecules with the plasma membrane in a hormone-dependent manner. *Br J Pharmacol*, 151, 1006-1013.
- [14] Brioni, J. D., Moreland, R. B., Cowart, M., *et al.* (2004) Activation of dopamine D4 receptors by ABT-724 induces penile erection in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6758-6763.
- [15] Zeng, C., Armando, I., Luo, Y., *et al.* (2008) Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H551-569.
- [16] Bhattacharya, R., Sinha, S., Yang, S. P., *et al.* (2008) The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium. *J Mol Signal*, 3, 14.

- [17] Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., *et al.* (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol*, 586, 1963-1975.
- [18] Dubuc, B. (2002) *Le cerveau à tout les niveaux*.
- [19] Kebabian, J. W. and Calne, D. B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-96.
- [20] Bunzow, J. R., Van Tol, H. H., Grandy, D. K., *et al.* (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336, 783-787.
- [21] Grandy, D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., *et al.* (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9762-9766.
- [22] Zhou, Q. Y., Grandy, D. K., Thambi, L., *et al.* (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*, 347, 76-80.
- [23] Giros, B., Martres, M. P., Sokoloff, P., *et al.* (1990) [Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome]. *C R Acad Sci III*, 311, 501-508.
- [24] Van Tol, H. H., Bunzow, J. R., Guan, H. C., *et al.* (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610-614.
- [25] Grandy, D. K., Zhang, Y. A., Bouvier, C., *et al.* (1991) Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9175-9179.
- [26] Zapata, A., Kivell, B., Han, Y., *et al.* (2007) Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *J Biol Chem*, 282, 35842-35854.
- [27] Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., *et al.* (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35, 1503-1519.
- [28] Gomperts, B. D., Kramer, I. M. and Tatham, P. E. R. (2003) *Signal Transduction*, Elsevier Academic Press.
- [29] Tirota, E., Fontaine, V., Picetti, R., *et al.* (2008) Signaling by dopamine regulates D2 receptors trafficking at the membrane. *Cell Cycle*, 7, 2241-2248.
- [30] Neve, K. A., Seamans, J. K. and Trantham-Davidson, H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, 24, 165-205.
- [31] So, C. H., Varghese, G., Curley, K. J., *et al.* (2005) D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Molecular pharmacology*, 68, 568-578.
- [32] Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., *et al.* (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 654-659.
- [33] Andringa, G., Stoof, J. C. and Cools, A. R. (1999) Sub-chronic administration of the dopamine D(1) antagonist SKF 83959 in bilaterally MPTP-treated rhesus monkeys: stable therapeutic effects and wearing-off dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)*, 146, 328-334.

- [34] Seeman, P., Niznik, H. B., Guan, H. C., *et al.* (1989) Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 10156-10160.
- [35] Sunahara, R. K., Guan, H. C., O'Dowd, B. F., *et al.* (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350, 614-619.
- [36] Niznik, H. B. (1994) *Dopamine Receptors and Transporters*, Marcel Dekker, Inc, New York.
- [37] Ozono, R., O'Connell, D. P., Wang, Z. Q., *et al.* (1997) Localization of the dopamine D1 receptor protein in the human heart and kidney. *Hypertension*, 30, 725-729.
- [38] Wu, D. M., Kawamura, H., Li, Q., *et al.* (2001) Dopamine activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in rat retinal pericytes. *Vis Neurosci*, 18, 935-940.
- [39] Cavallotti, C., Pescosolido, N., Artico, M., *et al.* (1999) Localization of dopamine receptors in the rabbit cornea. *Cornea*, 18, 721-728.
- [40] Nishizaki, Y. (1993) [The effects of exogenous and endogenous dopamine on the gastric microcirculation and their action sites in rat stomach]. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 90, 1639-1651.
- [41] Oda, M., Nakamura, M., Honda, K., *et al.* (1988) Involvement of autonomic nervous system in gastric mucosal defense mechanism. *J Clin Gastroenterol*, 10 Suppl 1, S99-113.
- [42] Bacic, F., Uematsu, S., McCarron, R. M., *et al.* (1991) Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebromicrovascular endothelium. *Journal of neurochemistry*, 57, 1774-1780.
- [43] Devoino, L. V., Al'perina, E. L., Gevorgyan, M. M., *et al.* (2006) Interaction between dopamine D1 and D2 receptors in modulation of the immune response. *Bull Exp Biol Med*, 141, 553-555.
- [44] Hyun, J. S., Baig, M. R., Yang, D. Y., *et al.* (2002) Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat and human seminal vesicles. *J Androl*, 23, 114-120.
- [45] Alsat, E. and Evain-Brion, D. (1998) Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. *Médecine Thérapeutique/Pédiatrie*, 1, 509-516.
- [46] Evain-Brion, D. and Malassine, A. (2003) Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res*, 13 Suppl A, S34-37.
- [47] Le Bouteiller, P., Solier, C., Proll, J., *et al.* (1999) Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update*, 5, 223-233.
- [48] Tortora, G. and Grabowski, S. R. (2001) *Principes d'anatomie et de physiologie*, Saint-Laurent.
- [49] Evain-Brion, D. (2001) [The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. *Gynecol Obstet Fertil*, 29, 497-502.
- [50] Cronier, L., Frendo, J. L., Defamie, N., *et al.* (2003) Requirement of gap junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation. *Biol Reprod*, 69, 1472-1480.

