



**HAL**  
open science

# Les aquaporines dans l'épiderme humain : expression, localisation et modifications au cours de la différenciation

Mathieu Jamot

► **To cite this version:**

Mathieu Jamot. Les aquaporines dans l'épiderme humain : expression, localisation et modifications au cours de la différenciation. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T009 . tel-01087068

**HAL Id: tel-01087068**

**<https://theses.hal.science/tel-01087068v1>**

Submitted on 25 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ PARIS XI**  
**FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**  
2011

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI**

Champ disciplinaire : Biologie cellulaire et moléculaire et sciences de la santé

École Doctorale de rattachement : Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

présentée et soutenue publiquement le 7 Avril 2011 par

Mathieu JAMOT

**LES AQUAPORINES DE L'ÉPIDERME HUMAIN.  
EXPRESSION, LOCALISATION ET MODIFICATIONS AU COURS DE LA  
DIFFÉRENCIATION**

Directeur de thèse : LE MAIRE Marc

Codirecteur : VERBAVATZ Jean-Marc

JURY

Présidente : BAGOT Martine

Rapporteur : DELPORTE Christine

Rapporteur : TAÏEB Alain

Examineur : SCHNEBERT Sylviane

Examineur : LE MAIRE Marc

Examineur : VERBAVATZ Jean-Marc



# **SOMMAIRE**

<b>I : INTRODUCTION</b>	<b>PP 7-43</b>
1. L'ÉPIDERME HUMAIN	PP 8-25
1.A. La peau humaine	PP 8-10
1.B. L'épiderme humain	PP 10-15
1.B.a. Définition	P 10
1.B.b. Structure de la couche basale à la couche cornée	PP 10-12
1.B.c. Fonctions de l'épiderme	PP 12-15
1.C. Les kératinocytes	PP 15-20
1.C.a. Présentation	PP 15-16
1.C.b. Les facteurs de prolifération et de différenciation	PP 17-18
1.C.c. Le rôle du calcium	PP 18-19
1.C.d. Dérèglement : Kératocarcinomes basaux et spineux	PP 19-20
1.D. Les mélanocytes	PP 21-25
1.D.a. Présentation	PP 21-22
1.D.b. Mélanogénèse	PP 22-25
1.D.c. Dérèglement : le mélanome	P 25
2. LES AQUAPORINES	PP 26-41
2.A. Aquaporine 1 : Aquaporine archétype	PP 26-32
2.A.a. De la perméabilité hydrique...	PP 26-27
2.A.b. ...À l'aquaporine 1	PP 27-29
2.A.c. Structure de l'AQP1	PP 29-32
2.B. Fonctions des aquaporines	PP 32-41
2.B.a. Le transport d'eau : Les aquaporines rénales	PP 33-36
2.B.b. Aquaporines et transport du glycérol	PP 36-39
2.B.c. Aquaporines et autres fonctions	PP 39-41
3. OBJECTIFS	PP 41-43
<b>II : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>PP 44-51</b>
1. REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RTPCR)	PP 45-47
2. WESTERN BLOT	P 47

3. ANTICORPS UTILISÉS	PP48-49
4. MICROSCOPIE	PP49-50
5. CULTURE CELLULAIRE	PP 50-51
<b>III : EXPRESSION DES AQUAPORINES AU NIVEAU DE LA PEAU</b>	<b>PP 52-60</b>
1. INTRODUCTION	P 53
2. RÉSULTATS	PP 54-58
2.A. Au niveau du derme et de l'hypoderme	PP 54-56
2.B. Au niveau de l'épiderme	PP 57-58
3. CONCLUSIONS	PP 59-60
<b>IV : EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 1 PAR LES MÉLANOCYTES</b>	<b>PP 61-73</b>
1. EXPRESSION DANS DES CULTURES PRIMAIRES	PP 62-65
1.A. INTRODUCTION	PP 62-63
1.B. EXPRESSION PROTÉIQUES	PP 63-65
2. EXPRESSION DANS L'ÉPIDERME HUMAIN	PP 65-67
2.A. Expression de l'ARNm AQP1	PP 65-66
2.B. Expression de la protéine AQP1	PP 66-67
3. LOCALISATION DE L'AQUAPORINE 1	PP 68-69
4. RECHERCHE D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL	PP 69-72
4.A. Les cellules MNT-1	PP 69-70
4.B. L'épiderme reconstruit pigmenté	PP 70-72
5. CONCLUSION	PP 72-73
<b>V : EXPRESSION DES AQUAPORINES PAR DES KÉRATINOCYTES</b>	<b>PP 74-92</b>
1. INTRODUCTION	PP 75-76
2. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 3	PP 76-82
3. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 10	PP 82-84
4. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 9	PP 84-87

5. EFFETS DE LA DIFFÉRENCIATION	PP 87-90
6. CONCLUSION	PP 91-92
<b>VI : DISCUSSION</b>	<b>PP 93-109</b>
1. DIFFÉRENCES ENTRE ÉPIDERMES MURIN ET HUMAIN	PP 94-95
2. FONCTIONS DES AQUAPORINES EXPRIMÉES	PP 95-101
2.A. Au niveau des mélanocytes	PP 95-96
2.B. Au niveau des kératinocytes	PP 96-101
3. AQUAPORINES ET CANCERS	PP 101-105
3.A. ÉTATS DES LIEUX	PP 101-102
3.B. L'AQUAPORINE, UN COUPABLE IDÉAL ?	PP 102-105
4. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	PP 105-108
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	PP 108-109
<b>VII : BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>PP 110-130</b>
<b>VIII : REMERCIEMENTS</b>	<b>PP 131-134</b>
<b>IX : ANNEXES</b>	<b>P 135</b>

*Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter?*

*Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis.*

*Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins.*

*Familial nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: dissociation between aquaporin-2 and vasopressin excretion.*

# **I. INTRODUCTION**

# 1. L'ÉPIDERME HUMAIN

## 1.A. LA PEAU HUMAINE

La peau est l'organe constituant le revêtement extérieur du corps de l'homme et de fait la partie visible de notre être. Des simples tatouages et scarifications utilisés pour affirmer son identité, séduire ou souligner une appartenance sociale, jusqu'au maquillage retrouvé avec les vestiges des premières civilisations, l'homme depuis toujours décore sa peau. Les cosmétiques les plus anciens datent de la première dynastie égyptienne, soit vers 3100-2907 avant J.-C. (Nardello-Rataj et al, 2008).



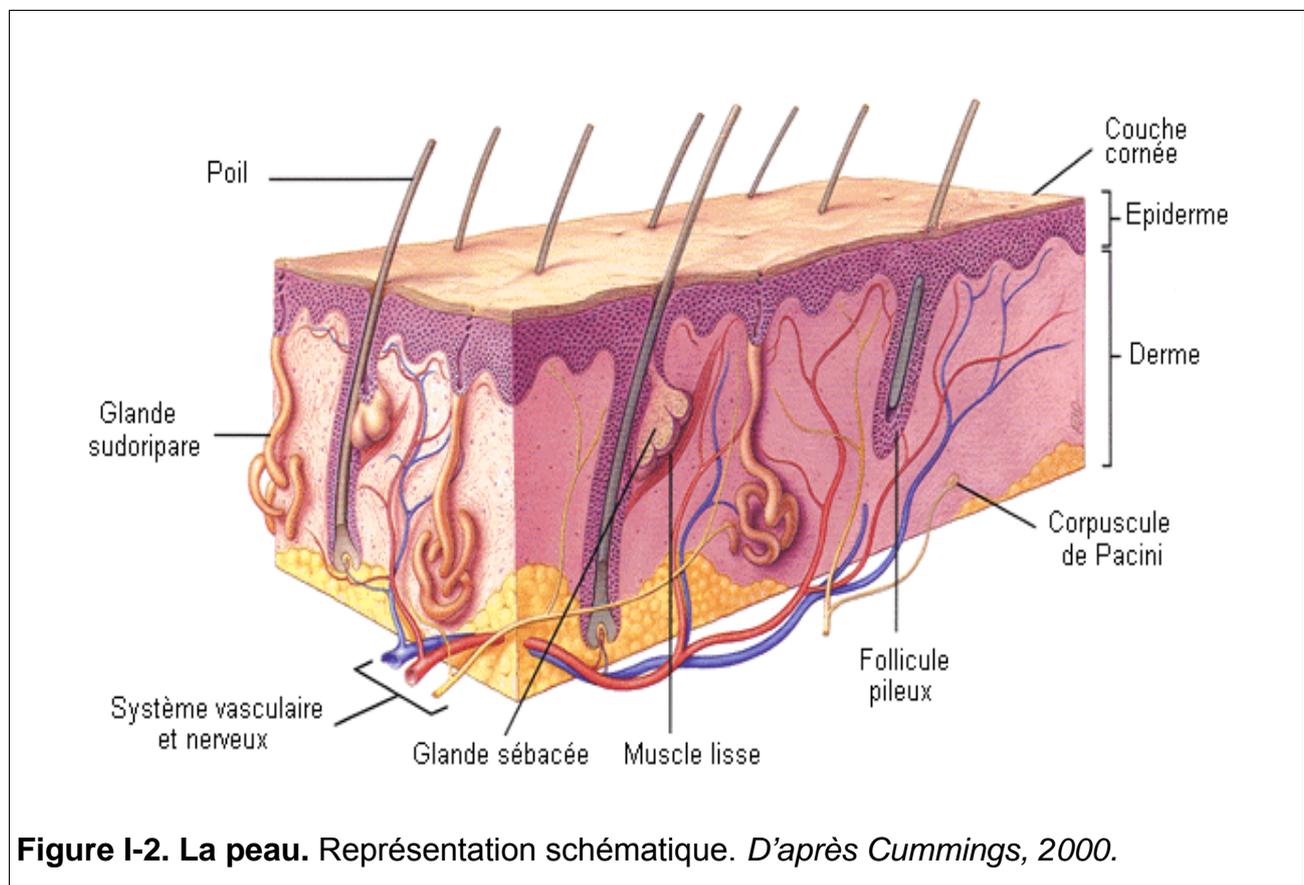
**Figure I-1. Anatomia del corpo humano de Juan Valverde de Amusco (1560).** N'étant pas considérée comme un organe, la peau est retirée pour l'étude des muscles de l'homme.

Bien que la peau soit l'organe le plus étendu, approximativement 2 m<sup>2</sup> pour un adulte, et un des plus lourds de notre corps puisqu'il en représente environ 6% du poids total soit 5 à 6 kg (Tobin, 2006), il reste l'un des moins étudiés (fig. I-1). Ce n'est que depuis les trente dernières années que la peau est étudiée comme un organe complexe, à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur et intégrant de nombreuses fonctions. Par la richesse de son innervation (corpuscules tactiles de Meissner, de Krause, de Pacini) la peau est l'organe du toucher (Boulais et Misery, 2008), deuxième sens après

la vue en termes d'informations traitées par le cerveau. Par la sueur et l'évaporation cutanée, elle joue un rôle dans l'élimination des déchets de l'organisme et malgré son rôle de barrière, ses fonctions d'échanges ne sont pas négligeables. Mais la fonction essentielle de la peau est une fonction de protection. Elle assure une protection mécanique contre les traumatismes et la pénétration des germes nocifs et des poisons ; une protection contre la lumière solaire par son système mélanique ; une protection calorique car la peau est l'organe périphérique de thermorégulation.

La peau est composée de trois couches superposées (*Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008*).

L'épiderme est la partie supérieure. C'est un épithélium stratifié non vascularisé, dont l'épaisseur est comprise entre 75 et 150  $\mu\text{m}$ .



L'épiderme repose sur le derme qui est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé. Le derme mesure de 2 à 4 mm d'épaisseur. On distingue deux parties au niveau du derme. Le derme superficiel ou papillaire, avec une substance fondamentale abondante (glycosaminoglycanes) et des structures fibrillaires conjonctivoélastiques lâches (fibrilles de collagène et fibres élastiques d'oxytalan); il contient les anses

capillaires terminales et les terminaisons nerveuses. Le derme réticulaire constitue presque toute l'épaisseur du derme. C'est le véritable tissu de soutien, composé en majeure partie de larges faisceaux de fibres de collagènes, intégrés à des fibres élastiques (élastine et élaunine). C'est cette superstructure qui confère au derme sa résistance et son élasticité. Il s'y trouve le corps des poils, les glandes sébacées qui leur sont annexées, ainsi que les canaux excréteurs des glandes sudoripares.

Enfin l'hypoderme est la couche la plus profonde. Constitué par du tissu conjonctif plus lâche que dans le derme, il permet le glissement de la peau sur les parties plus profondes. Il est cloisonné en logettes ou lobules remplis de cellules adipeuses, les adipocytes, qui servent de réserves énergétiques.

## **1.B. L'EPIDERME HUMAIN**

### **1.B.a. Définition**

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié (malpighien) kératinisé. Il s'étend sur toute la surface du corps et se poursuit par les muqueuses, où il est non kératinisé. Il est formé de plusieurs couches de cellules superposées. L'épiderme est nourri par le derme et innervé par les filets dermiques superficiels. Son clivage ne donne pas de saignement, l'épiderme étant dénué de vaisseaux sanguins. Les annexes épidermiques (glandes sudoripares, poils et glandes sébacées) pénètrent profondément le derme.

### **1.B.b. Structure de la couche basale à la couche cornée**

L'épiderme est composé majoritairement de kératinocytes (90 à 95%). On distingue de la profondeur à la surface (fig. I-3) : la couche basale (stratum germinativum) ; la couche de Malpighi ou couche épineuse (stratum spinosum) ; la couche granuleuse (stratum granulosum) ; la couche claire (stratum lucidum) et enfin la couche cornée (stratum corneum).

La couche basale est accolée au derme et suit tous les contours de ses papilles. Elle est séparée du derme par la membrane basale, une matrice extracellulaire composée de la lame basale d'origine épithéliale et de la lame réticulaire d'origine conjonctive. La couche basale est composée d'une assise unique de cellules cubiques, les kératinocytes. Ils sont fixés entre eux par des desmosomes et à la lame basale par des

hémidesmosomes. C'est au niveau de cette couche que les kératinocytes prolifèrent et assurent le renouvellement permanent de l'épiderme. Les cellules de Merkel sont également présentes au niveau de cette couche. Elles font office, entre autres, de récepteurs sensoriels. Les cellules de Merkel ne sont ni rattachées aux kératinocytes ni à la lame basale. On trouve également au niveau de cette couche les mélanocytes. Ces cellules dendritiques sont responsables de la pigmentation de la peau et de sa protection face aux rayonnements ultra-violet (UV).

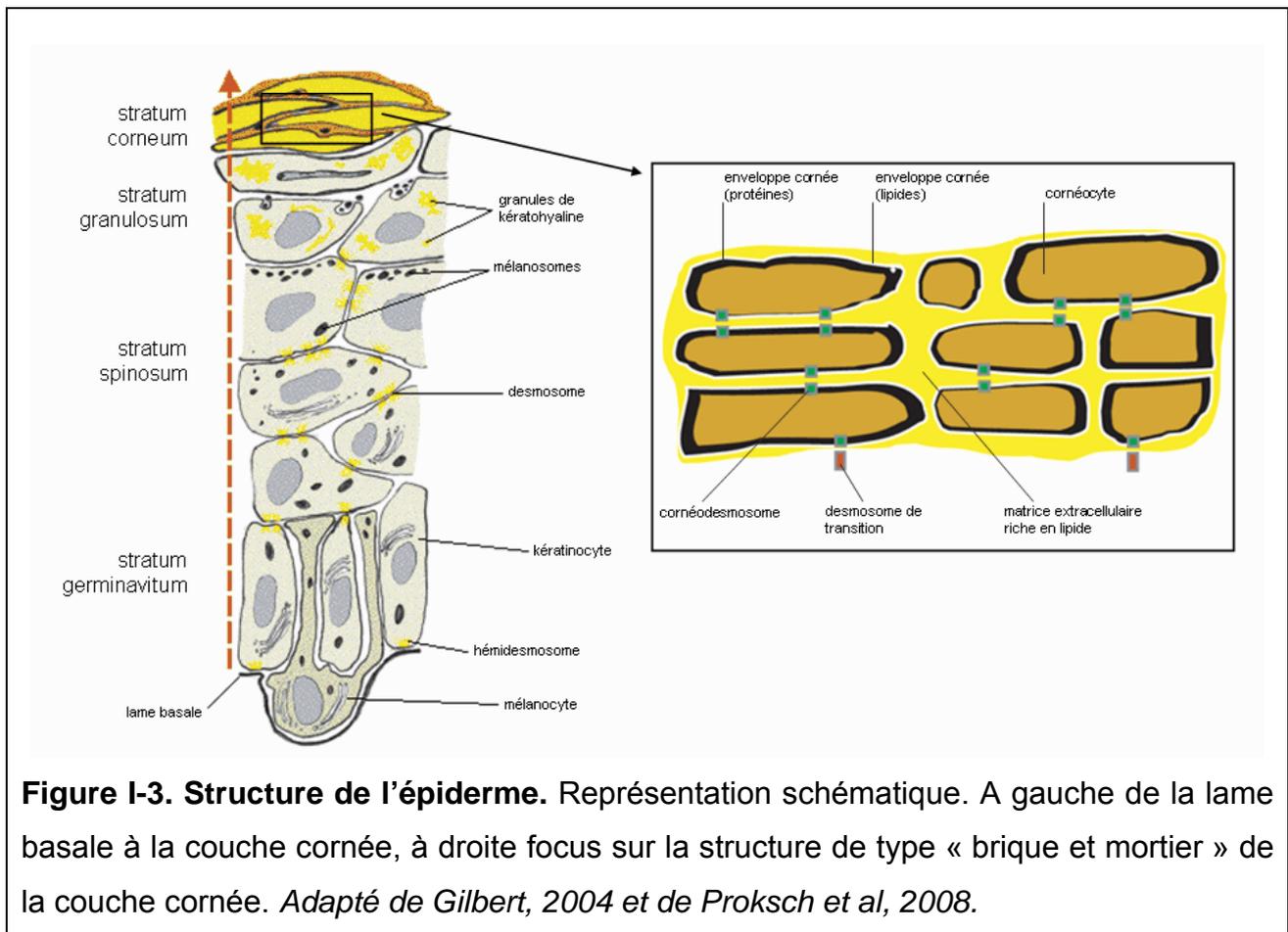
La couche épineuse est composée de huit à dix strates de kératinocytes, qui conservent une faible capacité à se diviser. Ces kératinocytes sont liés entre eux par des desmosomes. Entre les kératinocytes les cellules de Langerhans, des cellules du système immunitaire, ont une activité macrophagique. Ces cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse se multiplient au niveau de l'épiderme et émettent des dendrites vers la jonction dermo-épidermique et vers la couche supérieure.

La couche granuleuse est la dernière couche de cellules nucléées. Elle est constituée de trois à cinq strates de kératinocytes. Ces kératinocytes produisent des granules de kératohyaline, le précurseur de la kératine. Dans le même temps le noyau et les organelles dégénèrent et la membrane plasmique s'imperméabilise. Ces cellules s'aplatissent et sont poussées vers la surface à mesure que les kératinocytes des couches inférieures se divisent.

La couche claire n'est présente que dans la peau très épaisse. Elle est composée d'une assise unique de kératinocytes. Ces kératinocytes sénescents sont aplatis et translucides. Cette couche sert à réduire les forces de frictions et de cisaillements entre la couche granuleuse et la couche cornée.

Enfin la couche cornée est la couche superficielle de notre épiderme. Elle est composée de quinze à trente couches de kératinocytes cornifiés. Ils sont alors appelés cornéocytes. Les cornéocytes, remplis de  $\beta$  kératine, sont organisés en une structure de type « briques et mortier » (*Elias et al, 1979 et Proksch et al, 2008*). Ainsi chaque strate de la couche cornée est composée de « briques » de cornéocytes reliés entre eux par des cornéodesmosomes et recouverts par l'enveloppe cornée. Cette enveloppe est formée par un ensemble de protéines (involucrine, loricrine et petites protéines riche en proline) lié à une membrane lipidique composée principalement par des céramides. Une matrice extracellulaire riche en lipides (le « mortier ») entoure les cornéocytes. Cette matrice est constituée principalement de céramides (50%), de cholestérol et d'acides gras libres. Si ces cornéocytes n'ont plus de noyau et sont décrits comme morts, ils restent néanmoins biochimiquement actifs. De nombreuses activités métaboliques ont lieu aussi bien au

niveau du cytosol des cornéocytes, qu'au niveau de l'enveloppe cornée ou de la matrice extracellulaire.



**Figure I-3. Structure de l'épiderme.** Représentation schématique. A gauche de la lame basale à la couche cornée, à droite focus sur la structure de type « brique et mortier » de la couche cornée. *Adapté de Gilbert, 2004 et de Proksch et al, 2008.*

### 1.B.c. Fonctions de l'épiderme

La fonction première de la peau est celle d'une barrière. Elle assure notre intégrité physique et nous protège des agressions du milieu extérieur. Cette fonction primordiale est remplie par l'épiderme. Jusque dans les années 1960 la couche cornée est étudiée par microscopie optique. Elle apparaît comme une couche poreuse constituée d'un réseau lâche de cellules cornées se détachant facilement. L'imperméabilité de la peau était attribuée à la couche granuleuse située juste en dessous de la couche cornée. Des travaux d'électrophysiologie, complétés par la suite par des travaux de microscopie électronique ont permis d'établir de nouveaux modèles (*Elias, 2004*).

Cependant la première avancée concernant la structure même de la couche cornée est réalisée au début des années 1960 à l'aide d'un microscope optique (*Christophers et al, 1964*). Profitant du fait que la couche cornée gonfle au contact d'une solution alcaline, les

auteurs établirent que la couche cornée bien que très fine est en réalité composée d'une quinzaine de couches superposées de kératinocytes.

Un premier modèle est proposé au début des années 1970 (*Scheuplein et al, 1971*). La couche cornée est décrite comme une membrane uniforme à la manière d'une feuille plastifiée et traversée de manière intracellulaire par les molécules hydrophiles et lipophiles. Cependant ce modèle ignore complètement la structure interne de la couche cornée et son activité métabolique. Le modèle actuel représenté dans la figure I-3 distinguant une partie protéique (cornéocytes) et une partie lipidique (matrice extracellulaire) fait son apparition au cours des années 1980 (*Elias et al, 1979 et Landmann, 1986*). C'est cette structure particulière qui constitue par sa richesse lipidique une excellente barrière contre les molécules hydrophiles. Cependant elle est moins efficace contre les molécules liposolubles.

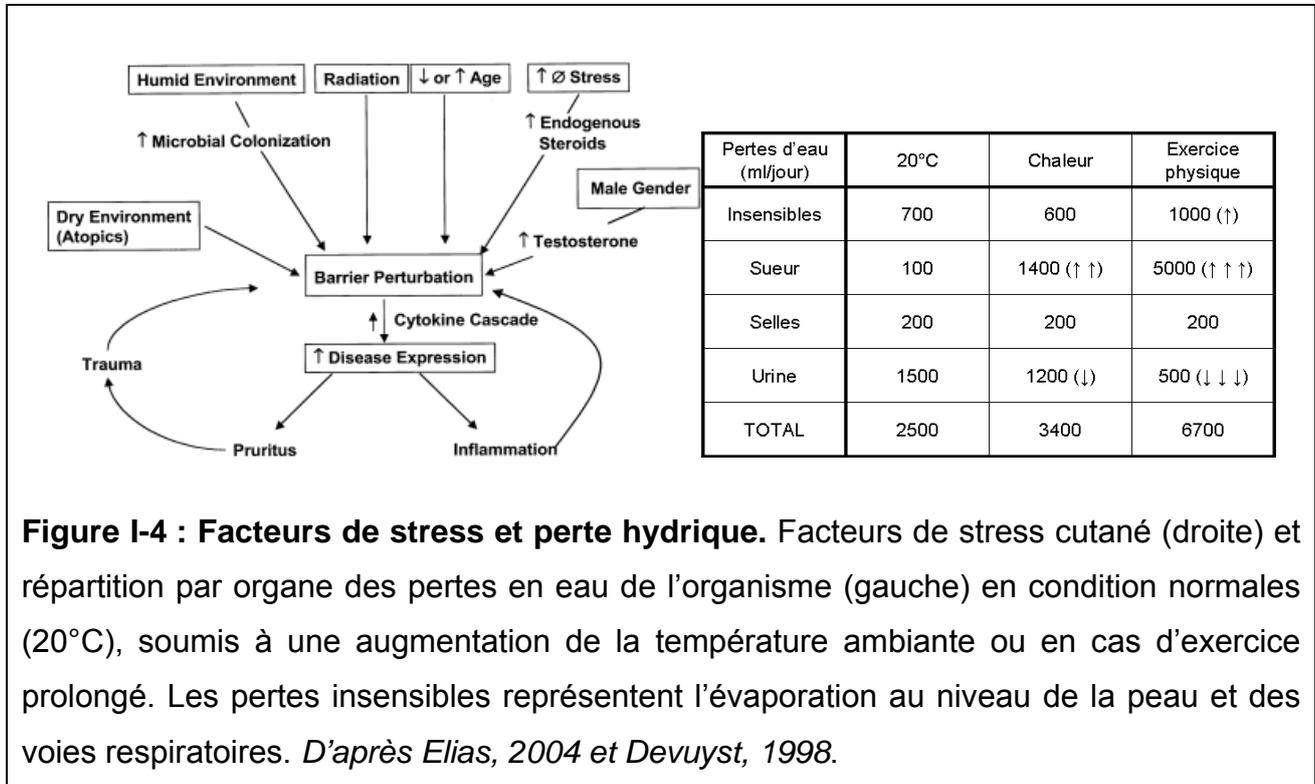
La couche cornée permet également de limiter la perte en eau trans-épidermique (Trans Epidermal Water Loss ou TEWL). Appelée perspiration, elle correspond à la perte par évaporation de l'eau contenue dans la peau. Il y a une corrélation entre la perte en eau trans-épidermique et l'épaisseur, la composition et l'état d'hydratation de la couche cornée (*Peiss et al, 1956, Grice et al, 1972, Grubauer et al, 1989 et Denda et al, 1998*). La perméabilité à l'eau de la couche cornée est mille fois moins importante que pour toute autre membrane du corps humain (*Potts, 1991*), ainsi une couche cornée intacte est elle essentielle au maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme.

De part son acidité et ses propriétés antibactériennes, la couche cornée est également un bon rempart contre les pathogènes extérieurs (*Korting et al, 1990 et Elias, 2005*). Le pH de la couche cornée varie. Il est compris entre 4,5 et 5 à la surface. Il est proche de 7 pour les couches les plus profondes. Il apparaît cependant que le pH de la couche cornée est hétérogène et que le gradient observé n'est pas linéaire. La fonction de barrière de la couche cornée est dépendante du pH. Ainsi les nouveau-nés qui sont d'avantages sujets à des eczémas présentent un pH de 7 au niveau de la couche cornée (*Visscher et al, 2000, Giusti et al, 2001 et Fluhr et al, 2004*). De plus, les propriétés antimicrobiennes de la couche cornée sont aussi liées à son pH. Les bactéries pathogènes préférant un environnement neutre, le pH acide de l'épiderme favorise la croissance des bactéries non pathogènes normalement résidentes de notre peau (*Korting et al, 1990*). Le pH influence également sur la composition lipidique de la couche cornée et son organisation.

Cependant de nombreux facteurs de stress peuvent perturber la perméabilité de cette barrière. L'âge, le stress psychologique, les radiations et l'humidité ou à contrario un

environnement trop sec sont autant de facteurs qui augmentent les risques de développer une maladie de la peau, comme le montre la figure I-4.

La photo-protection est également un rôle important. Le rayonnement solaire active la synthèse de la mélanine au niveau des mélanocytes. Ce pigment naturel foncé transféré aux kératinocytes est responsable du bronzage.



**Figure I-4 : Facteurs de stress et perte hydrique.** Facteurs de stress cutané (droite) et répartition par organe des pertes en eau de l'organisme (gauche) en condition normales (20°C), soumis à une augmentation de la température ambiante ou en cas d'exercice prolongé. Les pertes insensibles représentent l'évaporation au niveau de la peau et des voies respiratoires. *D'après Elias, 2004 et Devuyst, 1998.*

La première étape de la synthèse de la vitamine D à lieu dans l'épiderme, les UV-B cassent la molécule de cholestérol qui s'isomérisent spontanément en vitamine D3. En facilitant l'absorption du calcium au niveau intestinal, en aidant à sa fixation sur les os et à son excrétion au niveau rénal, la vitamine D joue un rôle primordial dans le métabolisme calcique. On considère qu'avec un minimum d'exposition (15 à 30 minutes par jour), l'essentiel de la vitamine D (50 à 90 %) est produit par la peau. De plus la vitamine D obtenue par l'exposition au soleil reste présente durant les deux mois suivant l'exposition grâce à des réserves faites par l'organisme.

Enfin avec ses nombreuses annexes, l'épiderme joue également un rôle dans la régulation thermique de l'organisme :

La sueur sécrétée par les glandes sudoripares permet de refroidir le corps humain en dissipant la chaleur par évaporation. Un gramme de sueur évaporée évacue environ 580 calories.

Le follicule pileux formé suite à l'invagination de l'épiderme est en relation avec un petit muscle lisse, le muscle arrecteur. Ce muscle réagissant au froid permet en redressant le poil de produire de la chaleur.

Quant aux glandes sébacées, la production de sébum mélangée à la sueur crée un fin film lipidique protégeant la peau du dessèchement et des pathogènes, en l'acidifiant.

## **1.C. LES KERATINOCYTES**

### **1.C.a. Présentation**

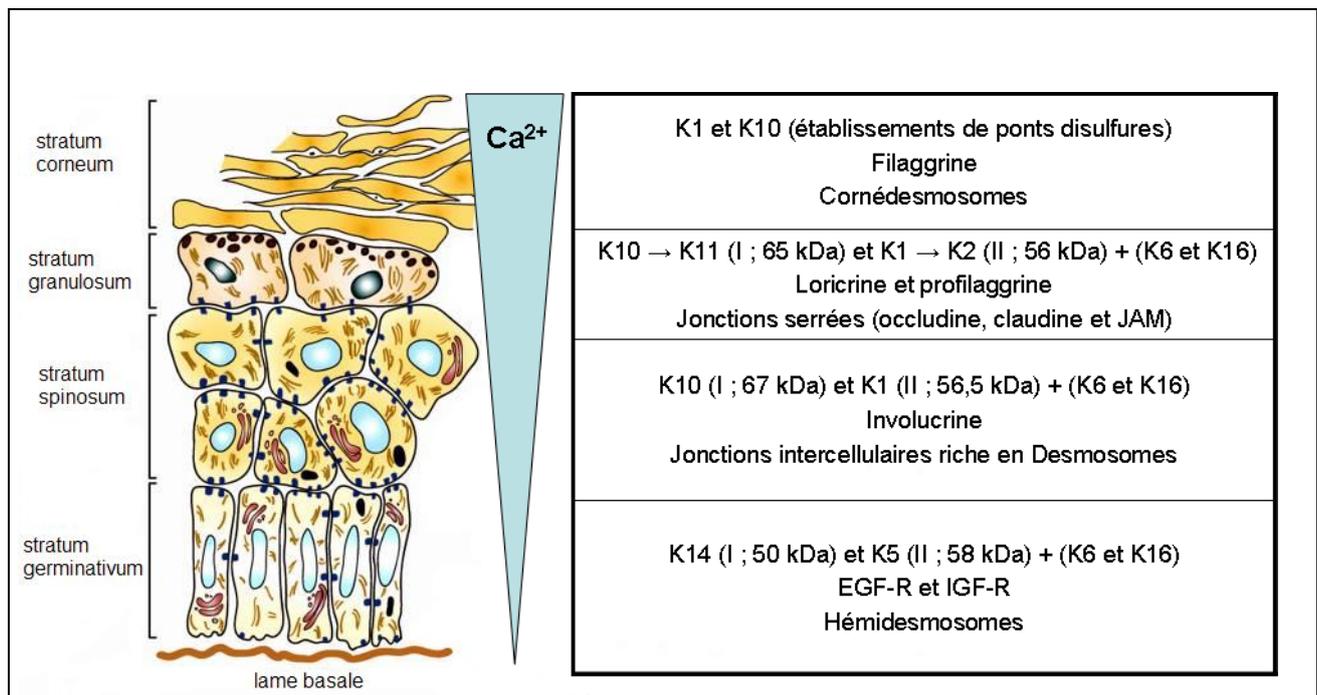
Les kératinocytes apparaissent au cours du développement embryonnaire, ils ont pour origine l'ectoderme superficiel. C'est par un processus constant de prolifération, de différenciation et enfin de sénescence que les kératinocytes assurent le renouvellement permanent de l'épiderme (*Fuchs, 2008*).

Tous les kératinocytes synthétisent des kératines, des polypeptides formant des filaments intermédiaires. Les kératines ont un rôle dans le maintien de la structure des kératinocytes. Les kératines exprimées diffèrent en fonction des couches et sont donc de fait des marqueurs de l'état de différenciation des kératinocytes. Les kératines sont divisées en deux familles, les kératines acides de type I (K10-K20) et les kératines neutres ou basiques de type II (K1-K9). Reconstituées *in vitro* les kératines s'assemblent en hétéropolymère composé d'une kératine acide pour une kératine basique de poids moléculaire semblable.

Les kératinocytes expriment également d'autres protéines utilisées comme marqueur de leur état de différenciation (*Candi et al, 2005 et Hitomi, 2005*). L'involucrine, une protéine à large hélice  $\alpha$  flexible, est l'un des principaux précurseurs de l'enveloppe cornée. Elle est retrouvée en quantité abondante dans les cellules du stratum spinosum. La filaggrine est une petite protéine de 35kDa. Elle est stockée dans les granules de kératohyaline sous forme de polymère (profilaggrine). Dans la couche cornée, elle lie les kératines entre elles pour former l'enveloppe cornée. La loricrine est synthétisée au niveau de la couche granuleuse au cours de la cornéification. Elle représente entre 70 et 85% en masse des protéines totales de la couche cornée. Insoluble, elle lie les protéines de l'enveloppe cornée entre-elles.

On peut également citer comme marqueur de l'état de différenciation des kératinocytes, les nombreuses protéines de jonction qu'ils expriment. On retrouve au niveau de la couche basale des hémidesmosomes, qui permettent le rattachement des

kératinocytes à la lame basale. La couche épineuse est quant à elle très riche en desmosomes. Les jonctions serrées au niveau de la couche granuleuse assurent l'étanchéité de l'épiderme et préviennent la perte en eau. Elles constituent un rapprochement étroit et localisé des membranes de deux cellules voisines qui limite considérablement le passage des solutés par l'espace intercellulaire (barrière paracellulaire). La jonction est due à des interactions homophiles qui concernent plusieurs molécules d'adhérence. La première est l'occludine, une protéine transmembranaire d'un poids de 64 kDa. L'occludine est constituée d'une chaîne polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane. La deuxième est la claudine, protéine transmembranaire d'un poids de 22 kDa, qui est également constituée d'une chaîne polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane. La troisième est appelée JAM (Junctional Adhesion Molecule), c'est une protéine d'un poids moléculaire de 33 kDa et dont la chaîne polypeptidique traverse la membrane une seule fois. Dans les kératinocytes, les jonctions serrées sont abondantes et la diffusion de molécules marquées, administrées en injection sous cutanées, est stoppée au niveau des jonctions serrées du stratum granulosum, témoignant du rôle joué par ces jonctions dans l'imperméabilité de l'épiderme.



**Figure I-5. Marqueurs de différenciation exprimés par les kératinocytes.** De la lame basale à la couche cornée. Les kératines K6 et K16 ne sont exprimées que lors de processus d'hyperprolifération induit par une blessure de l'épiderme ou une maladie tel que le psoriasis. *Adapté de Fuchs, 2008.*

### 1.C.b. Les facteurs de prolifération et de différenciation

Parmi les facteurs contrôlant et stimulant la prolifération cellulaire nous pouvons citer les facteurs de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), qui partagent la même cible cellulaire au niveau de kératinocytes basaux, le récepteur à tyrosine kinase de l'EGF (EGF-R). Ce récepteur activé induit des signaux de survie et de prolifération, par l'activation des voies PI3K/Akt, MAPK et JAK/STAT (Müller *et al*, 2008). Des travaux ont montré une augmentation du niveau d'expression de l'EGF-R dans les épidermes tumoraux. De même le TGF $\alpha$  est surexprimé lorsque les kératinocytes sont en hyperprolifération, comme dans le cas d'un psoriasis. Les effets de la vitamine A sur la peau sont connus et utilisés en dermatologie depuis longtemps (Sullivan *et al*, 1940). Elle possède un effet inhibiteur sur la différenciation et augmente la prolifération des kératinocytes. La vitamine A se lie à l'intérieur de la cellule à une protéine porteuse (CRBP, Cellular Retinol-Binding Protein). Elle est alors soit stockée sous forme d'ester soit utilisée sous forme d'acide rétinoïque. Les gènes régulés par la vitamine A et les mécanismes d'action ne sont pas tous connus (Adams *et al*, 2007 et Pasonen-Seppänen *et al*, 2008). Elle empêche notamment la diminution de l'expression de p63, un facteur de transcription impliqué dans la prolifération des kératinocytes basaux (Bamberger *et al*, 2002). La vitamine A empêche également la formation de filaggrine et de loricrine qui interviennent dans la formation de l'enveloppe cornée des cornéocytes (Hohl *et al*, 1991).

Parmi les facteurs stimulant la différenciation, on distingue le TGF $\beta$ . Il inhibe la prolifération cellulaire et assure la sortie du cycle cellulaire. Son effet est réversible et s'exerce à de très faibles concentrations, de l'ordre du picomolaire. Le TGF $\beta$  est exprimé de manière constitutive par les kératinocytes mais nécessite d'être activé pour pouvoir se lier à son récepteur. Il est surexprimé au niveau des couches suprabasales et induit l'expression des marqueurs de différenciation tels que les kératines K1 et K10. A plus forte concentration, il induit l'expression des kératines K6 et K16.

La vitamine D exerce également un effet antiprolifératif sur les kératinocytes (Bikle *et al*, 2004). La vitamine D a un effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN (Smith *et al*, 1986). Elle joue également un rôle dans la différenciation en cornéocyte, par la stimulation de l'activité de la transglutaminase, une enzyme impliquée dans la formation de l'enveloppe cornée. Elle favorise également l'expression d'involucrine (Smith *et al*, 1986 et Bikle *et al*, 1991 et 1993). De récentes études ont montré que la vitamine D jouait un rôle modulateur important dans la différenciation des kératinocytes, notamment en activant des éléments

clefs de la voie de signalisation du calcium, tel que le récepteur au calcium (*Bikle et al, 2004*). De plus elle permet de maintenir in vivo le gradient de calcium, l'élément clef de la différenciation des kératinocytes.

Le contact cellulaire en culture est également un phénomène de régulation de la différenciation. En culture cellulaire, les kératinocytes à confluence continuent de se diviser tout en se resserrant, ils commencent alors à exprimer des marqueurs de cellules différenciées. Cependant la différenciation n'est pas complète, il faut pour cela augmenter la concentration en calcium du milieu de culture. Les kératinocytes expriment alors des marqueurs de fin de différenciation (Kératine K1 K2, filaggrine, loricrine, involucrine). Enfin en coculture, les mélanocytes inhibent la prolifération des kératinocytes par contact (*Deveci et al, 2001*).

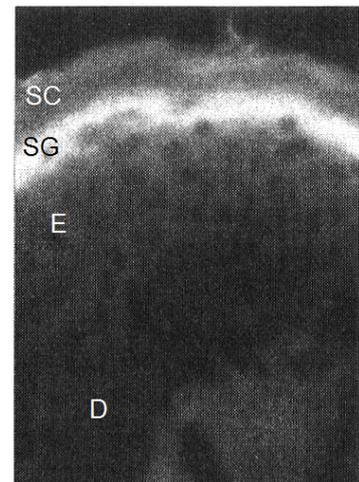
### **1.C.c. Le rôle du Calcium**

Le calcium joue un rôle majeur dans la différenciation cellulaire. Comme on peut le voir sur la figure I-6, le calcium est plus concentré au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. L'effet in vitro du calcium sur des cultures de kératinocytes est bien documenté (*Hennings et al, 1980 et Boyce et al, 1983*). En présence d'une faible concentration calcique (0,05mM), une culture primaire de kératinocytes montre des propriétés de cellules basales et prolifère. L'augmentation de la concentration en calcium (1,5 à 2 mM) stoppe alors la croissance des cellules et induit l'expression de marqueurs de différenciation. Leur morphologie se rapproche alors de celle des kératinocytes observés dans un épiderme natif.

Le calcium intervient également dans la formation de la couche cornée des cornéocytes (*Nemes et al, 1999*). Le calcium est impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire de la couche cornée (*Menon et al, 1994*) et l'ajout de calcium en culture augmente la synthèse des céramides (*Watanabe et al, 1998*).

De nombreuses maladies sont liées à une distribution anormale du calcium dans l'épiderme, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique (*Missiaen et al, 2000*). La maladie génétique de Darier est due à la mutation d'une protéine servant de pompe à calcium intracellulaire. Cette maladie induit une hyperprolifération des kératinocytes, une kératinisation anormale, ainsi qu'une perte d'adhésion entre les cellules. La maladie de Hailey-Hailey est une maladie génétique bénigne touchant également une ATPase calcique. Cette maladie conduit elle aussi à une perte d'adhérence entre les cellules.

Strate	Localisation du calcium	Structure marquée
Couche basale	Intracellulaire, concentration faible	Mitochondries, noyau, cytosol
Couche épineuse	Intracellulaire, concentration très faible	Mitochondries
Couche granuleuse inférieure	Extracellulaire, concentration élevée	Noyau, mitochondries, corps lamellaires
Couche granuleuse intermédiaire	Extracellulaire, parfois intracellulaire, concentration élevée	Mitochondries, corps lamellaires
Couche granuleuse supérieure	Extracellulaire et intracellulaire, concentration élevée	Mitochondries, corps lamellaires, cytosol
Interface couche granuleuse / couche cornée	Extracellulaire, concentration élevée	corps lamellaires sécrétés
Couche cornée	Intracellulaire et extracellulaire, concentration faible	-

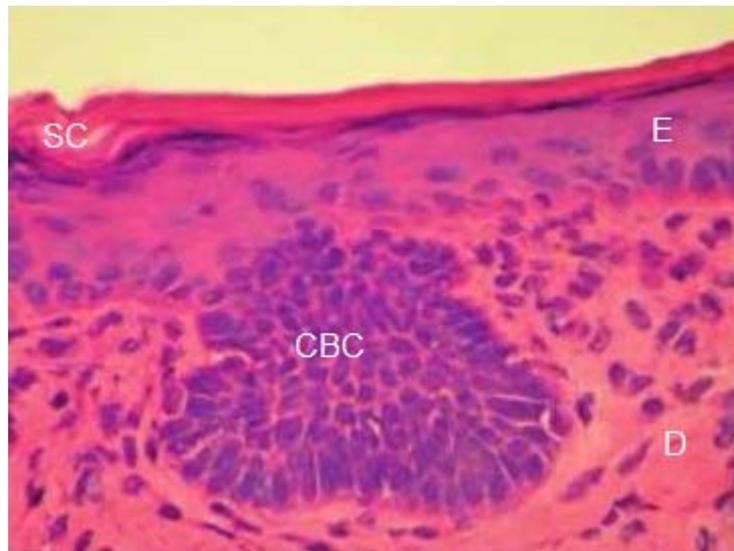


**Figure I-6. Répartition du calcium dans l'épiderme.** A gauche, localisation intracellulaire et extracellulaire du calcium au niveau de chaque couche de l'épiderme. A droite distribution du calcium marqué avec du Calcium Green I. D, derme ; E, épiderme ; SG, stratum granulosum ; SC, stratum corneum. D'après Menon et al, 1985 et Denda, 2000.