- [51] Mi, S., Lee, X., Li, X., *et al.* (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403, 785-789.
- [52] Muir, A., Lever, A. M. and Moffett, A. (2006) Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *J Gen Virol*, 87, 2067-2071.
- [53] Phillippe, M. and Ryan, K. J. (1981) Catecholamines in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 139, 204-208.
- [54] Kakishita, K., Elwan, M. A., Nakao, N., *et al.* (2000) Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol*, 165, 27-34.
- [55] Tada, K., Kudo, T. and Kishimoto, Y. (1991) Effects of L-dopa or dopamine on human decidual prostaglandin synthesis. *Acta Med Okayama*, 45, 333-338.
- [56] Elwan, M. A., Ishii, T. and Sakuragawa, N. (2003) Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*, 344, 157-160.
- [57] Elwan, M. A., Ishii, T. and Sakuragawa, N. (2003) Characterization of dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in human placenta amniotic epithelial cells. *Placenta*, 24, 658-663.
- [58] Elwan, M. A. and Sakuragawa, N. (2007) Uptake and decarboxylation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in cultured monkey placenta amniotic epithelial cells. *Placenta*, 28, 245-248.
- [59] El-Khodori, B. F. and Boksa, P. (1997) Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by Caesarean section compared to vaginal birth. *Exp Neurol*, 145, 118-129.
- [60] Watanabe, T., Matsushashi, K. and Takayama, S. (1990) Placental and blood-brain barrier transfer following prenatal and postnatal exposures to neuroactive drugs: relationship with partition coefficient and behavioral teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 105, 66-77.
- [61] Martel, F. and Azevedo, I. (2003) An update on the extraneuronal monoamine transporter (EMT): characteristics, distribution and regulation. *Curr Drug Metab*, 4, 313-318.
- [62] Dutta, A. K., Ghosh, B., Biswas, S., *et al.* (2008) D-161, a novel pyran-based triple monoamine transporter blocker: Behavioral pharmacological evidence for antidepressant-like action. *European journal of pharmacology*.
- [63] Ganapathy, V. V., Prasad, P. D., Ganapathy, M. E., *et al.* (1999) Drugs of abuse and placental transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 38, 99-110.
- [64] Siaterli, M. Z., Vassilacopoulou, D. and Fragoulis, E. G. (2003) Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase. *Neurochem Res*, 28, 797-803.