### 1.C.d. Dérèglement : Kératocarcinomes basaux et spineux

Les carcinomes basocellulaires sont les cancers les plus fréquents chez les individus à peau claire. On estime que près de trente pour cent des personnes de ce groupe seront affectées au cours de leur vie. Si le rayonnement ultra-violet fait figure de principal facteur conduisant à la formation de tumeurs basocellulaires, la corrélation entre les conditions d'exposition au rayons UV (quantité, durée, et spectre UV) et l'incidence de ces tumeurs n'est pas clairement établie (Reichrath, 2006).

Les tumeurs se développent à partir de la couche basale de l'épiderme, au niveau du visage, de la tête, du torse et des membres inférieurs, jamais au niveau des muqueuses. Elles peuvent prendre de nombreuses formes. L'examen histologique montre un massif de cellules ressemblant aux kératinocytes basaux. La bordure des amas est palissadique, la tumeur bien délimitée siège dans le derme (fig. I-7). En l'absence de traitement, la tumeur se développe assez rapidement et peut recouvrir une grande surface de peau. Le traitement consiste essentiellement en une exérèse chirurgicale. Il existe des traitements alternatifs, la radiothérapie locale, la cryochirurgie et la photothérapie, mais leur efficacité est moindre. Le taux de survie après traitement dépasse les 95%. Le développement de métastases est très rare avec un taux compris entre 0,0028% et 0,1%.



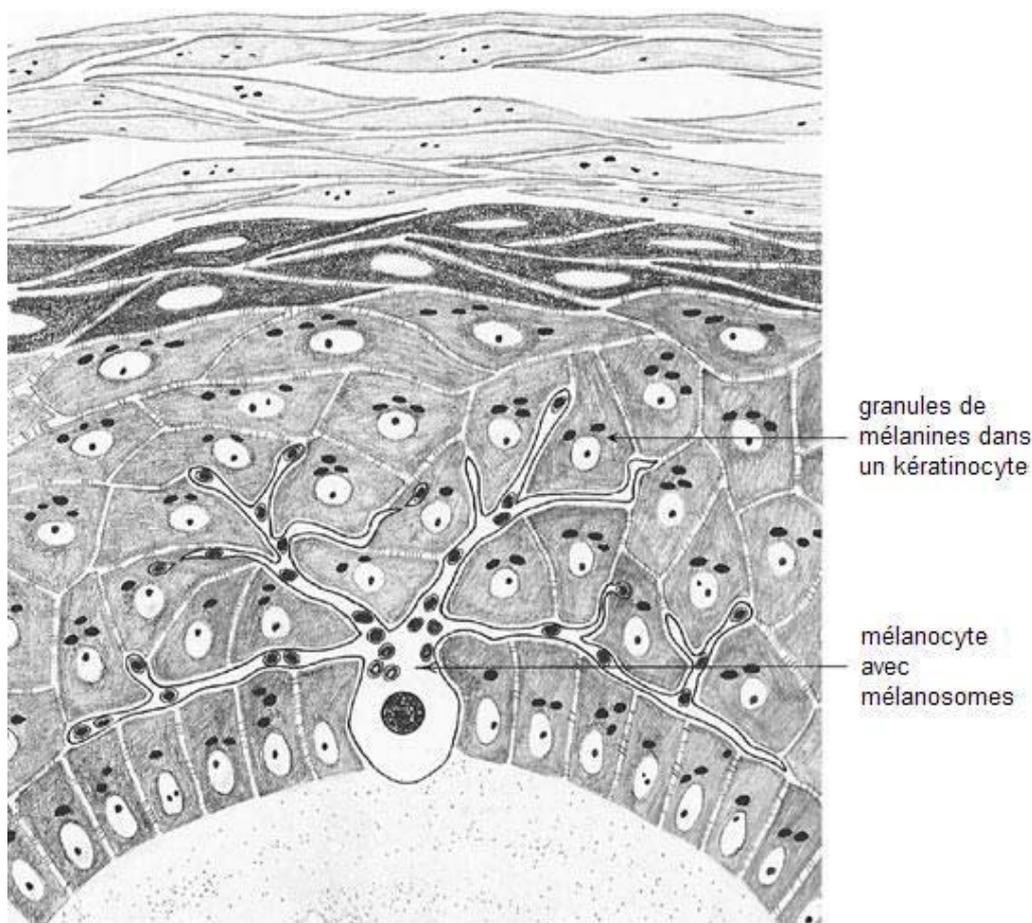
**Figure I-7. Carcinome basocellulaire.** Cytochimie sur coupe d'épiderme présentant un carcinome basocellulaire. D, derme ; E, épiderme ; SC, stratum corneum ; CBC, carcinome basocellulaire. *D'après Nouri et al, 2007.*

Les carcinomes spinocellulaires sont des cancers fréquents survenant principalement chez le sujet âgé. Les tumeurs se développent au niveau de la peau, des muqueuses et prédominent sur les zones découvertes. Plus superficiels que les carcinomes basocellulaires, les tumeurs peuvent métastaser. L'exposition répétée aux rayonnements UV est la principale cause de survenue de la maladie. Ce n'est cependant pas la seule, puisque des tumeurs peuvent apparaître chez des sujets atteints par le papillomavirus, le virus de l'immunodéficience humaine ou encore affectés d'ulcères chroniques. Il existe de nombreux types différents de carcinomes spinocellulaires et les tumeurs ont une forme et une apparence très variables. La forme la plus fréquente est la forme ulcéro-bourgeonnante. Après une période d'extension horizontale, l'envahissement se fait ensuite en profondeur, jusqu'à l'os sous-jacent. L'examen histologique montre un bouleversement au niveau de la structure de l'épiderme, avec des kératinocytes de tailles variables souvent géants et des noyaux de tailles différentes. Les traitements sont similaires à ceux du carcinome basocellulaire. Le pronostic est bon, mais en cas d'extension métastatique, il est beaucoup plus réservé puisque la survie est inférieure à 20 % à 10 ans.

## 1.D. LES MELANOCYTES

### 1.D.a. Présentation

Les mélanocytes sont les cellules responsables de la pigmentation de l'épiderme via la synthèse de mélanine. Les mélanocytes dérivent de précurseurs les mélanoblastes. Au cours du développement embryonnaire les mélanoblastes se différencient et migrent de la crête neurale vers l'épiderme (*Yamaguchi et al, 2007*).



**Figure I-8. Représentation schématique d'un mélanocyte au sein de l'épiderme.**  
*Adapté de Ackerman et al, 2002–2006.*

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques qui sont localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ils sont répartis de manière uniforme avec un ratio d'un mélanocyte pour dix kératinocytes basaux. Cette proportion reste constante quelle que soit la couleur de la peau. Les différences de couleur ne sont dues qu'à la quantité de mélanine synthétisée et transférée aux kératinocytes. Cependant il semblerait que le pH et

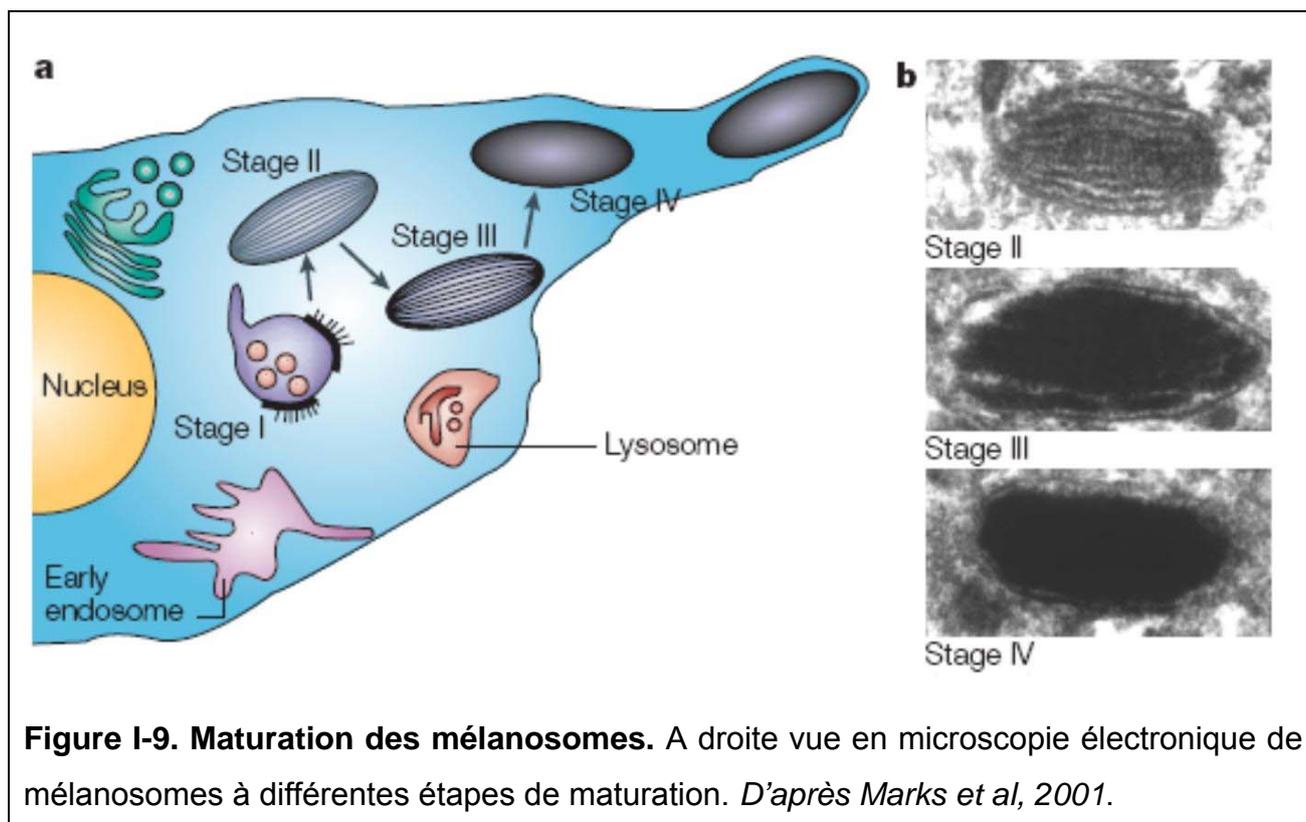
l'état de la couche cornée soient liés à la couleur de la peau (*Gunathilake et al, 2009*). Les mélanocytes sont également responsables de la coloration des yeux, des poils et des cheveux. Les mélanocytes sont présents au niveau de l'oreille interne et bien que cela ne soit pas dû à la synthèse de mélanine, jouent également un rôle au niveau de l'ouïe. Les dendrites des mélanocytes comme le montre la figure I-8, sont orientées vers les couches supérieures de l'épiderme. La mélanine est synthétisée au niveau des mélanosomes. Ce sont des organites apparentés aux lysosomes. Les mélanosomes sont transportés le long des dendrites et la mélanine est ensuite transférée aux kératinocytes. Le mécanisme exact de ce transfert n'est pas encore compris. Un mélanocyte produit et distribue ainsi de la mélanine pour approximativement 40 kératinocytes suprabasaux

### **1.D.b. Mélanogénèse**

La mélanine est le pigment naturel de la peau qui confère une protection contre le rayonnement UV notamment en protégeant l'ADN du stress oxydatif induit par les UV (*Miyamura et al, 2006*). C'est une macromolécule synthétisée par une voie biochimique appelée mélanogénèse (*Lin et Fisher, 2007*). La mélanine est un assemblage de monomères différents. La couleur de la peau est traditionnellement définie par la classification de Fitzpatrick (de phototype I, peau très claire à phototype VI, peau noire). La couleur de la peau dépend principalement de la concentration en deux types de pigments l'eumélanine et la phaeomélanine (*Thody et al, 1991 et Ancans et al, 2001*). L'eumélanine est de couleur brun noir tandis que la phaeomélanine est de couleur rouge jaune.

Le processus peut être divisé en une partie structurale et une partie biochimique. La partie structurale consiste en la formation et la maturation du mélanosome dans lequel a lieu la partie biochimique, la synthèse de la mélanine à partir de la L-tyrosine. La partie structurale est divisée en 4 étapes correspondant à 4 états de maturation différents des mélanosomes (stage I à stage IV, figure I-9) (*Raposo et al, 2002 et 2007*). Le prémélanosome de type I présente de nombreuses membranes internes. La protéine spécifique des mélanocytes, PMEL17, est localisée au niveau des membranes du prémélanosome. Elle est alors clivée en deux parties, M $\alpha$  et M $\beta$ . Ce sont les parties M $\alpha$  localisées à l'intérieur du prémélanosome qui vont s'associer pour former les fibrilles lâches visibles dans le prémélanosome de type II. Dans le type III, les fibrilles se sont organisées en fibres qui structurent le mélanosome. Ce sont sur ces fibres que la mélanine est synthétisée et déposée, c'est pour cela qu'elles apparaissent plus sombres à

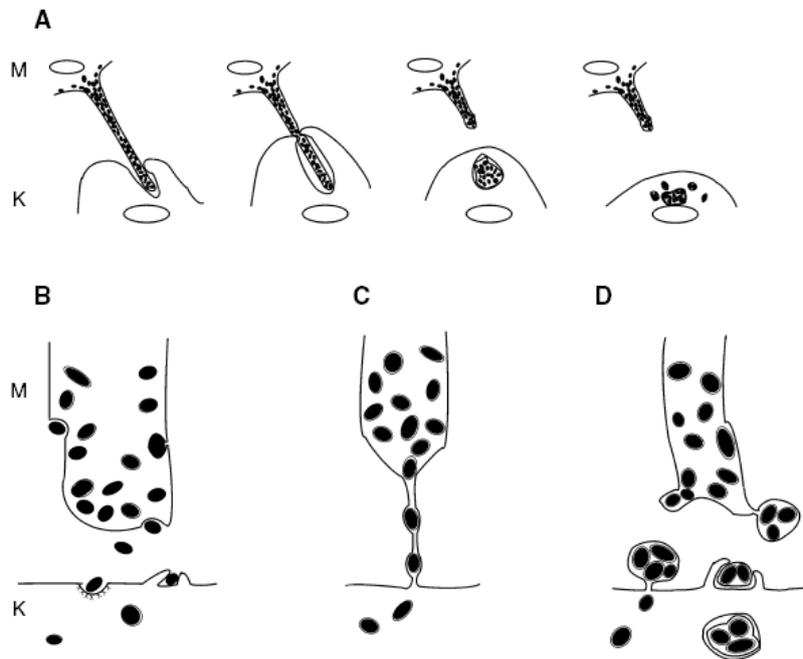
l'observation en microscopie. Dans le mélanosome de type IV, les fibres sont tellement recouvertes par la mélanine que le mélanosome entier paraît noir.



Dans la partie biochimique, trois enzymes sont impliquées dans la synthèse de la mélanine, la tyrosinase et deux protéines apparentées (TRP1 et TRP2 ; Tyrosinase related protein 1 et 2). La tyrosinase est l'enzyme limitante, elle intervient plusieurs fois au cours de la mélanogénèse. Elle possède une activité tyrosine hydroxylase et DOPA oxydase (DOPA ; 3,4-DihydroxyPhénylAlanine). La mélanogénèse peut être divisée en plusieurs étapes successives (Tobin, 2006). La L-tyrosine est tout d'abord transformée en L-DOPA par la tyrosinase puis en dopaquinone. L'eumélanine est obtenue par polymérisation et cyclisation de la dopaquinone. Cette voie de synthèse fait intervenir TRP2 puis TRP1 via la formation d'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA).

Une deuxième voie existe en parallèle faisant intervenir la tyrosinase via la formation de 5,6-dihydroxyindole (DHI). Ces deux voies déterminent la couleur de la mélanine, noire si le mélange est riche en DHI, brune s'il est riche en DHICA. La phaeomélanine est obtenue après ajout d'une cystéine à la dopaquinone, pour former la cystéinyle-DOPA et de multiples étapes d'oxydation. L'assemblage de monomères d'eumélanine et de phaeomélanine forme la mélanine. La régulation de la mélanogénèse fait intervenir de nombreuses molécules (Slominski et al, 2004) qui ont un effet activateur

ou répresseur. Parmi les éléments activateurs, nous pouvons citer la mélanocortine qui est synthétisée par les kératinocytes sous l'action des UV, certaines cathécolamines comme la DOPA, les hormones stéroïdes (testostérone et œstrogène) et la vitamine D. On trouve comme éléments inhibiteurs de la mélanogénèse, la mélatonine, les facteurs de croissance TNF $\alpha$  et  $\beta$  et la vitamine E.



**Figure I-10. Quatre hypothèses pour expliquer le transfert des mélanosomes aux kératinocytes.** A ; une dendrite du mélanocyte est phagocytée par le kératinocytes. B ; exocytose des mélanosomes puis endocytose ou phagocytose par les kératinocytes. C ; formation d'une liaison fine entre kératinocyte et mélanocyte permettant le passage des mélanosomes. D ; exocytose de corps multivesiculaires contenant plusieurs mélanosomes et phagocytose par les kératinocytes. M, mélanocytes ; K, kératinocytes. *D'après Van Den Bossche et al, 2006.*

La mélanine est ensuite transférée aux kératinocytes. Bien que le mode de transfert ne soit pas encore connu, plusieurs hypothèses (fig. I-10) ont été avancées mettant en jeu des mécanismes de phagocytose ou d'exocytose (*Van Den Bossche et al, 2006*). Les expériences menées *in vitro* avec des cocultures de mélanocytes et de kératinocytes aboutissent à des conclusions différentes en fonction des méthodes de culture et de visualisation employées (*Berens et al, 2005*). *In vivo*, les dendrites des mélanocytes extrêmement fins s'infiltrant entre les kératinocytes des couches supérieures de l'épiderme rendant l'étude du transfert des mélanosomes particulièrement difficile. Les

techniques de microscopie optique n'ont pas la résolution suffisante et les observations faites en microscopie électronique se font sur une surface si petite et fine d'épiderme que la visualisation de ce phénomène particulier est extrêmement rare. Pourtant l'utilisation de marqueurs membranaires au niveau de la membrane plasmique permettrait une meilleure visualisation. De même l'utilisation de coupes épaisses en microscopie électronique telle que nous la pratiquons dans le laboratoire permettrait l'étude de ce transfert et de faire sa reconstruction tridimensionnelle par tomographie.

### **1.D.c. Dérèglement : le mélanome**

Le mélanome est un cancer de la peau, issu des mélanocytes. Il existe toutefois des mélanomes de l'œil (mélanome choroïdien), des muqueuses (bouche, canal anal, vagin) et plus rarement encore des organes internes. La présence d'une kératose solaire favorise la survenue de ce cancer. La brûlure solaire, en particulier dans l'enfance, et les antécédents familiaux sont les principaux facteurs de risque. Bien qu'il puisse apparaître partout, le mélanome a tendance à se former sur les parties du corps qui sont couvertes dans la vie quotidienne mais exposées occasionnellement lors des bains de soleil, comme le torse et les jambes. La couleur de la peau joue également un rôle important : le risque est plus que doublé chez les roux et très sensiblement augmenté chez les personnes avec peau pâle. Il est plus de dix fois moins important chez les personnes de phototype élevé.

Le mélanome peut se former sur un grain de beauté préexistant de type *nævus* ou dans près de trois quarts des cas *de novo*. Il se manifeste d'abord comme une simple tache pigmentée. Après une phase d'extension horizontale, le mélanome plonge vers les couches profondes de la peau et à partir de là, peut métastaser vers les ganglions lymphatiques ou les organes internes (poumons, os, foie, cerveau). Les capacités exceptionnelles de métastase du mélanome sont dues à la réactivation lors de la cancérisation d'un gène nommé *slug* (Gupta et al, 2005). Ce gène codant pour un facteur de transcription intervient lors de la migration au stade embryonnaire des mélanoblastes de la crête neurale vers l'épiderme. Seule l'exérèse totale de la lésion initiale permet de guérir le mélanome. Au stade initial d'extension superficielle, le pronostic approche les 100% de survie à 10 ans.

## 2. LES AQUAPORINES

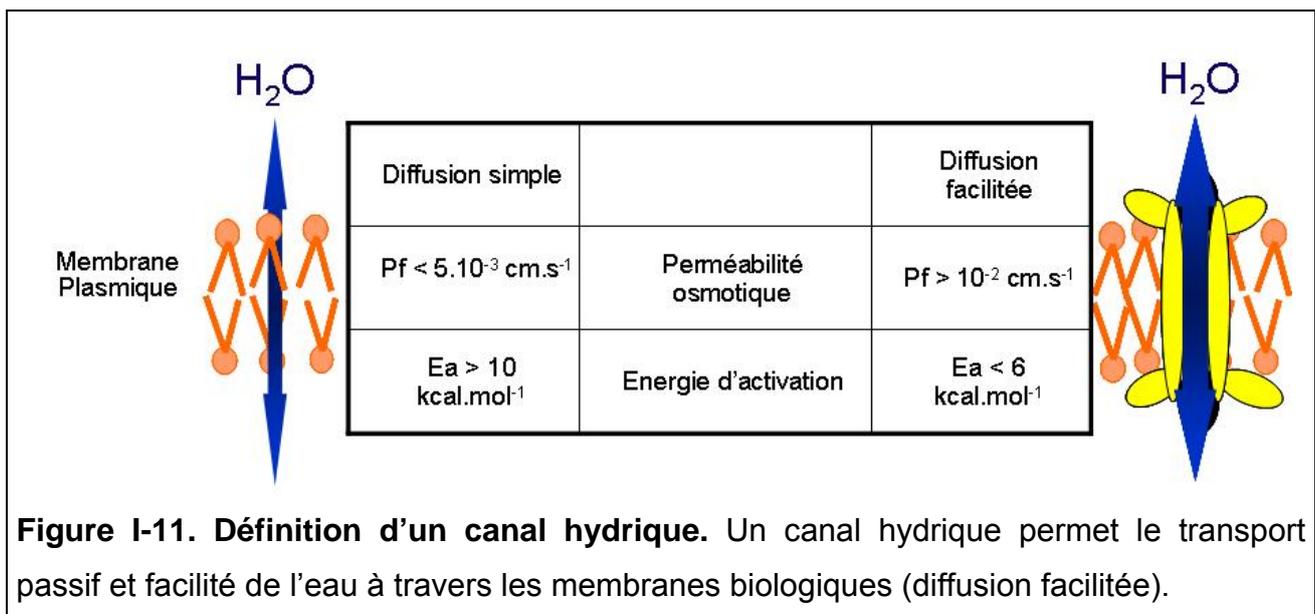
Les aquaporines sont des petites protéines transmembranaires permettant le passage sélectif et facilité de l'eau et du glycérol à travers les membranes biologiques.

### 2.A. AQUAPORINE 1 : AQUAPORINE ARCHETYPE

#### 2.A.a. De la perméabilité hydrique...

Les membranes cellulaires sont des structures complexes principalement lipidiques qui délimitent les cellules et les organites intracellulaires.

La perméabilité d'une membrane est définie par sa perméabilité diffusionnelle ( $P_d$ ) et sa perméabilité osmotique ( $P_f$ ) (*Friedman, 2008*). La perméabilité diffusionnelle est liée à la diffusion de molécules à travers une membrane en l'absence d'un gradient de concentration. La perméabilité osmotique est mesurée en présence d'un gradient osmotique. La perméabilité d'une membrane équivaut à un débit par unité de surface. On utilise également l'énergie d'activation ( $E_a$ ) qui est l'énergie nécessaire au système pour faire passer une molécule à travers la membrane. Elle est déterminée par la loi d'Arrhenius  $P_f = F * [e^{-(E_a/RT)}]$ . Plus l'énergie d'activation nécessaire pour traverser une membrane est élevée, plus elle est imperméable.



Considérons la membrane plasmique qui délimite les cellules. De part sa structure et sa composition, elle est naturellement hydrophobe. Sa perméabilité osmotique à l'eau

est donc faible ( $P_f < 5 \cdot 10^{-3} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) mais non nulle, et son énergie d'activation élevée ( $E_a > 10 \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Il a longtemps été considéré que le passage de l'eau à travers les membranes lipidique s'effectuait selon le modèle de la diffusion simple (figure I-11).

Considérons maintenant la présence d'un pore au sein de la membrane plasmique. En présence d'un gradient de concentration le nombre de molécules passant à travers la membrane augmente ( $P_f > 10^{-2} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et le coût énergétique diminue ( $E_a < 6 \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). On parle alors de diffusion facilitée.

L'idée de tels canaux permettant le passage de l'eau et de petits solutés au travers des cellules ou à travers des tissus (au niveau de la vessie par exemple) remonte au milieu du 19<sup>ème</sup> Siècle, avec Brücke en 1843, puis Pfeffer en 1877 et enfin Oswald en 1890. (*Von Heijne, 2003*). Mais il faudra attendre 1957 pour que le canal permettant ce passage commence à être caractérisé. Les travaux menés par Solomon ont démontré que l'eau est transportée à travers la membrane de globules rouges de manière rapide ( $10^9$  molécules. $\text{sec}^{-1}$ ) et sélective (*Goldstein et Solomon, 1960*). Ces canaux sont inhibés par le mercure et excluent les ions, comme  $\text{H}_3\text{O}^+$  et les petits solutés. Le diamètre du pore est également estimé entre 3,5 et 4,2Å. L'identité du canal est peu à peu établie. Il s'agit d'une protéine et à la fin des années 1980, sa masse est estimée à 30 kDa. Cependant jusqu'en 1991 l'idée que de tels canaux puissent exister reste controversée.

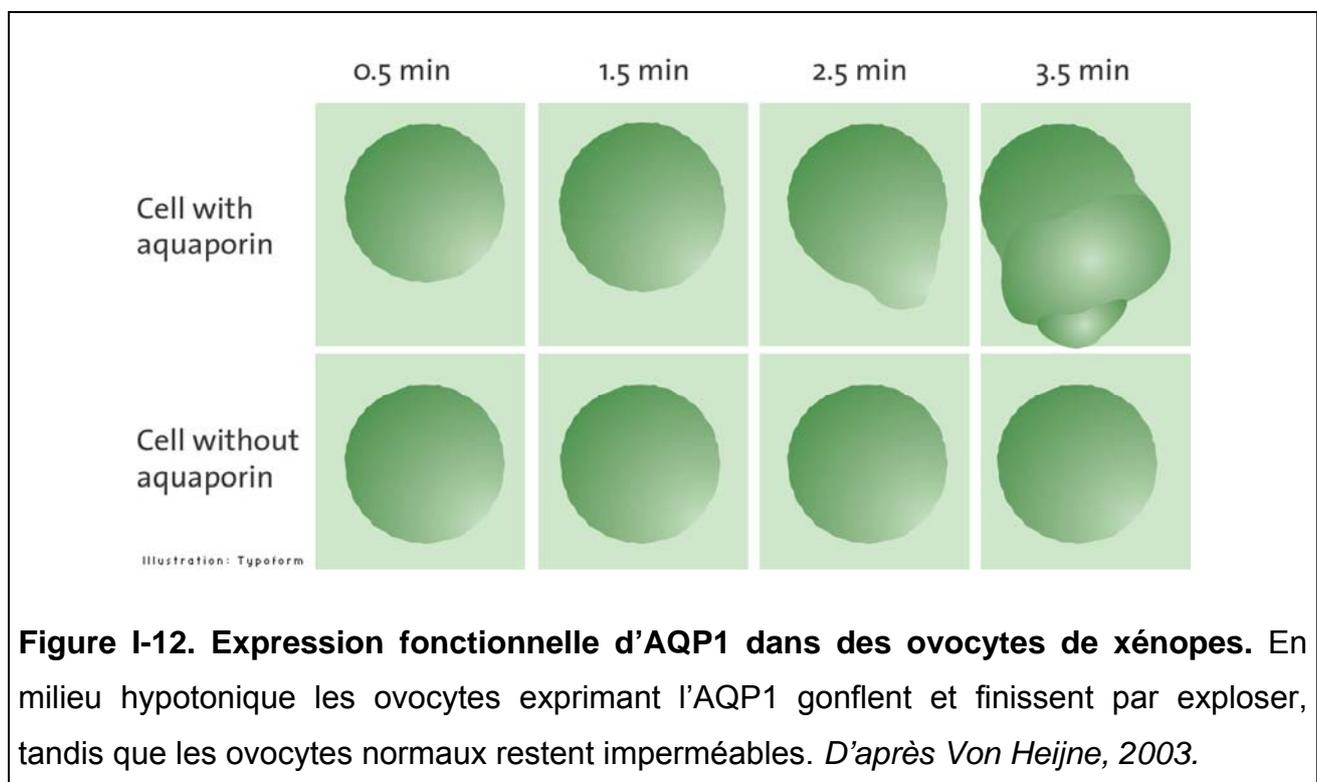
### 2.A.b. ...A l'Aquaporine 1

En 1988 l'équipe de Peter Agre qui étudie les facteurs rhésus isole de manière fortuite une petite protéine membranaire de 28 kDa, fortement exprimée au niveau des érythrocytes (*Denker et al, 1988*). Tout d'abord suspectée de permettre des interactions entre le cytosquelette sous-membranaire et la membrane plasmique, cette protéine est partiellement caractérisée par Preston et Agre en 1991, elle est baptisée CHIP28 (CHannel-like Integral membrane Protein of 28kDa). Il faudra toutefois attendre 1992 pour que sa fonction soit définitivement établie (*Preston et al, 1992 et Zeidel et al, 1992*). Pour ce faire, ils injectent dans un premier temps de l'ARNm codant pour CHIP28 dans des ovocytes de xénopes, naturellement imperméables à l'eau (*Preston et al, 1991*). Les ovocytes ayant subi une injection expriment au niveau de leur membrane plasmique la protéine CHIP28. Plongés dans un milieu hypotonique, ces ovocytes de xénopes se mettent alors à gonfler jusqu'à l'éclatement (fig. I-12).

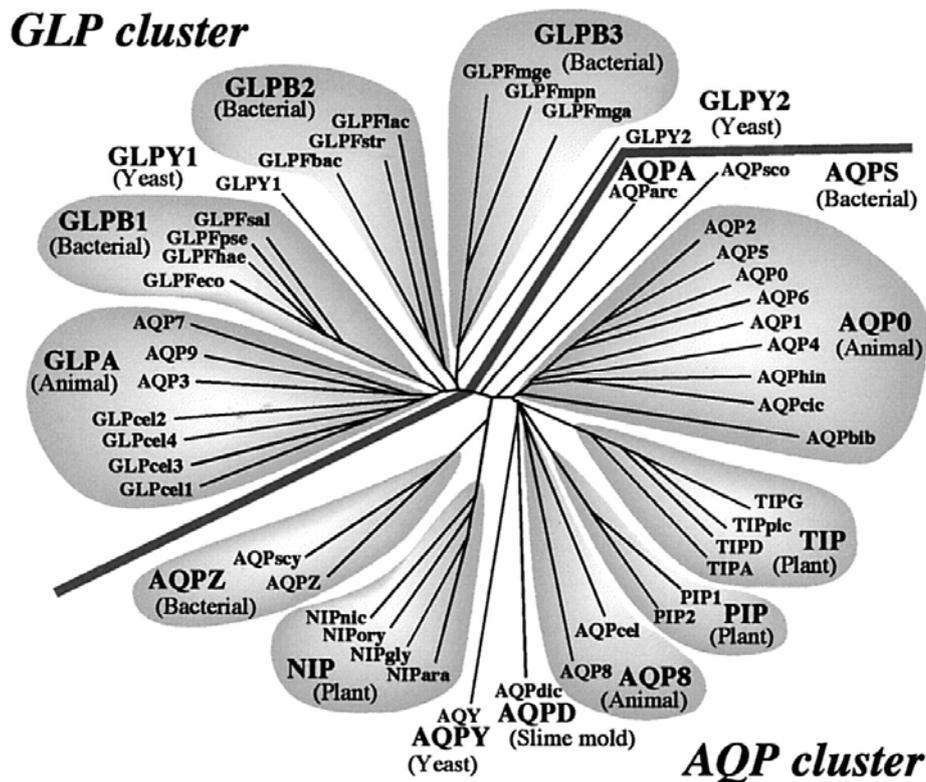
Ce transport est inhibé par le mercure et l'inhibition est réversible. La même année Zeidel et al démontrent le même effet dans des liposomes contenant la protéine CHIP28.

L'énergie d'activation nécessaire est inférieure à  $5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  et la perméabilité par protéine est évaluée à environ 3 milliards de molécules d'eau par seconde. CHIP28 fut le premier canal hydrique caractérisé. Très rapidement de nombreux autres canaux hydriques de la même famille moléculaire furent découverts. Ils furent renommés aquaporines (AQP) et CHIP28 devint alors l'aquaporine 1 (AQP1).

En 2003, Peter Agre reçoit le prix Nobel de chimie pour la découverte et la caractérisation des aquaporines. Les aquaporines font parties de la grande famille des MIP (Major Intrinsic Protein). Les MIP sont fonctionnellement divisées en deux groupes, les transporteurs d'eau, AQP cluster sur la figure I-13 et les transporteurs de glycérol, GLP cluster.



De 1988 à aujourd'hui, 13 aquaporines différentes ont été identifiées chez l'homme. Les aquaporines 1, 2, 4, 5, 6 et 8 ne laissent passer que l'eau. Les aquaporines 3, 7, 9 et 10 permettent le passage sélectif de l'eau et du glycérol, on les appelle également aquaglycéroporines. Les aquaporines 11 et 12, nouvellement décrites, sont pour le moment rangées dans un nouveau groupe, celui des aquaporines subcellulaires (*Ishibashi, 2006*). Du fait de leur récente découverte, peu de données sont disponibles pour définir leur véritable fonction.



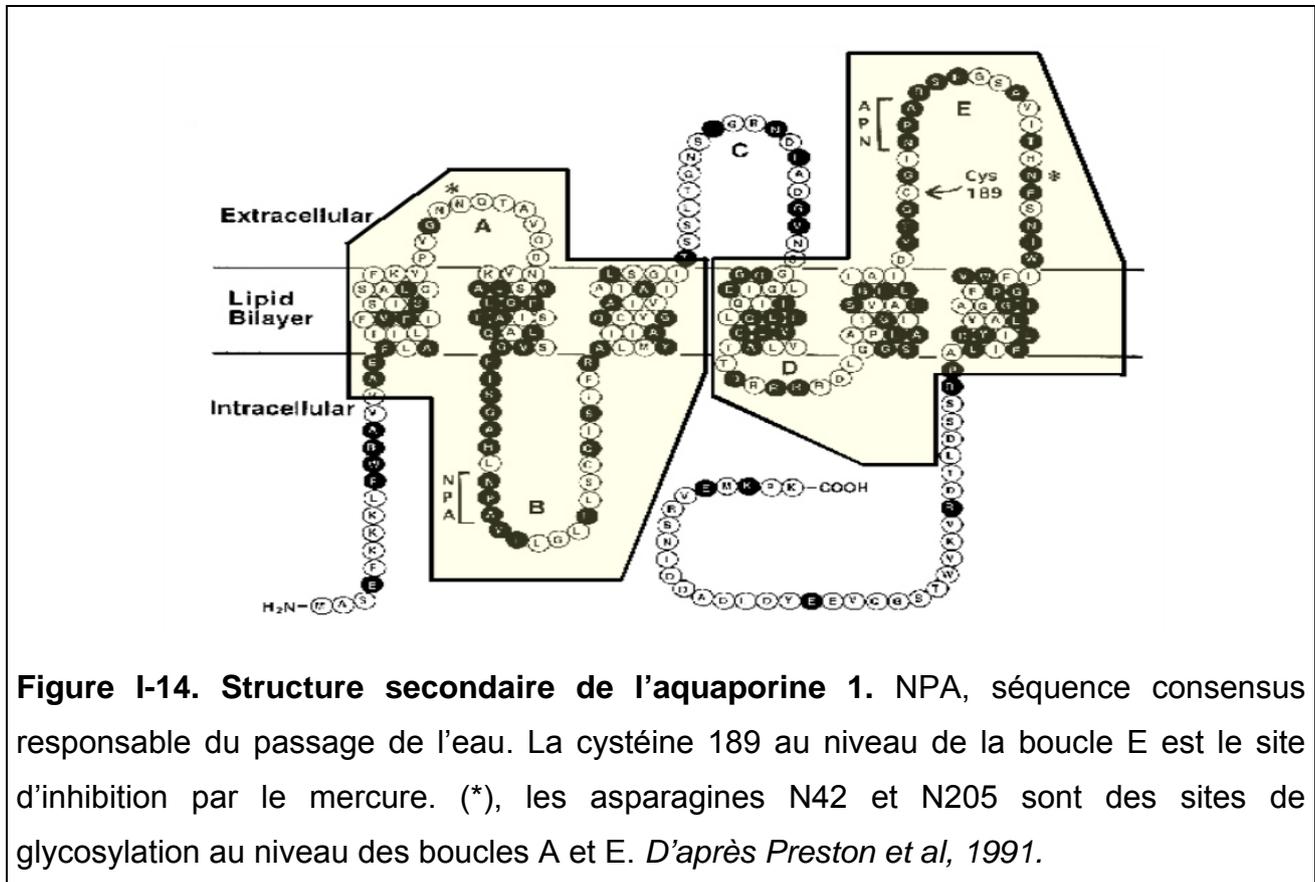
**Figure I-13. Classification phylogénétique des aquaporines.** D'après Heymann et al. (1999)

### 2.A.c. Structure de l'AQP1

La structure des aquaporines est composée de deux domaines répétés résultant de la duplication d'un gène ancestral. Chacun de ces domaines est constitué de 3 hélices  $\alpha$  transmembranaires et d'une séquence de 3 acides aminés : asparagine, proline et alanine (NPA). La très haute conservation de ce double triplet d'acides aminés en fait une des caractéristiques majeures des aquaporines (fig. I-14).

C'est par mutagenèse dirigée qu'ont été mises en évidence l'importance et l'implication de certains acides aminés dans le passage de l'eau. Ainsi les deux séquences NPA sont responsables du passage des molécules d'eau. Tandis que la cystéine 189, proche du motif NPA de la boucle E, est impliquée dans la sensibilité au mercure (Preston et al. 1993, Zhang et al. 1993). Le mercure en se fixant sur cette cystéine obstrue physiquement le pore, empêchant le passage des molécules d'eau. Symétriquement, l'insertion d'une cystéine à la place de l'alanine A73 au niveau de la boucle B confère une sensibilité au mercure, ce résidu étant dans une position similaire à celle de la cystéine C189 (Jung et al, 1994). La structure se replie suivant le modèle du sablier (fig. I-15, Jung et al, 1994). Les boucles B et E sont insérées dans la membrane

plasmique, puis les extrémités N- et C-terminales sont repliées l'une sur l'autre. Ce repliement de la molécule autour des deux structures NPA (point de constriction du pore) forme un canal hydrique fonctionnel. Les molécules d'eau transitent en file indienne à la manière de grains de sable dans un sablier.