- [65] Rajakumar, A., Brandon, H. M., Daftary, A., *et al.* (2004) Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*, 25, 763-769.
- [66] Manyonda, I. T., Slater, D. M., Fenske, C., *et al.* (1998) A role for noradrenaline in pre-eclampsia: towards a unifying hypothesis for the pathophysiology. *Br J Obstet Gynaecol*, 105, 641-648.
- [67] Elwan, M. A., Ishii, T. and Sakuragawa, N. (1999) Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells. *Journal of neuroscience research*, 56, 316-322.
- [68] Vaillancourt, C., Petit, A., Gallo-Payet, N., *et al.* (1994) Labelling of D2-dopaminergic and 5-HT2-serotonergic binding sites in human trophoblastic cells using [3H]-spiperone. *Journal of receptor research*, 14, 11-22.
- [69] Vaillancourt, C., Petit, A. and Belisle, S. (1994) D2-dopamine agonists inhibit adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cAMP) production in human term trophoblastic cells. *Life sciences*, 55, 1545-1552.
- [70] Vaillancourt, C., Petit, A. and Belisle, S. (1998) Expression of human placental D2-dopamine receptor during normal and abnormal pregnancies. *Placenta*, 19, 73-80.
- [71] Kim, H. J., Koh, P. O., Kang, S. S., *et al.* (2001) The localization of dopamine D2 receptor mRNA in the human placenta and the anti-angiogenic effect of apomorphine in the chorioallantoic membrane. *Life sciences*, 68, 1031-1040.
- [72] Vaillancourt, C., Petit, A. and Belisle, S. (1997) Interaction of D2-dopamine receptor with two pertussis toxin sensitive G proteins in human placenta. *Life sciences*, 60, 1365-1375.
- [73] Petit, A., Gallo-Payet, N., Vaillancourt, C., *et al.* (1993) A role for extracellular calcium in the regulation of placental lactogen release by angiotensin-II and dopamine in human term trophoblastic cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 77, 670-676.
- [74] Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., *et al.* (1995) Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Brain research*, 29, 157-162.
- [75] Lee, C. K., Kang, H. S., Lee, B. J., *et al.* (1998) Effects of dopamine and estrogen on the regulation of Pit-1 alpha, Pit-1 beta, and PL-II gene expression in the rat placenta. *Molecules and cells*, 8, 205-211.
- [76] Kim, M. O., Kim, J. H., Choi, W. S., *et al.* (1997) Colocalization of dopamine D1 and D2 receptor mRNAs in rat placenta. *Molecules and cells*, 7, 710-714.
- [77] Ferreira-de-Almeida, J. A., Pereira-Leite, L., Cavallotti, C., *et al.* (1993) Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine D1 receptors in the human umbilical artery. *European journal of pharmacology*, 234, 209-214.
- [78] Yanagawa, T., Kishimoto, Y., Tada, K., *et al.* (1997) Presence of dopamine DA-1 receptors in human decidua. *Placenta*, 18, 169-172.

- [79] Ferre, F. (1986) Dopamine-stimulated adenylate cyclase in human term placenta. *Life sciences*, 39, 1893-1900.
- [80] Cornil, C. A. and Ball, G. F. (2008) Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals. *J Comp Neurol*, 511, 610-627.
- [81] Brownlee, M. (2001) Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*, 414, 813-817.
- [82] Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., *et al.* (1996) Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, 45, 926-933.
- [83] Zimmet, P. Z. (1992) Kelly West Lecture 1991. Challenges in diabetes epidemiology--from West to the rest. *Diabetes Care*, 15, 232-252.
- [84] Metzger, B. E. (1991) Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 40 Suppl 2, 197-201.
- [85] Metzger, B. E. and Coustan, D. R. (1998) Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care*, 21 Suppl 2, B161-167.
- [86] Jovanovic-Peterson, L. and Peterson, C. M. (1996) Review of gestational diabetes mellitus and low-calorie diet and physical exercise as therapy. *Diabetes Metab Rev*, 12, 287-308.
- [87] Metzger, B. E., Buchanan, T. A., Coustan, D. R., *et al.* (2007) Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 30 Suppl 2, S251-260.
- [88] Bottalico, J. N. (2007) Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications. *Semin Perinatol*, 31, 176-184.
- [89] Plagemann, A., Harder, T., Lindner, R., *et al.* (1998) Alterations of hypothalamic catecholamines in the newborn offspring of gestational diabetic mother rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 109, 201-209.
- [90] Plagemann, A. (2008) A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 21, 143-148.
- [91] Plagemann, A., Harder, T. and Dudenhausen, J. W. (2008) The diabetic pregnancy, macrosomia, and perinatal nutritional programming. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 61, 91-102.
- [92] Figlewicz, D. P., Evans, S. B., Murphy, J., *et al.* (2003) Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res*, 964, 107-115.
- [93] Bello, N. T. and Hajnal, A. (2006) Alterations in blood glucose levels under hyperinsulinemia affect accumbens dopamine. *Physiol Behav*, 88, 138-145.
- [94] Williams, J. M., Owens, W. A., Turner, G. H., *et al.* (2007) Hypoinsulinemia regulates amphetamine-induced reverse transport of dopamine. *PLoS Biol*, 5, 2369-2378.