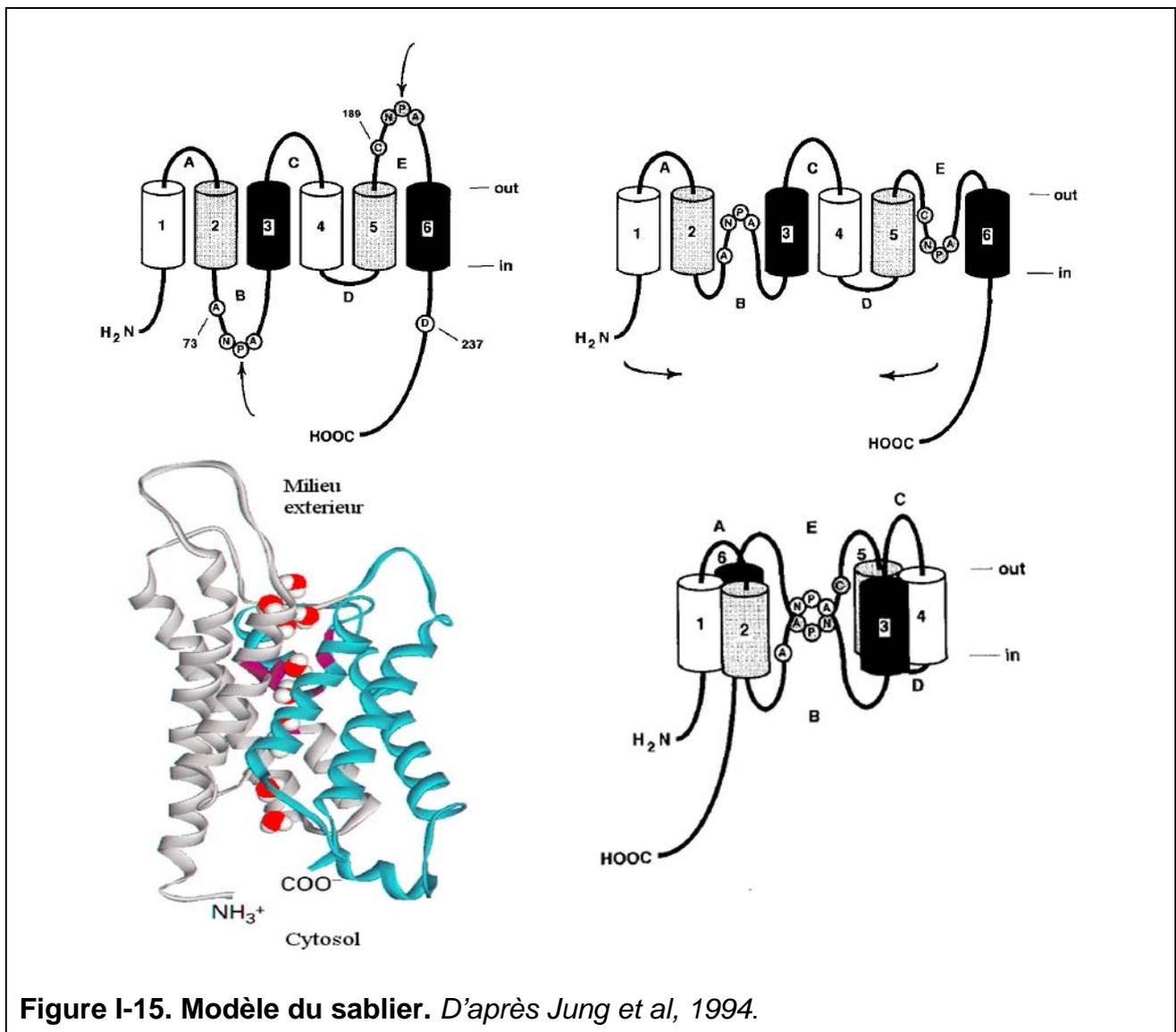


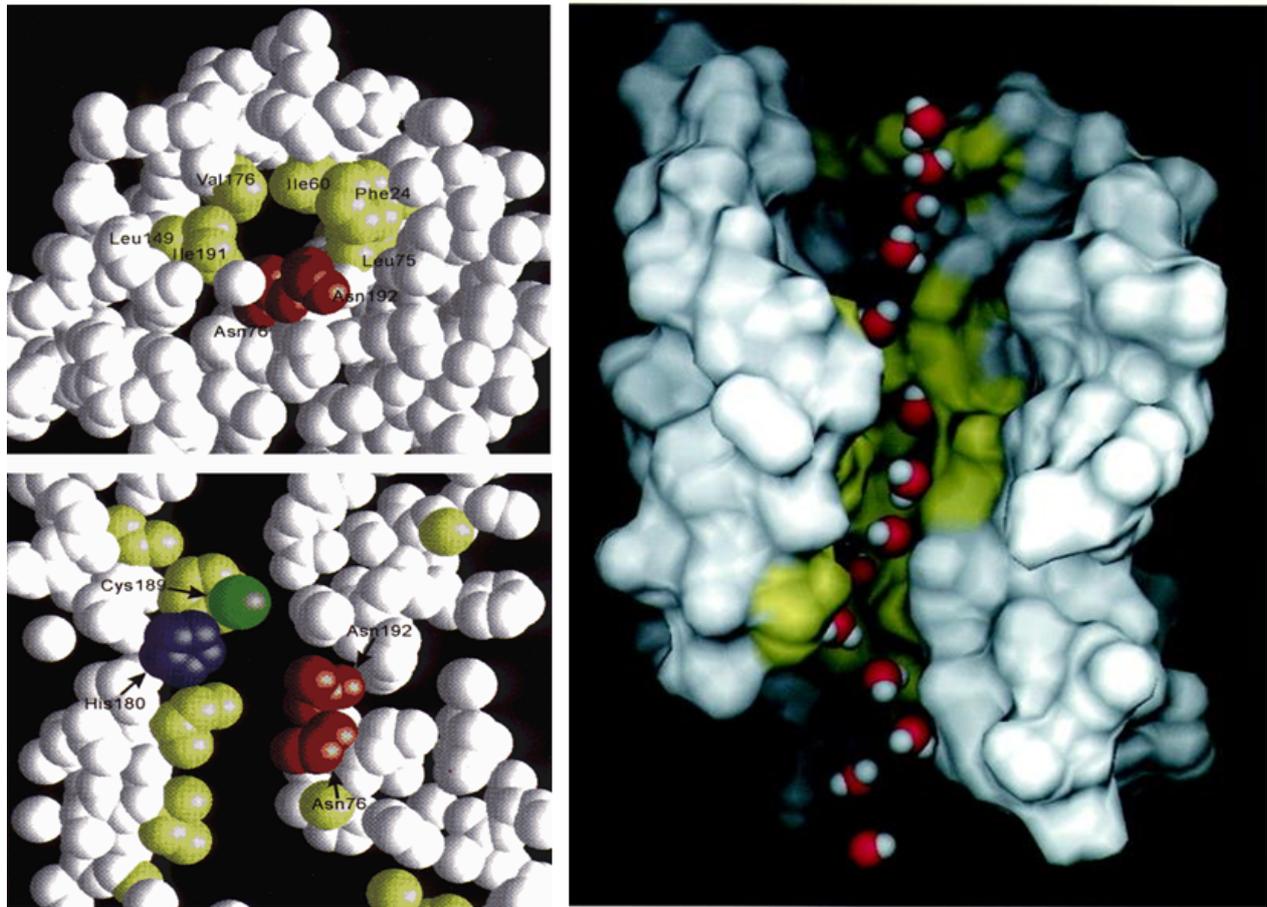
Ce modèle sera confirmé par les nombreuses études cristallographiques menées sur l'aquaporine 1 (Murata et al, 2000, De Groot 2001 et 2003a et 2003b, Ren et al, 2000). Ces études ont permis d'obtenir la structure tridimensionnelle à haute résolution de l'AQP1 (à 2,2Å). Avec la croissance constante de la puissance de calcul en informatique, de nombreuses simulations ont été réalisées pour étudier la dynamique et la sélectivité du passage des molécules d'eau à travers les aquaporines (De Groot 2001, Sui et al 2001, Zhu et al 2001). La figure I-16 montre quelques représentations à l'échelle atomique du cœur de l'aquaporine 1.

Le diamètre du pore passe de 20 Å au niveau de la surface à 2,8 Å au point le plus étroit, soit au niveau de l'histidine 180. De par sa taille, elle limite le passage aux seules molécules d'eau suffisamment petites pour passer. L'arginine 196 située en face (non figurée) du fait de sa charge empêche le passage des ions  $H_3O^+$ . Par le biais de force

électrostatique les structures NPA permettent le passage des molécules d'eau et ce en file indienne. Le cœur hydrophobe de l'aquaporine permet le passage rapide des molécules d'eau en empêchant l'établissement de liaison hydrogène. Un pore plus large permet d'une manière similaire le passage du glycérol à travers les aquaglycéroporines (*Fu et al, 2000 ; Wang et al 2005 et Hub et al, 2008*).

Les aquaporines peuvent être glycosylées et peuvent s'oligomériser. L'AQP1 forme des tétramères dans lesquels chaque monomère est fonctionnel et indépendant (*Verbavatz et al 1993, Zeidel et al. 1994 et Jung et al. 1994*). La tétramérisation de la protéine AQP1 permet de stabiliser la structure secondaire de chaque monomère (*Moller et al, 2003*).





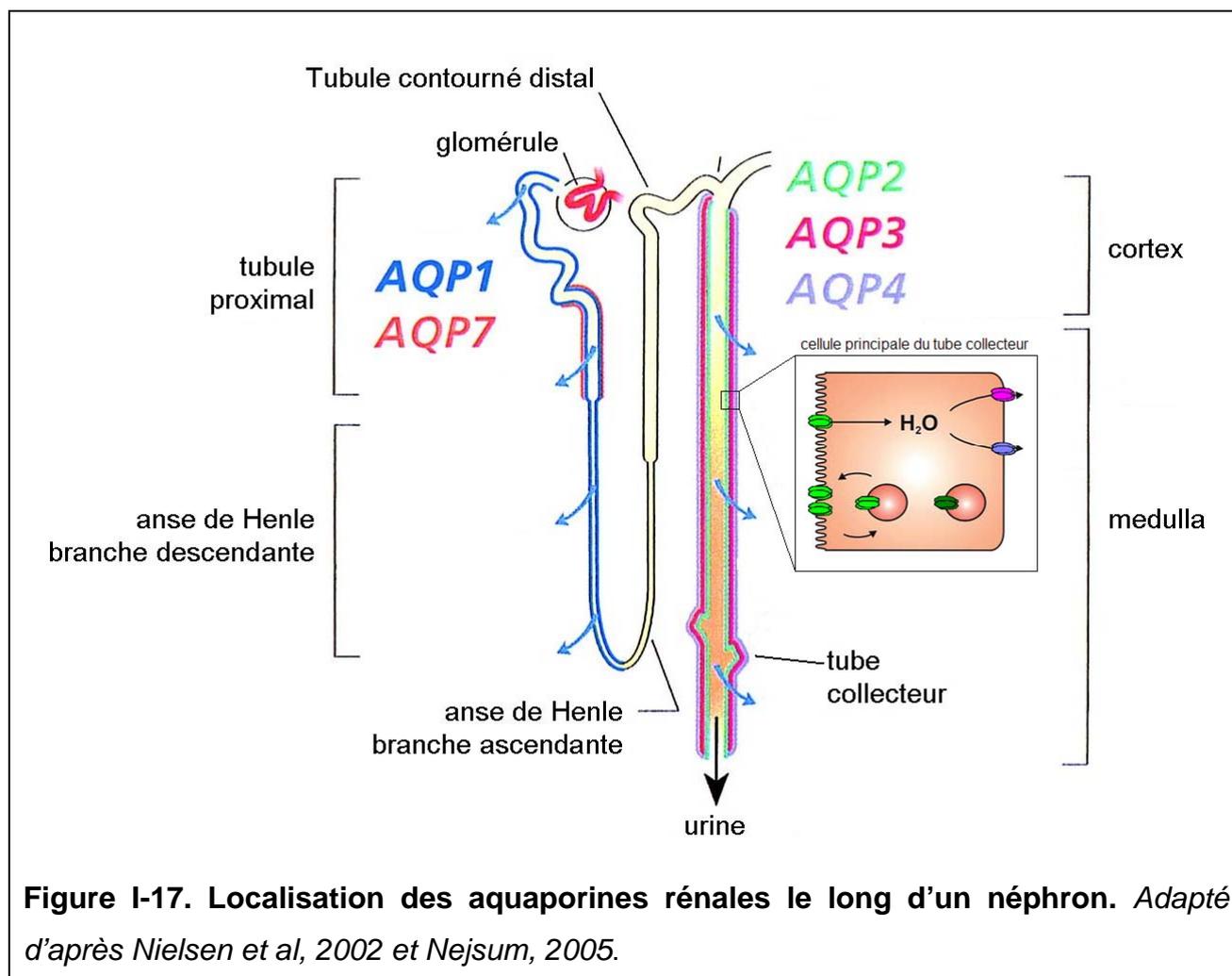
**Figure I-16. Vues intérieures d'un canal hydrique.** En jaune, résidus hydrophobes permettant le passage rapide de l'eau ; en rouge, asparagines des séquences NPA ; en vert, le site d'inhibition au mercure au niveau de la cystéine 189 et en bleu, l'histidine 180 est le résidu qui empêche le passage de molécules trop grosses. *D'après Murata et al, 2000 et De Groot et al, 2001.*

## 2.B. FONCTIONS DES AQUAPORINES

L'importance des flux d'eau au travers des aquaporines est révélée par les nombreuses pathophysiologies aux conséquences plus ou moins sévères liées à un défaut d'expression des aquaporines. Nous allons d'abord voir le transport d'eau au niveau rénal, le rein étant l'organe clef de la régulation de la balance hydrique de notre organisme. Puis l'implication des aquaglycéroporines dans le transport du glycérol et le métabolisme des lipides. Enfin nous verrons que certaines aquaporines sont impliquées dans d'autres fonctions.

## 2.B.a. Le transport d'eau : Les aquaporines rénales.

Chaque rein est constitué d'environ un million de néphrons, l'unité fonctionnelle, dont les glomérules filtrent près de 180 litres de sang par jour pour un volume d'urine finale d'environ un litre et demi. Les néphrons réabsorbent donc 99% du filtrat et les différents segments composant un néphron y contribuent de manière très inégale. Le tubule proximal et la branche descendante de Henle assurent la réabsorption de 85% du filtrat. La partie ascendante de l'anse et le tube distal présentent une perméabilité à l'eau beaucoup plus faible. La perméabilité du tube collecteur varie. Normalement assez faible, sa perméabilité augmente lorsqu'il est stimulé par la vasopressine, pouvant atteindre des valeurs similaires à celle du tube proximal. Les mécanismes de filtration prenant place au niveau des reins ont été très étudiés. L'identification des aquaporines permet de mieux comprendre la physiologie rénale, mais également les pathologies qui y sont associées.



**Figure I-17. Localisation des aquaporines rénales le long d'un néphron.** Adapté d'après Nielsen et al, 2002 et Nejsum, 2005.

Cinq aquaporines sont impliquées dans la filtration du sang et la concentration urinaire : les aquaporines 1, 2 et 4 et les aquaglycéroporines 3 et 7. La figure I-17 présente la localisation au niveau rénal de ces cinq aquaporines.

L'aquaporine 1 est localisée à la membrane plasmique des cellules épithéliales du tubule proximal et au niveau de la branche descendante de l'anse de Henle.

A ce niveau, il y a réabsorption active de sodium par le transporteur NHE3 (Sodium-hydrogen exchanger 3) et l'eau est réabsorbée via l'AQP1 de manière passive. Les individus du groupe sanguin Colton qui n'expriment pas d'AQP1 fonctionnelle, présentent un défaut de concentration urinaire quand ils sont soumis à un stress hydrique (*Ma et al, 1998*). Privés d'eau, ils ne peuvent pas concentrer leurs urines et finissent par se déshydrater. L'AQP7 est également présente au niveau du tubule proximal. Son apport dans la réabsorption d'eau est moins important que celui de l'AQP1. Son rôle semble davantage lié à la réabsorption du glycérol (*Sohara et al, 2006 et 2009*), un défaut d'expression de l'AQP7 entraîne au niveau urinaire une concentration élevée de glycérol.

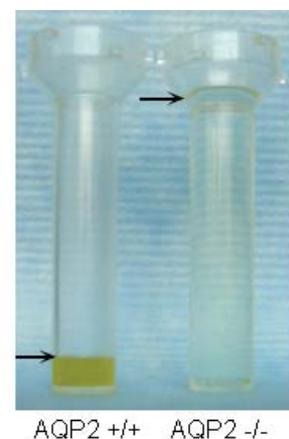
La seconde étape de la concentration urinaire au niveau du rein a lieu au niveau du tube collecteur. Trois aquaporines différentes sont responsables de la réabsorption de l'eau, les AQPs 2 et 4 et l'aquaglycéroporine 3. L'AQP2 est localisée au niveau apical des cellules principales du canal collecteur, tandis que les AQPs 3 et 4 sont localisées au niveau des membranes basolatérales des cellules. Il a été montré que ces aquaporines jouaient un rôle important dans la réabsorption de l'eau et la concentration urinaire (*Schrier, 2006 et Nielsen et al, 2007*). De nombreux travaux ont montré que l'inactivation de chacun de ces gènes s'accompagne d'un défaut de concentration urinaire plus ou moins prononcé (fig. I-18, *Nejsum 2005*).

K.O. AQP1 : Défaut de concentration urinaire

K.O. AQP2 : Diabète néphrogénique insipide

K.O. AQP3 : Polyurie sévère

K.O. AQP4 : Défaut de concentration urinaire



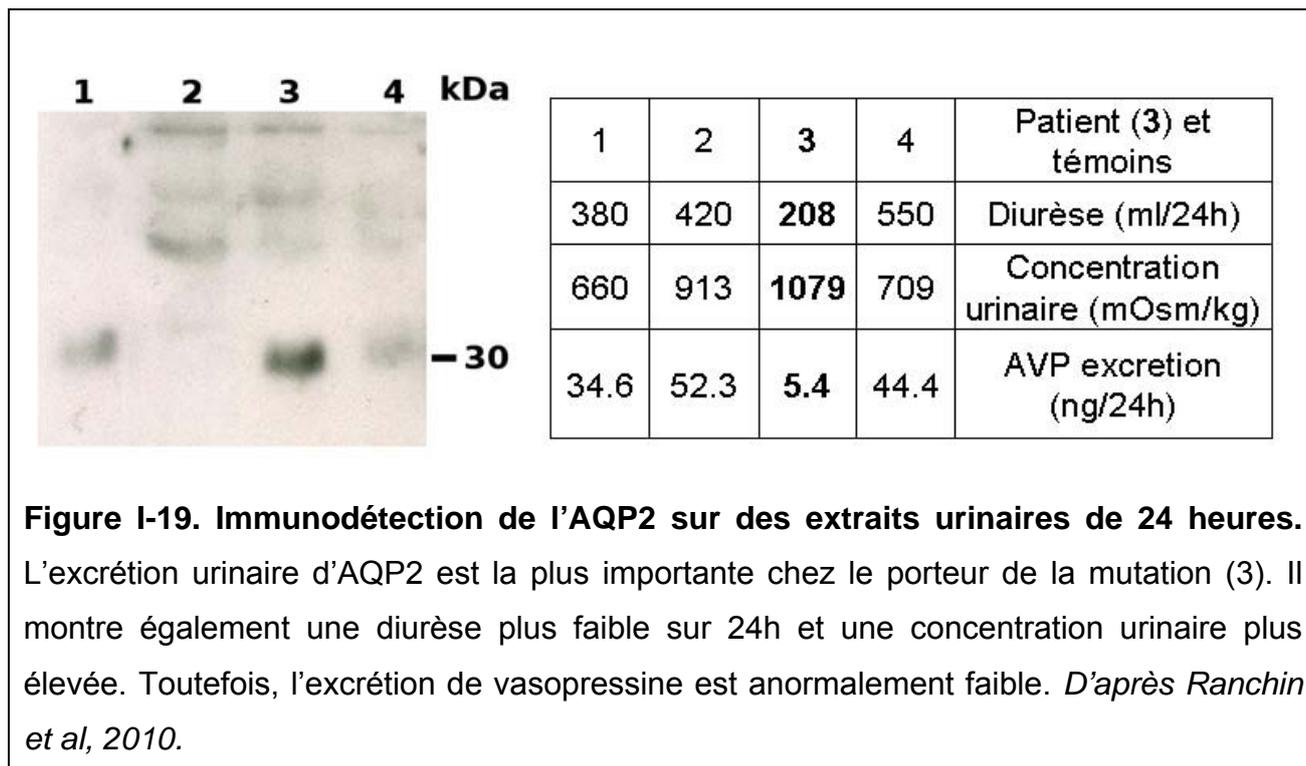
**Figure I-18. Troubles urinaires associés aux aquaporines rénales.** A gauche, comparaison des urines recueillies en 24h chez des individus exprimant ou non l'AQP2.

La translocation de l'AQP2 des vésicules à la membrane plasmique apicale est dépendante de l'activation du récepteur V2 à la vasopressine. L'activation de ce récepteur entraîne une cascade d'évènements. L'adénylate cyclase est activée et génère de l'AMP cyclique, la protéine kinase A (PKA) est alors activée. La PKA est recrutée au niveau des vésicules intracellulaires contenant l'aquaporine 2. L'AQP2 associée en tétramère est phosphorylée au niveau de la sérine 256 par la PKA. Trois monomères doivent être phosphorylés pour permettre la translocation à la membrane plasmique apicale (*Kamsteeg et al, 2000*). Dès fusion des vésicules, la perméabilité hydrique de la membrane apicale augmente. L'eau est alors réabsorbée de la lumière du tube collecteur à travers les cellules via l'AQP2 à la membrane apicale et ressort via l'AQP3 et l'AQP4 localisée à la membrane basale de ces cellules (fig. I-17). Dès l'arrêt de la stimulation par la vasopressine, l'aquaporine 2 est internalisée de manière clathrine-dépendante. Elle est alors recyclée ou dégradée au niveau du lysosome ou éliminée via l'exosome par excrétion dans les urines (*Kamsteeg et al, 2006*). De fait l'adressage de l'AQP2 constitue un bon marqueur de l'action de la vasopressine au niveau rénal. L'aquaporine 2 est la seule aquaporine régulée à court terme. Elle est également régulée sur le long terme par la vasopressine qui induit sa surexpression. Il a été montré que l'expression de l'aquaglycéroporine 3 était également régulée sur le long terme de la même manière par la vasopressine.

L'importance de l'AQP2 pour la concentration urinaire a été très tôt rapportée (*Deen et al, 1994*). Il a été montré qu'un patient souffrant d'un diabète néphrogénique insipide sévère (NDI) présentait une mutation au niveau du gène de l'aquaporine 2. Le gène muté code pour une AQP2 non fonctionnelle responsable de la pathologie. D'autres mutations existent tant au niveau de la vasopressine que de son récepteur ou de l'aquaporine 2. Ces mutations en empêchant l'activation du récepteur V2 ou le trafic de l'AQP2, aboutissent à des pathologies de type NDI.

La majorité des cas jusqu'à présent étudiés ont montré un défaut dans la réabsorption d'eau, toutefois quelques cas font état de l'effet inverse. Nous avons ainsi pu étudier une famille présentant le syndrome néphrogénique de l'antidiurèse inappropriée (Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis, NSIAD). Cette famille présente une mutation activatrice du récepteur V2 aboutissant à l'activation et la translocation constante de l'AQP2 intracellulaire à la membrane apicale des cellules du tube collecteur. Cette mutation entraîne une réabsorption importante et constante de l'eau. Chez le nourrisson

sujet à cette mutation, l'absorption trop importante d'eau provoque des hyponétramies sévères. La répétition d'épisodes hyponatrémiques conduit à des retards mentaux lors de la croissance. Nous avons pu montrer en dosant la présence de l'AQP2 au niveau urinaire que soumis à une charge hydrique même faible ( $10\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) les individus hémizygotés et hétérozygotés peinent à diluer leurs urines et à excréter la totalité de la charge et présentent une hyponatrémie plus ou moins importante (*Ranchin et al, 2010*). Comme on peut le voir sur la figure I-19, le cas le plus sévère exhibe une diurèse très faible et très concentrée malgré un taux de vasopressine excrétée très faible.

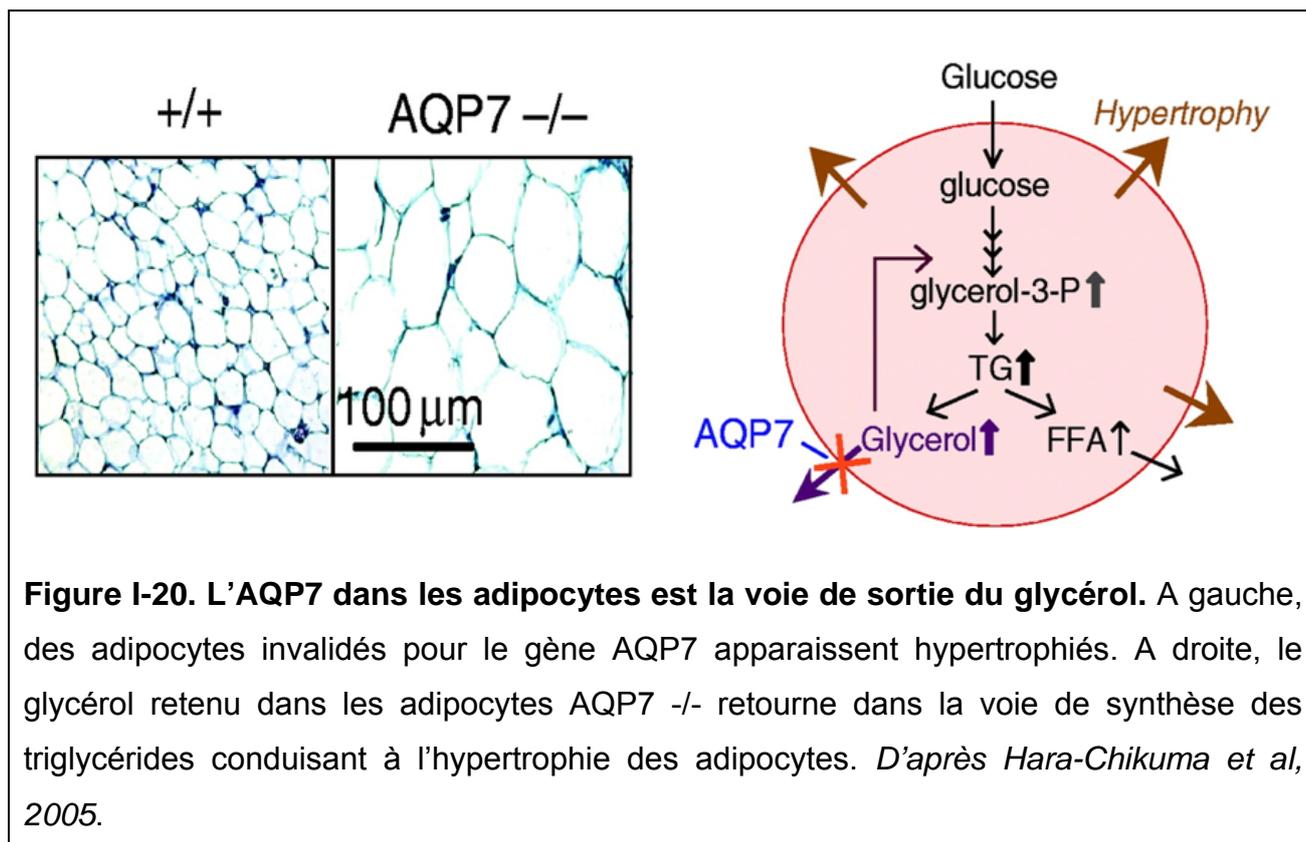


### 2.B.b. Aquaporines et transport du glycérol

L'importance du rôle des aquaglycéroporines dans le transport et le métabolisme du glycérol (*Hibuse et al, 2006* et *Rojek et al, 2008*) n'a été identifié que tardivement.

L'aquaglycéroporine 7 (*Kuriyama et al, 1997*) est présente au niveau du tissu adipeux blanc. Les adipocytes blancs stockent la graisse sous forme de triglycérides (lipogénèse) constituant un réservoir énergétique. Lors de la lipogénèse, l'insuline active le transfert du transporteur de glucose 4 (GLUT4) à la membrane plasmique qui permet l'entrée du glucose dans les adipocytes. Le glucose intracellulaire est alors transformé en glycérol-3-phosphate. L'insuline active également les lipoprotéines lipases synthétisées par les adipocytes et présentes à la surface des cellules endothéliales. Activées, ces

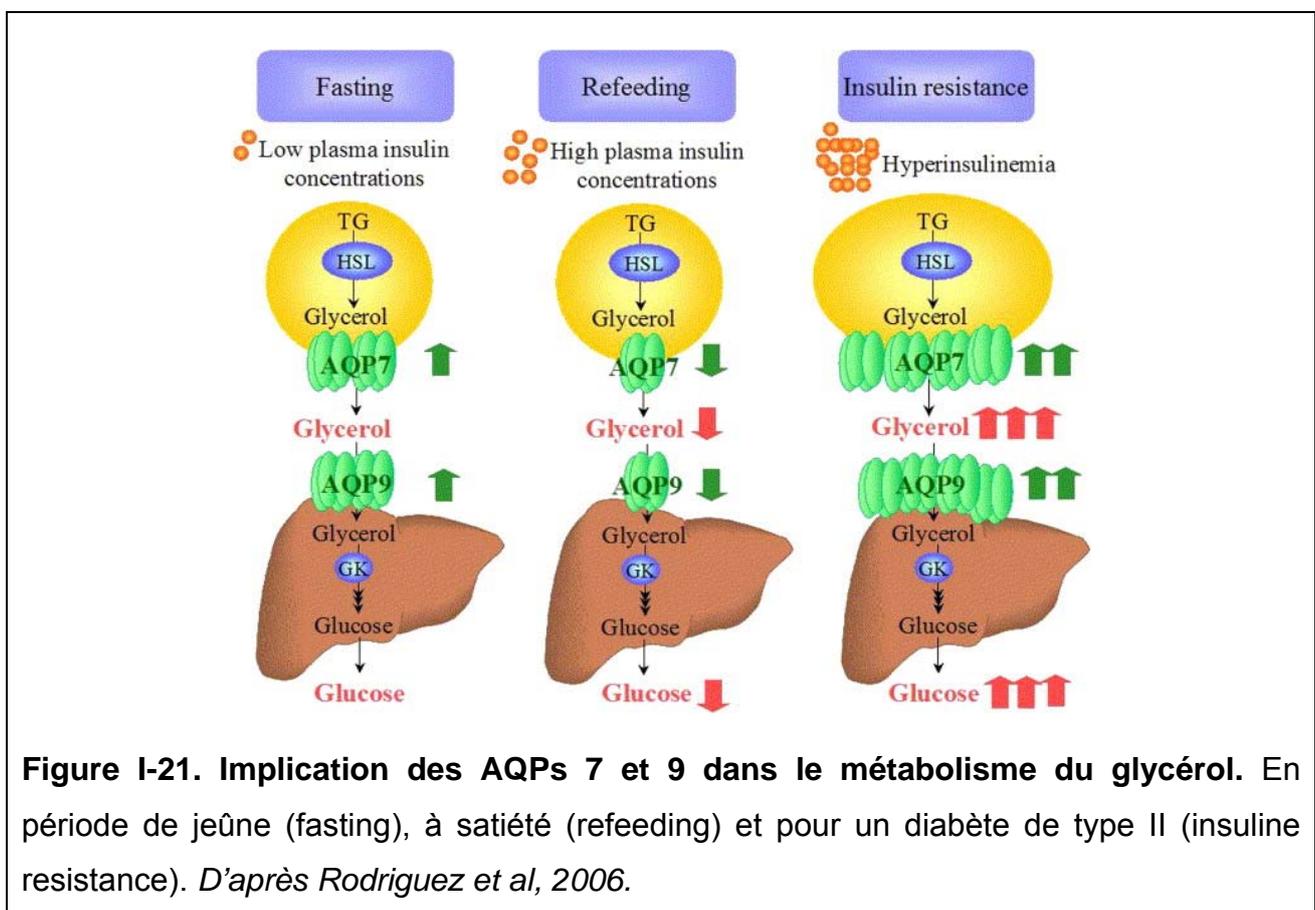
lipases captent et dégradent en acides gras libres les transporteurs d'acide gras (chylomicron et VLDL) présents dans le sang, permettant ainsi leur absorption par le tissu adipeux. Dans les adipocytes, le glycérol-3-phosphate et les acides gras libres sont estérifiés en triglycérides et stockés. Lorsque c'est nécessaire en cas d'exercice physique ou de jeûne, les adipocytes hydrolysent (lipolyse) les triglycérides en libérant ainsi du glycérol et des acides gras libres dans la circulation. Le glycérol est transporté vers le foie tandis que les acides gras sont également utilisés par les muscles.



De nombreuses études menées tant chez l'animal que chez l'homme ont montré l'implication de l'aquaporine 7 dans le métabolisme des lipides (Kishida et al, 2000). L'AQP7 est responsable de la libération du glycérol des adipocytes vers le sang. Ainsi l'expression de l'AQP7 augmente à jeun en parallèle à l'augmentation de la concentration plasmatique en glycérol, mais à l'opposé de la concentration en insuline (Rodriguez et al, 2007). Après un repas, le taux d'insuline plasmatique augmente et à contrario le taux de glycérol dans le sang diminue ainsi que l'expression de l'aquaporine 7 dans les adipocytes. Il semblerait donc que l'expression de l'aquaporine 7 soit régulée de manière négative sur le long terme par l'insuline. Bien que le mécanisme n'ait pas encore été identifié, lors de la lipolyse l'aquaporine 7 intracellulaire est transloquée à la membrane plasmique des adipocytes. Elle facilite alors le passage du glycérol des adipocytes vers le

sang. De nombreux travaux (Maeda et al, 2004, Hara-Chikuma et al, 2005, Hibuse et al, 2005 et Prudente et al, 2007) ont montré que l'inactivation du gène AQP7 empêche la sortie du glycérol et induit l'hypertrophie des adipocytes (fig. I-20).

Il n'y a pas de tel cas reporté chez l'homme. Une étude japonaise a toutefois identifié un individu porteur d'une mutation du gène de l'aquaporine 7 conduisant à une protéine AQP7 moins perméable à l'eau et au glycérol (Kondo et al, 2002). Le sujet ne présente aucun phénotype d'obésité ou d'hypertrophie des adipocytes. Cependant durant l'effort, il ne peut augmenter son taux sanguin de glycérol alors que son taux de catécholamine augmente. L'aquaglycéroporine 7 est donc essentielle au maintien du taux de glycérol plasmatique.



Comme nous l'avons vu, le glycérol libéré par les adipocytes dans le sang est utilisé par le foie. Ce glycérol intervient dans la néoglucogenèse, réaction qui permet de synthétiser du glucose. Le foie exprime une seule aquaglycéroporine, l'AQP9 (Nihei et al, 2001 et Carbrey et al, 2003). Elle est localisée au niveau du foie et intervient dans l'absorption du glycérol. Il a été constaté qu'à jeun l'expression de l'AQP9 augmente de la même manière que la glycérol kinase qui est impliquée dans la première étape de la néoglucogenèse. Tandis qu'à satiété, l'expression de l'AQP9 diminue et la

néoglucogénèse semble stoppée. Deux aquaglycéroporines sont donc liées au métabolisme du glycérol.

Le diabète de type 2 est un type de diabète non dépendant à l'insuline, qui se caractérise par une désensibilisation progressive et croissante des récepteurs à l'insuline. Le taux de sucre dans le sang devient alors de plus en plus élevé. Des études sont menées pour déterminer l'influence de ce type de diabète sur la régulation de l'expression des aquaglycéroporines 7 et 9 (*Ceperuelo-Mallafre et al, 2007 ; Catalan et al, 2008 et Maeda et al, 2008 et 2009*). Il apparaît qu'un phénotype de type insulino-résistant induirait la surexpression de ces deux aquaglycéroporines, conduisant à l'augmentation du glycérol et du glucose dans le sang. La figure I-21 résume les changements d'expressions observés pour les AQP7 et 9, à jeun, à satiété et en cas d'hyper insulinémie.

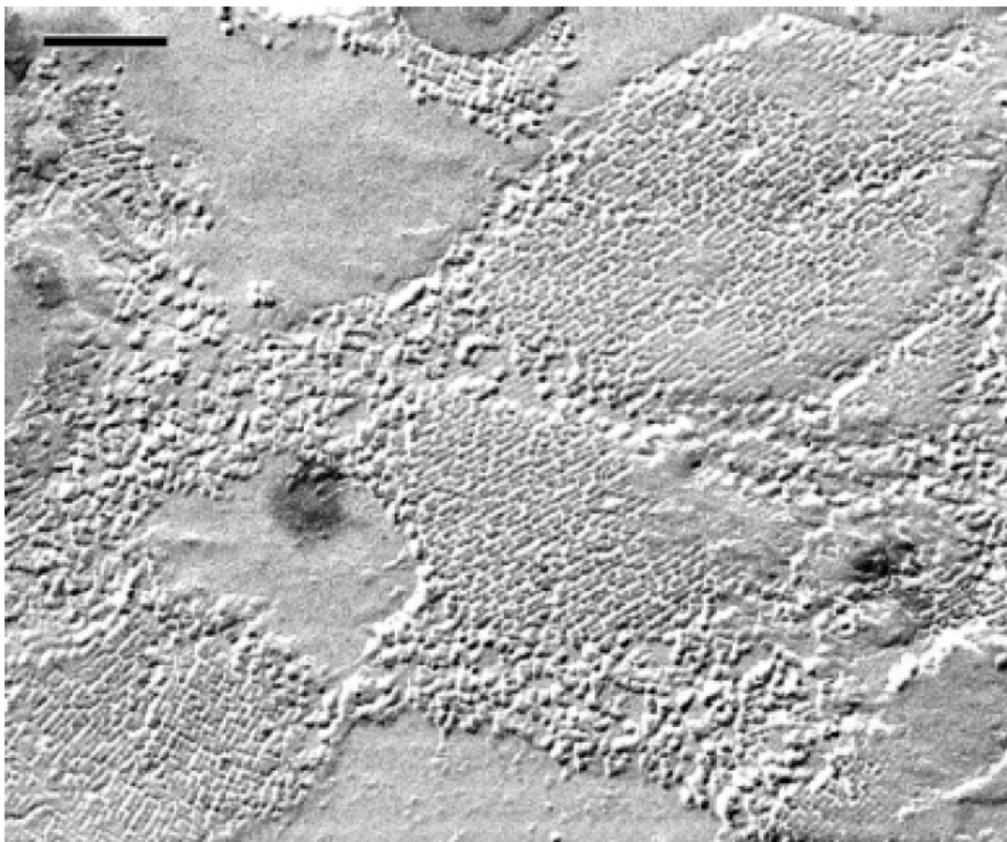
### **2.B.c. Aquaporines et autres fonctions**

Certaines aquaporines en plus de leur fonction de canal hydrique semblent également posséder d'autres propriétés.

C'est le cas de l'aquaporine 0. Connue dix ans avant la découverte de l'AQP1, elle était alors appelée MIP26. Sa fonction au sein du cristallin où elle représente plus de 60% des protéines transmembranaires n'était pas définie. Elle a été isolée et clonée après l'AQP1 (*Pisano et al, 1991*) et sa fonction de canal hydrique découverte quelques années plus tard (*Mulders et al, 1995*). MIP26 a été alors rebaptisée AQP0 pour souligner l'antériorité de sa découverte. Cette aquaporine s'organise au sein des membranes en larges réseaux orthogonaux (fig. I-22). Cette aquaporine joue deux rôles majeurs au niveau du cristallin (*Shiels et al, 2001*). Bien que permettant le passage de l'eau dix fois plus lentement que les autres aquaporines, son abondance et sa répartition au sein des cellules du cristallin permettent un fin contrôle des flux d'eau entre les cellules des fibres et celles du noyau, empêchant un excès d'eau qui rendrait les cellules opaques.

Cependant l'aquaporine 0 remplit une autre fonction complètement différente. L'aquaporine 0 est clivée dans les fibres du cristallin, selon un mécanisme dépendant de l'âge. Ce clivage de l'AQP0 conduit à la formation de jonctions membranaires entre les cellules. Cette adhésion entre les cellules des fibres permet de maintenir l'espace entre les fibres et leur organisation au cours des changements de forme dus aux focalisations du cristallin. Avec l'âge, les fibres s'enfoncent vers l'intérieur du cristallin. L'AQP0 est alors

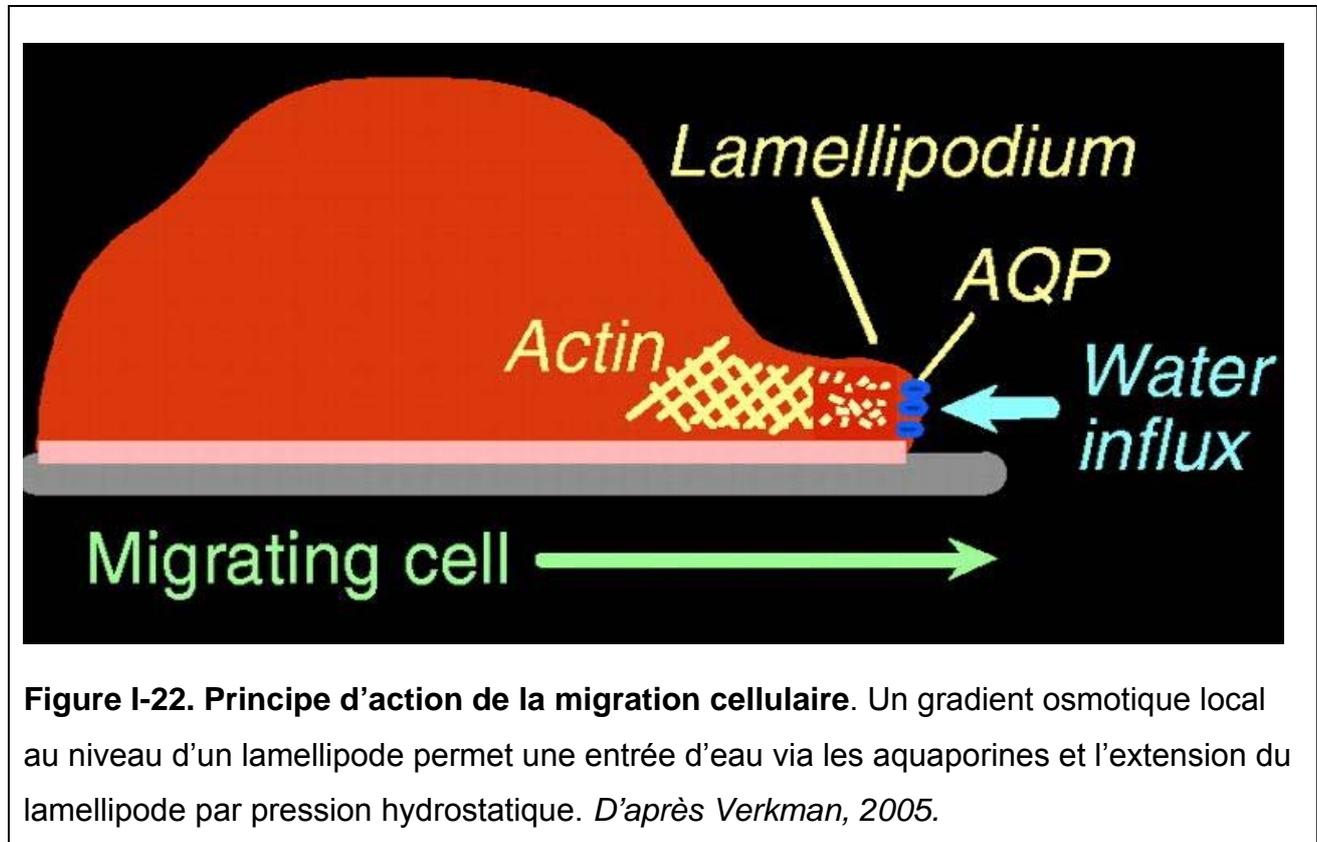
majoritairement clivée et les adhésions intercellulaires provoquées mènent à la cataracte. Des mutations de l'aquaporine 0 sont d'ailleurs responsables des cataractes congénitales.



**Figure I-22. Réseaux orthogonaux d'AQP0 au niveau du cristallin.** Observation en microscopie électronique après cryodécoupage. *D'après Engel et al, 2000.*

Depuis le début des années 2000, l'association entre aquaporines et tumeurs est de plus en plus étudiée. Via un transport d'eau, les aquaporines sont impliquées dans la migration et de la prolifération cellulaire, notamment au niveau de l'angiogénèse et de la progression tumorale (*Vacca et al, 2001, Saadoun et al 2005 et Hara-Chikuma et al, 2006*). Les auteurs de ces études ont montré par transfection que l'expression des aquaporines dans des cellules augmente le potentiel de croissance et de motilité de ces cellules. Au niveau des lamellipodes (fig. I-22), la création d'un gradient osmotique provoque l'entrée d'eau par les AQP0 permettant ainsi l'expansion de la membrane plasmique par pression hydrostatique. L'expansion est rapidement stabilisée par la repolymérisation du squelette d'actine (*Verkman, 2005*).

In vivo les aquaporines sont surexprimées dans certaines tumeurs, mais complètement absente pour d'autres et de nombreuses études sont réalisées pour comprendre le lien existant entre les aquaporines et la prolifération et la progression tumorale.



### 3 OBJECTIFS

Depuis le milieu du vingtième siècle, de nombreux chercheurs essayaient de prouver l'existence de canaux permettant le passage facilité de l'eau à travers les membranes biologiques. La grande majorité des études étaient conduites sur les tissus rénaux et les globules rouges, leurs membranes exhibant une perméabilité hydrique jusqu'à cent fois plus importante que celles d'autres tissus. Au contraire, l'épiderme est l'un des plus imperméables à l'eau, la perméabilité à l'eau de la couche cornée étant mille fois moins importante que pour toute autre membrane du corps humain (Potts, 1991).

Pourquoi alors s'intéresser à la perméabilité hydrique de l'épiderme, un tissu décrit comme étant imperméable ? Parce que l'AQP3 est exprimée dans l'épiderme par les

kératinocytes, chez le rat (Frigeri et al, 1995), chez la souris (Ma et al, 2002) et chez l'homme (Sougrat et al, 2002). Il a été montré que les souris déficientes en AQP3 présentent une peau sèche. Les études menées chez ces souris ont abouti à la conclusion que l'hydratation de l'épiderme est assurée via un transport de glycérol par l'AQP3 (Hara et al, 2002 et 2003 et Hara-Chikuma et al, 2005). L'ARNm de l'AQP9 est également exprimée par des kératinocytes différenciés en culture (Sugiyama et al, 2001) et chez la souris au niveau de la couche granuleuse (Rojek et al, 2007). Toutefois le rôle de cette aquaporine dans l'épiderme n'est pas établi.

Jusqu'à présent seule l'expression de quelques aquaporines a été étudiée au niveau de la peau et encore moins chez l'homme, il est possible que d'autres aquaporines soient exprimées dans l'épiderme humain.