- [95] Marco, G. S., Colucci, J. A., Fernandes, F. B., *et al.* (2008) Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 747-754.
- [96] Patel, K. P., Zhang, K., Hein, M., *et al.* (1997) Peripheral noradrenergic turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, 35, 1-9.
- [97] Daskalakis, G., Marinopoulos, S., Krielesi, V., *et al.* (2008) Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 87, 403-407.
- [98] Chen, X. and Scholl, T. O. (2005) Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*, 5, 282-288.
- [99] Coughlan, M. T., Vervaart, P. P., Permezel, M., *et al.* (2004) Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 25, 78-84.
- [100] Montalbetti, N., Cantero, M. R., Dalghi, M. G., *et al.* (2008) Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. *Placenta*, 29, 510-518.
- [101] Marini, M., Vichi, D., Toscano, A., *et al.* (2008) Effect of impaired glucose tolerance during pregnancy on the expression of VEGF receptors in human placenta. *Reprod Fertil Dev*, 20, 789-801.
- [102] Roney, N. and Colman, J. (2004) Interaction profile for lead, manganese, zinc and copper. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18, 231-234.
- [103] Desrosiers, M., Gagnon, C., Masson, S., *et al.* (2008) Relationships among total recoverable and reactive metals and metalloid in St. Lawrence River sediment: bioaccumulation by chironomids and implications for ecological risk assessment. *Sci Total Environ*, 389, 101-114.
- [104] Turusov, V., Rakitsky, V. and Tomatis, L. (2002) Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environ Health Perspect*, 110, 125-128.
- [105] Carson, R. (1962) *Silent Spring*.
- [106] Schiavone, A., Corsolini, S., Borghesi, N., *et al.* (2009) Contamination profiles of selected PCB congeners, chlorinated pesticides, PCDD/Fs in Antarctic fur seal pups and penguin eggs. *Chemosphere*.
- [107] Wong, F., Robson, M., Diamond, M. L., *et al.* (2009) Concentrations and chiral signatures of POPs in soils and sediments: a comparative urban versus rural study in Canada and UK. *Chemosphere*, 74, 404-411.
- [108] Kurt-Karakus, P. B., Bidleman, T. F., Staebler, R. M., *et al.* (2006) Measurement of DDT fluxes from a historically treated agricultural soil in Canada. *Environ Sci Technol*, 40, 4578-4585.
- [109] Colborn, T. (2006) A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ Health Perspect*, 114, 10-17.
- [110] Takser, L., Mergler, D. and Lafond, J. (2005) Very low level environmental exposure to lead and prolactin levels during pregnancy. *Neurotoxicology and teratology*, 27, 505-508.