Notre objectif est pour commencer de compléter l'étude de l'expression des AQP dans la peau humaine par RT-PCR en utilisant de l'épiderme humain et des cultures de cellules primaires représentatives des différents types cellulaires de la peau humaine.

Nous nous intéresserons ensuite de manière plus spécifique aux kératinocytes et aux mélanocytes, les cellules majoritaires de l'épiderme. Nous étudierons notamment l'expression protéique et la localisation des aquaporines précédemment identifiées dans les kératinocytes et les mélanocytes. Nous préciserons par microscopie optique leur localisation au niveau tissulaire et par microscopie électronique leur localisation intracellulaire.

Enfin nous étudierons les changements d'expression des aquaporines dans différents modèles. Comme nous l'avons vu en introduction (cf. 1.C.c.), la différenciation des kératinocytes peut être réalisée *in vitro* par adjonction de calcium extra-cellulaire. Notre objectif sera alors d'étudier l'expression des aquaporines dans les kératinocytes au cours de la différenciation induite par le calcium. Nous disposons également de plusieurs lignées tumorales humaines, nous pourrions étudier le lien éventuel entre l'expression d'aquaporine et ces cellules tumorales.

Les données recueillies devraient nous permettre de préciser leur fonction au sein de l'épiderme. Nous pourrions entre autre déterminer s'il existe des conséquences physiologiques de l'expression et la régulation de ces aquaporines ou encore préciser si l'hydratation de l'épiderme via les aquaporines s'effectue par transport d'eau, de glycérol ou des deux.

Ainsi nos résultats démontreront que l'AQP3 n'est pas la seule aquaporine exprimée au niveau de la peau humaine. Quatre autres aquaporines sont détectées, in vitro et in vivo. Nous montrerons également à l'aide de nos modèles et au sein des différents couches de l'épiderme, des différences d'expression et de localisation des aquaporines exprimées par les kératinocytes.

Nous espérons à travers ces travaux apporter un regard nouveau quant à l'expression et au rôle physiologique des aquaporines exprimées au niveau de l'épiderme humain.

## **II. MATERIEL ET METHODES**

## 1. REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Nous avons utilisé la RT-PCR pour étudier l'expression nucléique des aquaporines au niveau de différentes cultures cellulaires. À l'aide d'amorces spécifiques des AQPs 0 à 10, les aquaporines exprimées sont amplifiées puis détectées de la manière suivante.

Les extraits d'ARN totaux obtenus pour chaque culture cellulaire sont dilués (entre 10 ng.µL<sup>-1</sup> et 20 ng.µL<sup>-1</sup>). Cette concentration a été déterminée en suivant le protocole du kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq, Invitrogen. Les cycles suivants sont effectués : 1 cycle de reverse transcriptase (30 min à 50°C -> 2 min à 94°C) ; 38 cycles de PCR (30 sec à 94°C -> 30 sec à 55°C -> 60 sec à 72°C) ; 1 cycle d'extension finale (5 min à 72°C). L'analyse des produits RT-PCR s'effectue par révélation aux UV, après électrophorèse sur un gel d'agarose 2%, Tris Acétate EDTA (TAE) en présence de Bromure d'ETHidium (BET).

Les amorces suivantes ont été utilisées :

**AQP0**, produit d'une taille de 652 pb

5'-TGGCTATGGCATTGGCTTG-3' et

5'-TGGGTGTTTCAGTTCAACAGGTTC-3'

**AQP1**, produit d'une taille de 711 pb (testé positivement dans le rein)

5'-CTTTGTCTTCATCAGCATCGGTTC-3' et

5'-ATGTCGTCGGCATCCAGGTCATAC-3'

**AQP2**, produit d'une taille de 534 pb (testé positivement dans le rein)

5'-GCGTTTGGCTTGGGTATTGG-3' et

5'-AAACAGCACGTAGTTGTAGAGGAGG-3'

**AQP3**, produit d'une taille de 781 pb (testé positivement dans le rein)

5'-ACCCTCATCCTGGTGATGTTTG-3' et

5'-TCTGCTCCTTGTGCTTCACAT-3'

**AQP4**, produit d'une taille de 839 pb (testé positivement dans le rein)

5'-TTTCAAAGGGGTCTGGACTCAAG-3' et

5'-CAACGTCAATCACATGCACCAC-3'

**AQP5**, un produit d'une taille de 476 pb

5'-CTCTTGGTGGGCAACCAGATC-3' et

5'-TCACTCAGGCTCAGGGAGTTGG-3'

**AQP6**, selon épissage deux produits d'une taille de 488 pb (forme épissée) ou d'une taille de 894 pb (forme non épissée)

5'-GCACTTCCCTCCGTGCTACAG-3' et

5'-TGGACTGTGAACTTCCCAATGATG-3'

**AQP7**, produit d'une taille de 720 pb (testé positivement dans le rein)

5'-GGGAGCTACCTTGGTGTCAACTT-3' et

5'-CATCTTGGGCAATACGGTTATCC-3'

**AQP8**, produit d'une taille de 744 pb

5'-GCCATGTGTGAGCCTGAATTTG-3' et

5'-CTTCCCATCTCCAATGAAGCAC-3'

**AQP9**, produit d'une taille de 664 pb (testé positivement dans le foie)

5'-ACGTTTTGGAGGGGTCATCAC-3' et

5'-CAGGCTCTGGATGGTGGATTTC-3'

**AQP10**, produit d'une taille de 651 pb

5'-ATAGCCATCTACGTGGGTGGTAAC-3' et

5'-TTTGTGTTGAGCAGACACCAGATC-3'

**Actine  $\beta$** , produit d'une taille de 630 pb

5'-GGCCAACCGCGAGAAGATGA-3' et

5'-CTGGGTGCCAGGGCAGTGAT-3'

## Digestion des produits RT-PCR

Toutes les amorces ont été testées négativement, cependant nous ne disposons pas du matériel pour les tester positivement. Afin de déterminer si les fragments amplifiés sont effectivement spécifiques, des digestions spécifiques sont réalisées à l'aide d'enzymes de restriction sélectionnées parmi celles cataloguées par New England Biolabs® Inc. Elles répondent aux critères suivants : reconnaissance d'un site unique de coupure d'au moins 6pb au niveau de la séquence amplifiée et température de digestion de 37°C. Les enzymes suivantes ont été utilisées :

AgeI, site de restriction reconnu A/CCGGT

BglII, site de restriction reconnu A/GATCT

BsrGI, site de restriction reconnu T/GTACA

DrallI, site de restriction reconnu CACNNN/GTG

NcoI, site de restriction reconnu C/CATGG

PstI, site de restriction reconnu CTGCA/G

PvuII, site de restriction reconnu CAG/CTG

SacII, site de restriction reconnu CCGC/GG

SexAI, site de restriction reconnu A/CCWGGT

XhoI, site de restriction reconnu C/TCGAG.

XmaI, site de restriction reconnu C/CCGGG

Les produits de digestion sont révélés aux UV après électrophorèse sur gel (agarose 2 %, TAE avec BET).

## 2. WESTERN BLOT

Pour chaque résultat positif obtenu par RT-PCR., nous avons testé la présence protéique par western blot.

Les protéines prélevées sur les cultures après lyse cellulaire sont dosées à l'aide d'un kit commercial (Micro BCA, Pierce). Chaque échantillon est ensuite mélangé à du tampon de Laemmli. Dix à vingt microgrammes de protéines sont ensuite déposés pour électrophorèse sur gel de polyacryamide dénaturant à 12% de sodium dodecyl sulfate, puis les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes sont lavées dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant 5% de lait écrémé, puis incubées pour 90 minutes dans un même tampon en présence de l'anticorps primaire. Après lavage au PBS/lait, les membranes sont incubées dans une solution PBS/lait contenant l'anticorps secondaire (1/5000 d'anticorps anti-lapin ou anti-chèvre conjugué à la peroxydase du raifort). Les membranes sont successivement lavées dans des tampons PBS/lait puis PBS/Tween 20 à 0, à 2%. Les marquages sont révélés par chemiluminescence sur film ou à l'aide d'une caméra CCD et d'un logiciel de prise de vue.

### 3. ANTICORPS UTILISES

#### ANTI-AQP1

Cet anticorps est un anticorps commercial produit chez le lapin (Rabbit Anti-AQP1, AB3065 Millipore). Il est dirigé contre une séquence de 19 acides aminés C-ter (intracellulaire) de l'AQP1 de rat. Cet anticorps a été purifié par chromatographie d'affinité à l'aide du peptide ayant servi à l'immunisation. Dilution au 100<sup>ème</sup>.

#### ANTI-AQP2

Cet anticorps est un anticorps commercial produit chez le lapin (ANTI-WATER CHANNEL AQP2, Sigma). Il est dirigé contre la séquence des 18 acides aminés C-ter (intracellulaire) de l'AQP2 de rat. Cette séquence est la suivante : (KY)RQSVELHSPQSLPRGSKA. Dilution au 300<sup>ème</sup>.

#### ANTI-AQP3

Cet anticorps est un anticorps produit chez le lapin. Il est dirigé contre la séquence des 22 acides aminés C-ter (intracellulaire) de l'AQP3 de rat. Cette séquence est la suivante : QPPPSTEAEEN VKLAHMKHKE QI. Elle présente une homologie de 86 % avec celle de l'AQP3 humaine. Cet anticorps a été purifié par chromatographie d'affinité à l'aide du peptide ayant servi à l'immunisation. Dilution au 500<sup>ème</sup>.

#### ANTI-AQP9

Deux anticorps commerciaux ont été utilisés :

Le premier est un anticorps produit chez le lapin (Anti-Rat AQP9, Uptima). Il est dirigé contre une séquence de 18 acides aminés C-ter (intracellulaire) de l'AQP9 de rat. Cette séquence présente une homologie de 72 % avec celle de l'AQP9 humaine. Dilution au 400<sup>ème</sup>.

Le second est un anticorps produit chez la chèvre (Anti-AQP9 C-18, Santa Cruz Biothenology). Il est dirigé contre une séquence de 18 acides aminés C-ter (intracellulaire) de l'AQP9 humaine. Dilution au 200<sup>ème</sup>.

### **ANTI-AQP10**

Cet anticorps est un anticorps commercial produit chez le lapin (ANTI-AQP10 ab15131, ABCAM) et c'est le seul anticorps existant. Il est dirigé contre une séquence de 17 acides aminés C-ter de l'AQP10 humaine (variant court, non fonctionnel). Dilution au 100<sup>ème</sup>.

### **ANTI-TRP1**

Cet anticorps est un anticorps commercial produit chez la souris (ANTI-MEL5, CALBIOCHEM). Il est dirigé contre la protéine Tyrosinase Related Protein 1 et est un marqueur spécifique des mélanocytes. Dilution au 40<sup>ème</sup>.

## **4. MICROSCOPIE**

Des expériences de microscopie optique et électronique sont réalisées afin de localiser au niveau tissulaire et cellulaire les aquaporines exprimées au niveau protéique.

### **Immunofluorescence indirecte**

Les tissus sont fixés à l'aide de paraformaldéhyde 4% puis rincés au PBS. Des cryosections de 5 µm d'épaisseur sont préparées au cryostat et collectées sur lame de verre. Les lames sont incubées dans un tampon PBS et BSA (Albumine de Sérum Bovin) à 1%, puis incubées dans le tampon contenant l'anticorps primaire. Après rinçage, les coupes sont incubées avec un tampon contenant l'anticorps secondaire anti-lapin, anti souris ou anti-chèvre couplé à un fluorochrome (FITC, Alexa ou Cy3) , puis à nouveau rincées. Une coloration au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) ou une contre coloration au bleu Evans peut être réalisée. Les lames sont enfin montées dans un tampon glycérol à 50% et n-propyl-gallate à 2% et observées au microscope à fluorescence (Olympus van OX AH2)

### **Microscopie électronique ultrastructurale**

Les tissus sont fixés au paraformaldéhyde 4% et au glutaraldéhyde 0,1%, puis rincés au PBS. Ils sont ensuite postfixés dans un mélange à ratio équivalent d'osmium tetroxide à 2% et de potassium ferrocyanide à 3%. Les tissus sont ensuite inclus dans de

l'epon. Des sections de 90 nm sont coupées à l'ultra-microtome (UltraCut S, Leica) et déposées sur des grilles. Ces sections sont ensuite colorées 2 minutes au citrate de plomb. Les grilles sont ensuite observées au microscope électronique (Philips EM400 ou CM12)

### **Immunogold**

De petits fragments de tissus fixés sont inclus en Unicryl. Des sections de 90 nm d'épaisseur sont coupées à l'aide d'un ultra-microtome (UltraCut S, Leica). Les coupes sont collectées sur des grilles de Nickel recouvertes d'un film de Formwar / Carbone. Les préparations sont incubées 20 min dans la solution tampon suivante : Tris 20 mM (pH 7.4), 0.1% de BSA, 0.1% de gélatine de poisson, et 0.05 % de Tween-20. Après incubation en présence du premier anticorps et lavages, les coupes sont incubées pendant une heure en présence de l'anticorps secondaire conjugué à des billes d'or de 10 nm de diamètre. Les coupes sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle, au citrate de plomb et recouvertes d'un film de méthyle cellulose. Les grilles sont ensuite observées au microscope électronique (Philips EM400).

## **5. CULTURE CELLULAIRE**

### **MELANOCYTES :**

Les cultures primaires de mélanocytes proviennent de Promocell, de Millipore et de notre partenaire Dior Recherche. Les cellules ont été prélevées sur différents donneurs. Elles sont cultivées à 37°C avec le milieu recommandé par le fournisseur. Respectivement, Milieu M2 ; milieu ; un mélange de 90% d'un milieu KSFM (Keratinocyte Serum Free Medium) et 10% de milieu E199.

MNT1 : lignée tumorale de mélanocytes hyperpigmentés. Ces mélanocytes sont cultivés dans un milieu composé de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), AIMV® (10%) et sérum de veau foetal (FBS) 20%.

## **KERATINOCYTES :**

Les cultures primaires de kératinocytes proviennent de Promocell, de Millipore et de notre partenaire Dior Recherche. Les cellules ont été prélevées sur différents donneurs. Elles sont cultivées à 37°C avec le milieu recommandé par le fournisseur, respectivement: Milieu KBM (Keratinocytes Basal Medium); PCT Epidermal Keratinocyte Medium (Progenitor Cell Targeted); KSFM.

HaCaT : lignée immortelle de kératinocytes développée à partir de kératinocytes humains normaux cultivés à température élevée (38,5°C) et sous faible concentration calcique (0,2mM) (*Boukamp et al, 1988*). Ces kératinocytes ont gardé leur potentiel de différenciation et sont capables de reformer un tissu épidermique. Elles sont cultivées dans du DMEM complété avec 10% de SVF ou dans du KSFM.

## **AUTRES CELLULES :**

HDMEC-c : Les cellules endothéliales HDMEC-c (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, PromoCell®) sont cultivées dans du ECGM (Endothelial Cell Growth Medium MV2 Kit, PromoCell®), changé tous les 2 jours.

Pour les cellules de Langerhans (monocytes, MDDC-48 immatures et MDDC-48 matures) nous avons utilisé des culots cellulaires fournis par LVMH Recherche.

Les fibroblastes sont issus d'une lignée commerciale NHDF-c (Normal Human Dermal Fibroblast, PromoCell®) et cultivés dans du FGM (Fibroblast Growth Medium, PromoCell®) changé tous les 2 jours.

Les préadipocytes sont cultivés dans du PGM (Preadipocytes Growth Medium, PromoCell®), milieu changé tous les 2 jours. A confluence, un nouveau milieu PBM (Preadipocytes Basal Medium, PromoCell®) est ajouté pendant 72 h. Après initiation de la différenciation par le PBM, les cellules sont placées dans un milieu de nutrition, (Adipocytes Nutrition Medium, PromoCell®), changé tous les 3 jours, pendant 12 à 14 jours. Toutes les cellules sont cultivées dans une atmosphère de 5 % CO<sub>2</sub> et 95 % air, à 37°C.

# **III. EXPRESSION DES AQUAPORINES AU NIVEAU DE LA PEAU**

## 1. INTRODUCTION

Dans cette première partie et à la suite des travaux de l'équipe sur l'expression de l'AQP3 par les kératinocytes (*Ma et al, 2002 ; Sougrat et al, 2002*), nous présentons une carte des aquaporines exprimées au niveau de la peau humaine. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'expression des aquaporines au niveau de cultures de cellules primaires issues des différents types cellulaires de la peau humaine.

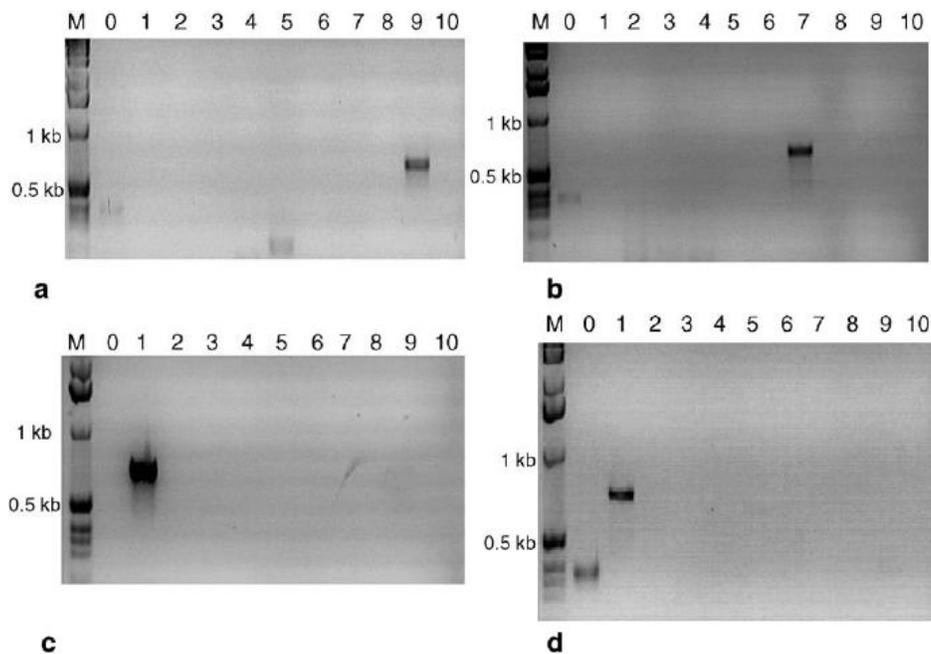
Les cellules testées incluent pour l'épiderme : des kératinocytes, des mélanocytes et comme modèle des cellules de Langerhans, des monocytes et des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDCs) immatures et matures. Pour le derme : des fibroblastes et des cellules endothéliales. Enfin pour l'hypoderme : des préadipocytes et des adipocytes immatures et matures. Les cellules des glandes sébacées et sudoripares n'ont pas été testées. D'abord décrite au niveau des cellules des glandes lacrymales et salivaires (*Lee et al, 1996*), l'AQP5 est également présente au niveau des cellules des glandes sébacées et sudoripares. Si certains auteurs ont montré qu'elle ne jouait aucun rôle dans la sécrétion sudorale (*Song et al, 2002*), son rôle à ce niveau a été démontré et est aujourd'hui admis (*Nejsum et al, 2002 ; Ma et al, 2007*).

Nous avons testé l'expression de l'ARNm des AQPs 0 à 10 par RT-PCR, pour chacun des types cellulaires sélectionnés. Nous avons choisi de tester la spécificité de chaque amplicon obtenu par des digestions enzymatiques. Nous n'avons pas testé les aquaporines 11 et 12, découvertes tardivement et mal caractérisées (*Morishita et al et Itoh et al, 2005*). Pour chaque type cellulaire, au minimum trois cultures provenant de souches différentes ont été réalisées. L'extraction des ARNm totaux a été réalisée pour chaque culture et tous les échantillons d'ARNm obtenus ont été testés au moins deux fois par RT-PCR. Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication, « *Expression and function of aquaporins in human skin : Is aquaporin-3 just a glycerol transporter ?* » (*Boury-Jamot et al, 2006*).

## 2. RESULTATS

### 2.A. AU NIVEAU DU DERME ET DE L'HYPODERME

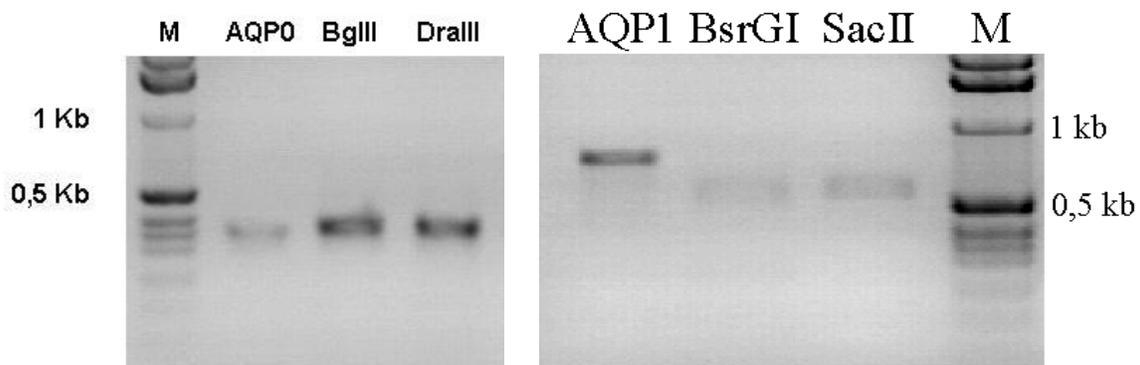
La figure III-1 montre les résultats obtenus pour les cellules représentatives de l'hypoderme (préadipocytes et adipocytes) et du derme (fibroblastes et cellules endothéliales).