- [111] Lafond, J., Hamel, A., Takser, L., *et al.* (2004) Low environmental contamination by lead in pregnant women: effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts. *J Toxicol Environ Health A*, 67, 1069-1079.
- [112] Tadokoro, N., Koibuchi, N., Ohtake, H., *et al.* (1995) Expression of prolactin gene in human decidua during pregnancy studied by in situ hybridization histochemistry. *Endocr J*, 42, 537-543.
- [113] Freemark, M. (2001) Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus: roles in fetal development. *Biochemical Society transactions*, 29, 38-41.
- [114] Takser, L., Mergler, D., de Grosbois, S., *et al.* (2004) Blood manganese content at birth and cord serum prolactin levels. *Neurotoxicology and teratology*, 26, 811-815.
- [115] Sappamrer, R., Prapamontol, T., Prakobvitayakit, O., *et al.* (2008) Placental transfer of DDT in mother-infant pairs from Northern Thailand. *J Environ Sci Health B*, 43, 484-489.
- [116] Shen, H., Main, K. M., Virtanen, H. E., *et al.* (2007) From mother to child: investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring. *Chemosphere*, 67, S256-262.
- [117] Hamel, A., Mergler, D., Takser, L., *et al.* (2003) Effects of low concentrations of organochlorine compounds in women on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblast. *Toxicol Sci*, 76, 182-189.
- [118] Wojtowicz, A. K., Milewicz, T. and Gregoraszczyk, E. L. (2008) Time-dependent action of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane) and its metabolite DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene) on human chorionic gonadotropin and progesterone secretion. *Gynecol Endocrinol*, 24, 54-58.
- [119] Wojtowicz, A. K., Milewicz, T. and Gregoraszczyk, E. L. (2007) DDT and its metabolite DDE alter steroid hormone secretion in human term placental explants by regulation of aromatase activity. *Toxicol Lett*, 173, 24-30.
- [120] Rodriguez, V. M., Dufour, L., Carrizales, L., *et al.* (1998) Effects of oral exposure to mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environ Health Perspect*, 106, 487-491.
- [121] Chandra, A. V., Ali, M. M., Saxena, D. K., *et al.* (1981) Behavioral and neurochemical changes in rats simultaneously exposed to manganese and lead. *Arch Toxicol*, 49, 49-56.
- [122] Mutti, A. and Smargiassi, A. (1998) Selective vulnerability of dopaminergic systems to industrial chemicals: risk assessment of related neuroendocrine changes. *Toxicol Ind Health*, 14, 311-323.
- [123] Hong, J. S., Herr, D. W., Hudson, P. M., *et al.* (1986) Neurochemical effects of DDT in rat brain in vivo. *Arch Toxicol Suppl*, 9, 14-26.
- [124] Hatcher, J. M., Delea, K. C., Richardson, J. R., *et al.* (2008) Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites. *Neurotoxicology*, 29, 682-690.

- [125] Petit, A., Vaillancourt, C., Bellabarba, D., *et al.* (1990) Presence of D2-dopamine receptors in human term placenta. *Journal of receptor research*, 10, 205-215.
- [126] Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., *et al.* (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118, 1567-1582.
- [127] Petroff, M. G., Phillips, T. A., Ka, H., *et al.* (2006) Isolation and culture of term human trophoblast cells. *Methods Mol Med*, 121, 203-217.
- [128] Lanoix, D., Beghdadi, H., Lafond, J., *et al.* (2008) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res*, 45, 50-60.
- [129] Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., *et al.* (2004) Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 286, 21-34.
- [130] Hamasaki, K., Hamasaki, H., Kashimura, M., *et al.* (1993) [Immunoelectron microscopic localization of human chorionic gonadotropin in the syncytiotrophoblast of hydatidiform moles]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 45, 547-550.
- [131] Dye, J. F., Jablenska, R., Donnelly, J. L., *et al.* (2001) Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta*, 22, 32-43.
- [132] Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., *et al.* (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7238-7241.
- [133] Stratakis, C. A., Mitsiades, N. S., Chrousos, G. P., *et al.* (1996) Dopamine affects the in vitro basal secretion of rat placenta opioids in an opioid and dopamine receptor type-specific manner. *European journal of pharmacology*, 315, 53-58.
- [134] Ferre, S., Rimondini, R., Popoli, P., *et al.* (1999) Stimulation of adenosine A1 receptors attenuates dopamine D1 receptor-mediated increase of NGFI-A, c-fos and jun-B mRNA levels in the dopamine-denervated striatum and dopamine D1 receptor-mediated turning behaviour. *Eur J Neurosci*, 11, 3884-3892.
- [135] Grullon, K., Jacobs, M. M., Li, S. X., *et al.* (1995) Beta-adrenergic regulation of cyclic AMP synthesis in cultured human syncytiotrophoblast. *Placenta*, 16, 589-597.
- [136] Voet, D. and Voet, J. (1998) *Biochimie*, De Boeck Université, Paris.
- [137] Jiang, X., Benovic, J. L. and Wedegaertner, P. B. (2007) Plasma membrane and nuclear localization of G protein coupled receptor kinase 6A. *Mol Biol Cell*, 18, 2960-2969.
- [138] Macaron, C., Kyncl, M., Famuyiwa, O., *et al.* (1979) In vitro effect of dopamine and pimozide on human chorionic gonadotropin secretion. *Am J Obstet Gynecol*, 135, 499-502.
- [139] Petit, A., Guillon, G., Pantaloni, C., *et al.* (1990) An islet-activating protein-sensitive G-protein is involved in dopamine inhibition of both angiotensin-

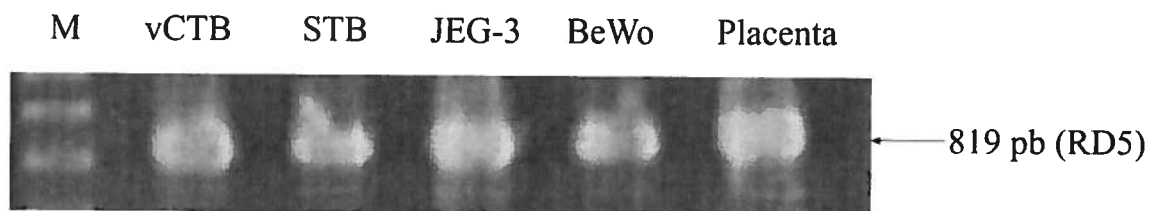
- stimulated inositol phosphate production and human placental lactogen release in human trophoblastic cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 71, 1573-1580.
- [140] O'Connell, D. P., Botkin, S. J., Ramos, S. I., *et al.* (1995) Localization of dopamine D1A receptor protein in rat kidneys. *Am J Physiol*, 268, F1185-1197.
- [141] Artalejo, C. R., Ariano, M. A., Perlman, R. L., *et al.* (1990) Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, 348, 239-242.
- [142] Zhang, L. and Lidow, M. S. (2002) D1 dopamine receptor regulation of cell cycle in FGF- and EGF-supported primary cultures of embryonic cerebral cortical precursor cells. *Int J Dev Neurosci*, 20, 593-606.
- [143] He, Q. and Yuan, L. B. (2007) Dopamine inhibits proliferation, induces differentiation and apoptosis of K562 leukaemia cells. *Chin Med J (Engl)*, 120, 970-974.
- [144] Li, Z., Yu, C., Han, Y., *et al.* (2008) Inhibitory effect of D1-like and D3 dopamine receptors on norepinephrine-induced proliferation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H2761-2768.
- [145] Hiramoto, T., Satoh, Y., Takishima, K., *et al.* (2008) Induction of cell migration of neural progenitor cells in vitro by alpha-1 adrenergic receptor and dopamine D1 receptor stimulation. *Neuroreport*, 19, 793-797.
- [146] Kollar, A., Kekesi, V. and Juhasz-Nagy, A. (1989) The dopamine-induced coronary vasoconstrictor response is potentiated by adenosine administration in the dog heart. *Jpn Heart J*, 30, 709-721.
- [147] Hughes, A. and Sever, P. (1987) Vascular dopamine receptors in isolated human umbilical artery. *Blood Vessels*, 24.
- [148] Hughes, A. D. and Sever, P. S. (1989) Action of fenoldopam, a selective dopamine (DA1) receptor agonist, on isolated human arteries. *Blood Vessels*, 26, 119-127.
- [149] de Almeida, J. A., Cavallotti, C., Pereira Leite, L., *et al.* (1994) Loss of dopamine D1-like receptors in the umbilical artery of pre-eclamptic subjects. *J Auton Pharmacol*, 14, 353-363.
- [150] Olszewski, J., Szczurowicz, A. and Wojcikowski, C. (1995) [Changes in levels of human placenta lactogen (hPL), progesterone, and estriol in blood serum and estrogens in urine during gestational diabetes mellitus]. *Ginekologia polska*, 66, 145-150.
- [151] Greco, M. A., Kamat, B. R. and Demopoulos, R. I. (1989) Placental protein distribution in maternal diabetes mellitus: an immunocytochemical study. *Pediatr Pathol*, 9, 679-690.
- [152] Meller, M., Vadachkoria, S., Luthy, D. A., *et al.* (2005) Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*, 26, 601-607.
- [153] Wentzel, P., Ejdesjo, A. and Eriksson, U. J. (2003) Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GAPDH activity in rat embryos. *Diabetes*, 52, 1222-1228.

- [154] Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Rotellar, F., *et al.* (2007) Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 39, 495-500.
- [155] Saitoh, A., Morita, K., Sodeyama, M., *et al.* (1998) Effects of the experimental diabetes on dopamine D1 receptor-mediated locomotor-enhancing activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 60, 161-166.
- [156] Salkovic, M., Sabolic, I. and Lackovic, Z. (1995) Striatal dopaminergic D1 and D2 receptors after intracerebroventricular application of alloxan and streptozocin in rat. *J Neural Transm Gen Sect*, 100, 137-145.
- [157] Zeng, C., Wang, D., Asico, L. D., *et al.* (2004) Aberrant D1 and D3 dopamine receptor transregulation in hypertension. *Hypertension*, 43, 654-660.
- [158] Banday, A. A., Marwaha, A., Tallam, L. S., *et al.* (2005) Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes*, 54, 2219-2226.
- [159] Banday, A. A., Fazili, F. R. and Lokhandwala, M. F. (2007) Insulin causes renal dopamine D1 receptor desensitization via GRK2-mediated receptor phosphorylation involving phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293, F877-884.
- [160] Meier, A. H., Cincotta, A. H. and Lovell, W. C. (1992) Timed bromocriptine administration reduces body fat stores in obese subjects and hyperglycemia in type II diabetics. *Experientia*, 48, 248-253.
- [161] Cincotta, A. H., Meier, A. H. and Cincotta Jr, M. (1999) Bromocriptine improves glycaemic control and serum lipid profile in obese Type 2 diabetic subjects: a new approach in the treatment of diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 1683-1707.
- [162] Pijl, H. (2003) Reduced dopaminergic tone in hypothalamic neural circuits: expression of a "thrifty" genotype underlying the metabolic syndrome? *European journal of pharmacology*, 480, 125-131.
- [163] Lee, C. K., Lee, J. T., Yu, S. J., *et al.* (2008) Effects of cadmium on the expression of placental lactogens and Pit-1 genes in the rat placental trophoblast cells. *Molecular and cellular endocrinology*.
- [164] Roses, O. E., Alvarez, S., Conti, M. I., *et al.* (1989) Correlation between lead and prolactin in males exposed and unexposed to lead in Buenos Aires (Argentina) area. *Bull Environ Contam Toxicol*, 42, 438-442.
- [165] Nowak, P., Szczerbak, G., Nitka, D., *et al.* (2008) Effect of prenatal lead exposure on nigrostriatal neurotransmission and hydroxyl radical formation in rat neostriatum: dopaminergic-nitric interaction. *Toxicology*, 246, 83-89.
- [166] Takser, L., Mergler, D., Baldwin, M., *et al.* (2005) Thyroid hormones in pregnancy in relation to environmental exposure to organochlorine compounds and mercury. *Environ Health Perspect*, 113, 1039-1045.

## **8 – ANNEXE**

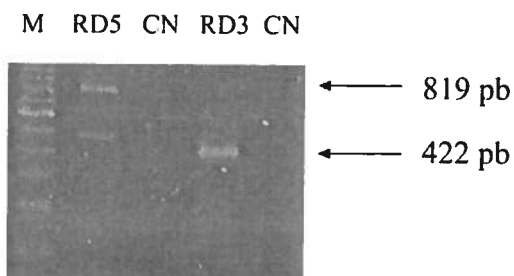


## 8 – ANNEXE



**Figure 14. Expression du récepteur dopaminergique de type D<sub>5</sub> dans le trophoblaste placentaire humain à terme.**

Expression de l'ARNm de RD<sub>5</sub> déterminée par RT-PCR dans le système placentaire humain à terme. Cytotrophoblaste villositaire (vCTB), syncytiotrophoblaste (STB), les lignées de choriocarcinome humain JEG-3 et BeWo, placenta normal (Placenta) ; l'échelle du marqueur (M) est de 100 paires de bases (pb)



**Figure 15. Expression des récepteurs dopaminergiques de type D<sub>3</sub> et D<sub>5</sub> dans le placenta humain à terme.**

Expression de l'ARNm de RD<sub>3</sub> et RD<sub>5</sub> déterminée par RT-PCR dans le système placentaire humain à terme. L'échelle du marqueur (M) est de 100 paires de bases (pb)