**Figure III-1. Analyse par RT-PCR de l'expression des aquaporines dans des cultures primaires de cellules constitutives de l'hypoderme et du derme chez l'homme.** (a) Dans les préadipocytes, seules l'AQP9 est détectée (taille attendue 664 pb), (b) alors que dans les adipocytes, l'AQP7 est amplifiée (720 pb). L'AQP1 est détectée aussi bien au niveau des fibroblastes (c) que des cellules endothéliales (d) (711 pb). *M* : marqueur de taille. 0-10 : amplicons obtenus par RT-PCR avec des amorces spécifiques des aquaporines 0 à 10 chez l'homme. (d'après Boury-Jamot et al, 2006)

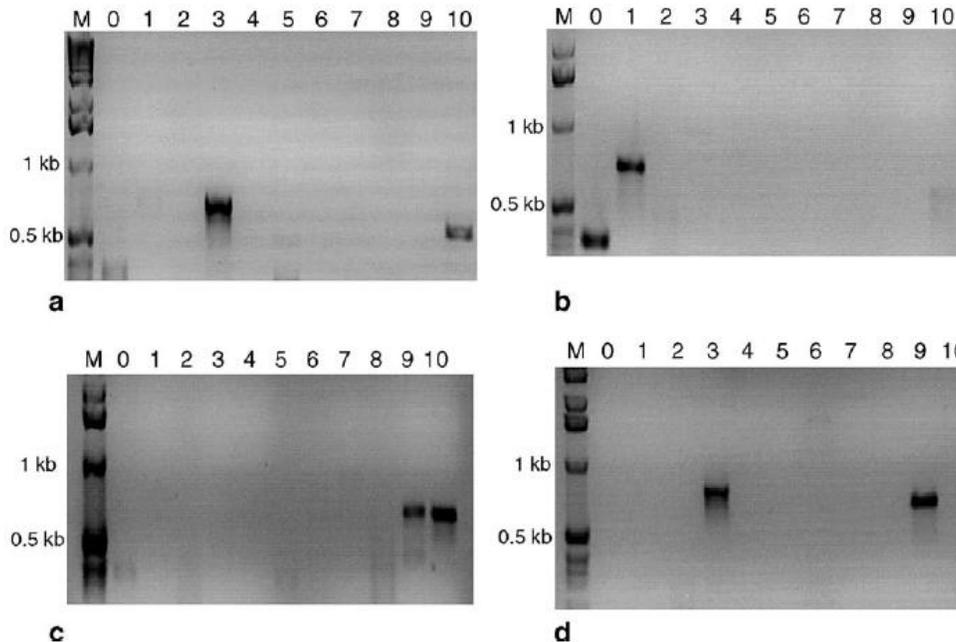
Concernant les cellules de l'hypoderme, alors que les préadipocytes expriment l'aquaporine 9 (Fig. III-1 a), les adipocytes, qu'ils soient matures ou non, expriment

l'aquaporine 7 (Fig. III-1 b). Pour le derme, seule l'ARNm de l'aquaporine 1 est amplifiée par RT-PCR au niveau d'extraits de fibroblastes et de cellules endothéliales (Fig. III-1 c et d). Les amplicons obtenus pour l'AQP1, l'AQP7 et l'AQP9 ont une taille apparente similaire à la taille attendue. Seul l'amplicon obtenu pour l'aquaporine 0 n'a pas la taille attendue. Afin de tester la spécificité de l'amplification, chaque amplicon est soumis à plusieurs digestions enzymatiques. Les produits de digestion sont ensuite analysés après migration sur gel d'agarose. Les résultats pour les amplicons obtenus à partir des amorces aquaporines 1 et 0 sont montrés dans la figure III-2 ci-dessous.



**Figure III-2. Digestion des amplicons AQP0 et AQP1 des cellules endothéliales.** Le fragment amplifié au niveau de l'AQP0 n'est pas digérée par les enzymes de restrictions BglIII et DraIII. L'amplicon AQP1 est digérée spécifiquement par BsrGI (taille attendue 492 pb) et SacII (564 pb). Les produits de digestion dont la taille est trop faible ne sont pas visibles sur le gel. *M* : marqueur de taille.

Pour le fragment d'ADN amplifié à partir des amorces spécifiques de l'AQP0 (Fig. III-2 *piste AQP0*), les deux digestions effectuées par les enzymes BglIII et DraIII restent sans effet. L'amplification obtenue ne correspond donc pas à l'AQP0. Pour l'AQP1, les digestions réalisées confirment son expression par les mélanocytes, sous forme d'ARNm. Ainsi on détecte une bande de 500 pb environ (Fig. III-2, *piste BsrGI*) correspondant au fragment généré par BsrGI dont la taille est la plus importante (492 pb). On observe également une bande de 550-600 pb (Fig. III-2, *piste SacII*), correspondant au fragment de 564 pb généré après digestion par l'endonucléase SacII. Hormis pour l'aquaporine 0, tous les amplicons obtenus se sont révélés spécifiques; les tailles apparentes des produits de digestions étant celles attendues.

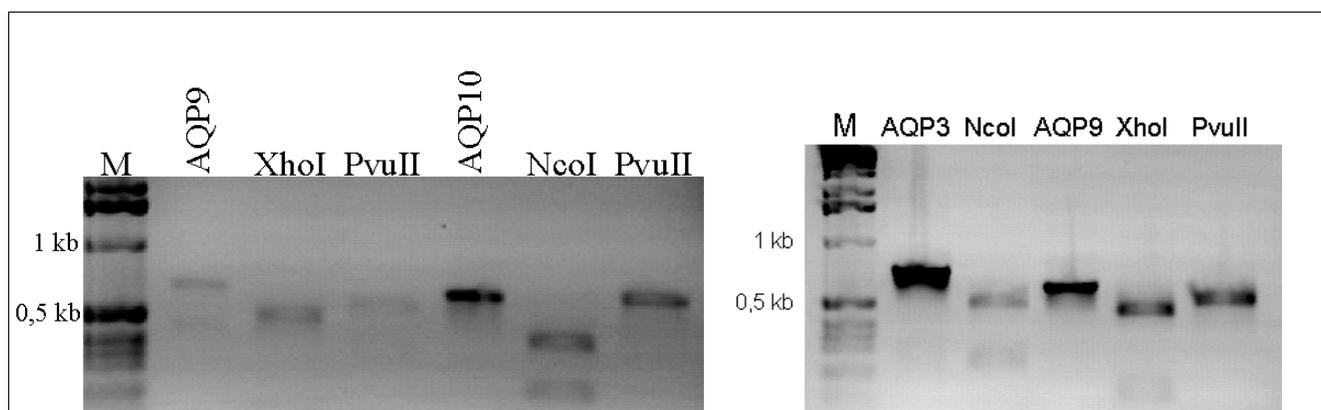


**Figure III-3. Analyse par RT-PCR de l'expression des aquaporines dans des cultures primaires de cellules constitutives de l'épiderme humain.** (a) Dans les kératinocytes, l'AQP3 et l'AQP10 sont détectées (tailles attendues respectives 781 et 651pb). (b) Dans les mélanocytes, l'AQP1 est amplifiée (711pb). (c) Dans les monocytes les AQPs 9 et 10 sont amplifiées (664 et 651pb respectivement), (d) alors que les MDDCs utilisées comme modèles de cellules de Langerhans expriment l'AQP3 et l'AQP9 (781 et 664pb respectivement). *M* : marqueur de taille. 0-10 : amplicons obtenus par RT-PCR avec des amorces spécifiques des aquaporines 0 à 10 chez l'homme. (d'après Boury-Jamot et al, 2006)

Comme nous l'avons vu en introduction, l'aquaporine 7 est importante pour le métabolisme du glycérol au niveau des adipocytes (*Hibuse et al, Hara-Chikuma et al, 2005*). Nous avons montré que l'AQP7 est exprimée dans les adipocytes immatures et matures comme l'on pouvait s'y attendre. Cependant cette aquaporine est absente des préadipocytes qui expriment à la place l'aquaglycéroporine 9. L'expression de l'AQP1 au niveau des fibroblastes est conforme aux résultats antérieurs obtenus pour d'autres espèces (*Nielsen et al, 1997 ; Leitch et al, 2001 et Minami et al, 2001*). Il en va de même pour les cellules endothéliales (*Nielsen et al, 1993 ; Mobasher et Marples, 2004 ; Devuyst et al, 2005*).

## 2.B. AU NIVEAU DE L'ÉPIDERME

La figure III-3 montre les résultats obtenus pour les cellules constitutives de l'épiderme. Au niveau des kératinocytes deux aquaporines sont exprimées, l'aquaporine 3 qui est fortement exprimée, mais également l'aquaporine 10 (fig. III-3 a). Seule l'aquaporine 1 est exprimée par les mélanocytes. Enfin alors que les monocytes expriment les aquaporines 9 et 10, les cellules dendritiques dérivées des monocytes (prises comme modèles des cellules de Langerhans) expriment les aquaporines 3 et 9. Comme le montre la figure ci-après (Fig. III-4), nous avons testé la spécificité des amplicons obtenus par digestion enzymatique. Les signaux observés dans la figure III-4 pour l'aquaporine 0 sont à nouveau non spécifiques. Concernant les aquaporines 1, 3, 9 et 10 exprimées par les différents types cellulaires de l'épiderme, elles apparaissent toutes comme spécifiques après digestion enzymatique. La figure montre les résultats obtenus pour les amplicons AQPs 3, 9 et 10 exprimés par les monocytes et les MDDCs



**Figure III-4. Digestion des amplicons AQP9 et AQP10 des monocytes et AQP3 et AQP9 des MDDCs.** L'AQP9 est digérée spécifiquement par XhoI (taille attendue 498pb et 167pb) et PvuII (101pb et 564pb). L'AQP10 est dégradée par NcoI en deux fragments de tailles attendues de 410pb et 241pb et par PvuII (582pb et 69pb). L'AQP3 est digérée par NcoI (521pb et 260pb). Les produits de digestion dont la taille est trop faible ne sont pas visibles sur le gel. *M* : marqueur de taille.

Pour les monocytes et les MDDCs, les données disponibles concernant l'expression des aquaporines sont contradictoires. Trois études différentes ont été réalisées sur l'expression des aquaporines par ce type cellulaire (*De Baey et al, 2000, Marchini et al, 2003 et Moon et al, 2004*). La première étude a porté sur l'expression des aquaporines 1, 2, 3, 7 et 9 au niveau des monocytes, et des MDDCs en culture (*De Baey et al, 2000*). Ils ont montré que les AQPs 1 et 2 ne sont pas exprimées et que les AQPs 3 et 7 sont exprimées au niveau des MDDCs immatures. Ils ont également montré que l'expression des AQPs 3 et 7 diminuait au cours de la maturation. La deuxième étude s'est intéressée à l'expression ex vivo des aquaporines 1 et 3 (*Marchini et al, 2003*). L'observation n'a porté que sur des cellules de Langerhans et seule l'AQP3 est exprimée. La dernière étude concerne l'expression des aquaporines 1, 2, 3, 5 et 8 dans des MDDCs immatures (*Moon et al, 2004*). Les auteurs ont relevé l'expression d'AQP3 et d'AQP5. Notre étude est la première à s'intéresser à l'expression de toutes les aquaporines pour ce type cellulaire. Les différences observées entre nos résultats et ceux des travaux antérieurs peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales différentes, notamment en ce qui concerne la méthode utilisée pour la maturation des MDDCs. Ainsi, la présence d'aquaporine 10 au niveau des monocytes n'avait jamais été testée et constitue une donnée nouvelle. L'AQP9 est exprimée de manière constante dans les monocytes et les MDDCs. L'AQP3 n'est exprimée que dans les MDDCs.

À notre connaissance, l'expression de l'aquaporine 1 par des mélanocytes n'a jamais été rapportée. Seule l'expression de l'aquaporine 1 au niveau de tissus a été étudiée (*Nielsen et al, 1997 et Mobasher et al, 2004*). Dans ces travaux, les auteurs n'ont pas trouvé d'expression d'aquaporine 1 au niveau de l'épiderme. Toutefois cela ne remet pas en cause notre résultat, puisque nous nous sommes intéressés à des cultures mélanocytaires pures et non à l'épiderme dans lequel les mélanocytes sont présents en minorité. L'expression de l'aquaporine 10 au niveau des kératinocytes est également une nouveauté. D'une manière générale, l'expression de l'aquaporine 10 n'avait encore jamais été étudiée au niveau des cellules de la peau humaine.

### 3. CONCLUSIONS

En résumé, 6 aquaporines différentes sont exprimées par les cellules de la peau, les aquaporines 1 et 5 (en prenant en compte leur présence au niveau des glandes sébacées et sudoripares) et les aquaglycéroporines 3, 7, 9, 10.

L'aquaporine 1 qui est strictement un canal hydrique, est exprimée par les fibroblastes et les cellules endothéliales et jouerait un rôle dans l'homéostasie hydrique. Ainsi il a été clairement démontré qu'au niveau péritonéal le passage de l'eau à travers l'AQP1 exprimée par les cellules endothéliales permet d'établir rapidement l'équilibre osmotique entre le sang et le péritoine (*Devuyst et al, 2005*). De la même manière, le rôle de l'AQP7 au niveau des adipocytes et du métabolisme du glycérol est bien établi. Concernant le rôle des aquaglycéroporines présentes au niveau des MDDCs, elles sembleraient permettre la régulation du volume cellulaire et être impliquées dans les mouvements d'eau lors de l'endocytose (*de Baey et al, 2000*).

Types cellulaires	Expressions attendues	Expressions trouvées
Préadipocytes	AQP7(?)	AQP9
Adipocytes	AQP7	AQP7
Cellules endothéliales	AQP1	AQP1
Fibroblastes	AQP1	AQP1
Monocytes	AQP9	AQP9 et AQP10
MDDCs immatures	AQP3, AQP5(?), AQP7(?) et AQP9	AQP3 et AQP9
MDDCs matures	AQP3(?), AQP7(?) et AQP9	AQP3 et AQP9
Mélanocytes	(?)	AQP1
Kératinocytes	AQP3	AQP3 et AQP10

Figure III-5. Résumé des résultats attendus et trouvés.

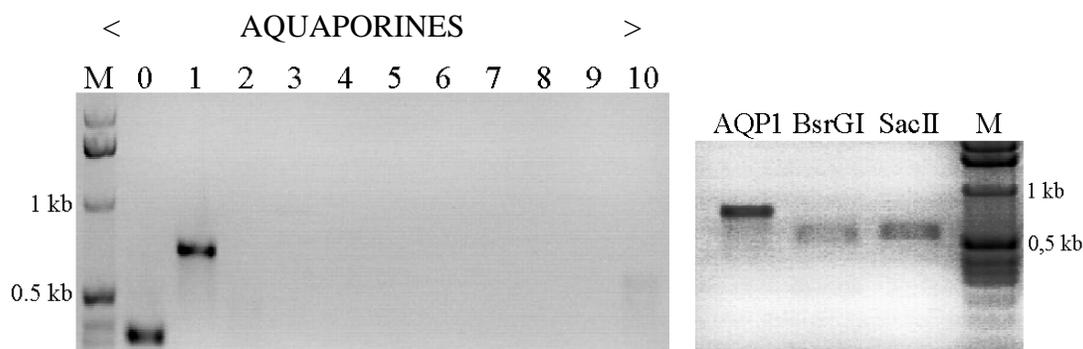
Enfin, le rôle de l'aquaporine 3 dans l'épiderme fait toujours débat (*Boury-Jamot et al, 2006 et 2009*), et est développé dans la partie V. Nous traitons également dans cette partie de l'expression de l'aquaporine 10. L'expression inattendue et la localisation de l'aquaporine 1 dans les mélanocytes fait l'objet de la prochaine partie.

# **IV. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 1 PAR LES MELANOCYTES**

# 1. EXPRESSION DANS DES CULTURES PRIMAIRES

## 1.A. INTRODUCTION

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques dont les prolongements sont au contact des kératinocytes. Ils sont présents en plus faible quantité au sein de l'épiderme mais répartis de manière régulière. Les mélanocytes produisent la mélanine contenue dans les mélanosomes qui sont ensuite transférés vers les kératinocytes via ces prolongements dendritiques (cf. introduction). Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, nous avons mis en évidence l'expression de l'ARNm de l'AQP1 par RT-PCR dans des cultures primaires de mélanocytes humains (figure IV-1).



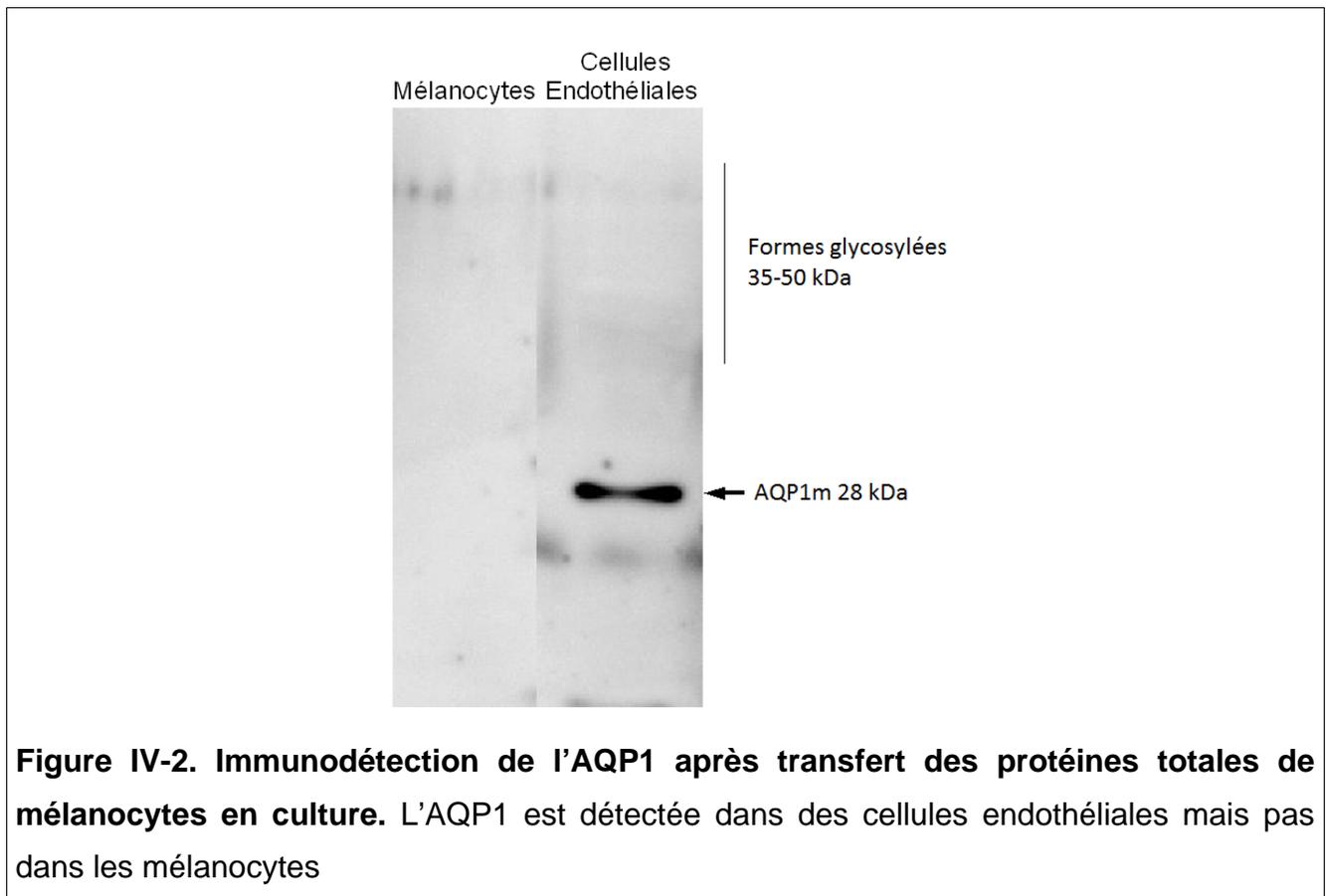
**Figure IV-1. Analyse de l'expression des gènes des aquaporines au niveau des mélanocytes.** Deux amplicons sont obtenus pour les AQPs 0 et 1. La taille apparente de l'AQP1 (750pb) semble correspondre avec la taille attendue (711pb). Pour l'AQP0, la taille apparente (300pb) est bien inférieure au fragment attendu (652pb). L'amplification est non spécifique. Le fragment AQP1 est digéré spécifiquement par BsrGI (taille attendue 492pb) et par SacII (564pb). Les produits de digestion dont la taille est trop faible ne sont pas visibles sur le gel. *M : marqueur de taille. 0-10 : amplicons obtenus par RT-PCR avec des amorces spécifiques des aquaporines 0 à 10 chez l'homme.*

Jusqu'à présent aucune étude ne s'était intéressée à l'expression des aquaporines par les mélanocytes et au vu de nos résultats positifs, nous avons voulu étudier davantage

l'expression de l'aquaporine 1 dans ces cellules. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé de poursuivre notre étude sur les mêmes cultures primaires de mélanocytes humains.

## 1.B. EXPRESSION PROTEIQUE

Après avoir mis en évidence la transcription de l'aquaporine 1 nous avons recherché son expression protéique par les mélanocytes. Pour ce faire, des extraits de protéines totales de mélanocytes et de cellules endothéliales en culture ont été réalisés.



Puis nous avons effectué ensuite des western blot puis une immunodétection de l'aquaporine 1. Les cellules endothéliales sont connues pour exprimer l'aquaporine 1 (*Hasegawa et al, 1994*) et sont prises ici comme contrôle. Comme on peut le voir sur la figure IV-2, une bande caractéristique de 28 kDa est détectée dans l'extrait des protéines totales de cellules endothéliales alors qu'aucune bande n'est détectée dans l'extrait de protéines totales de mélanocytes.

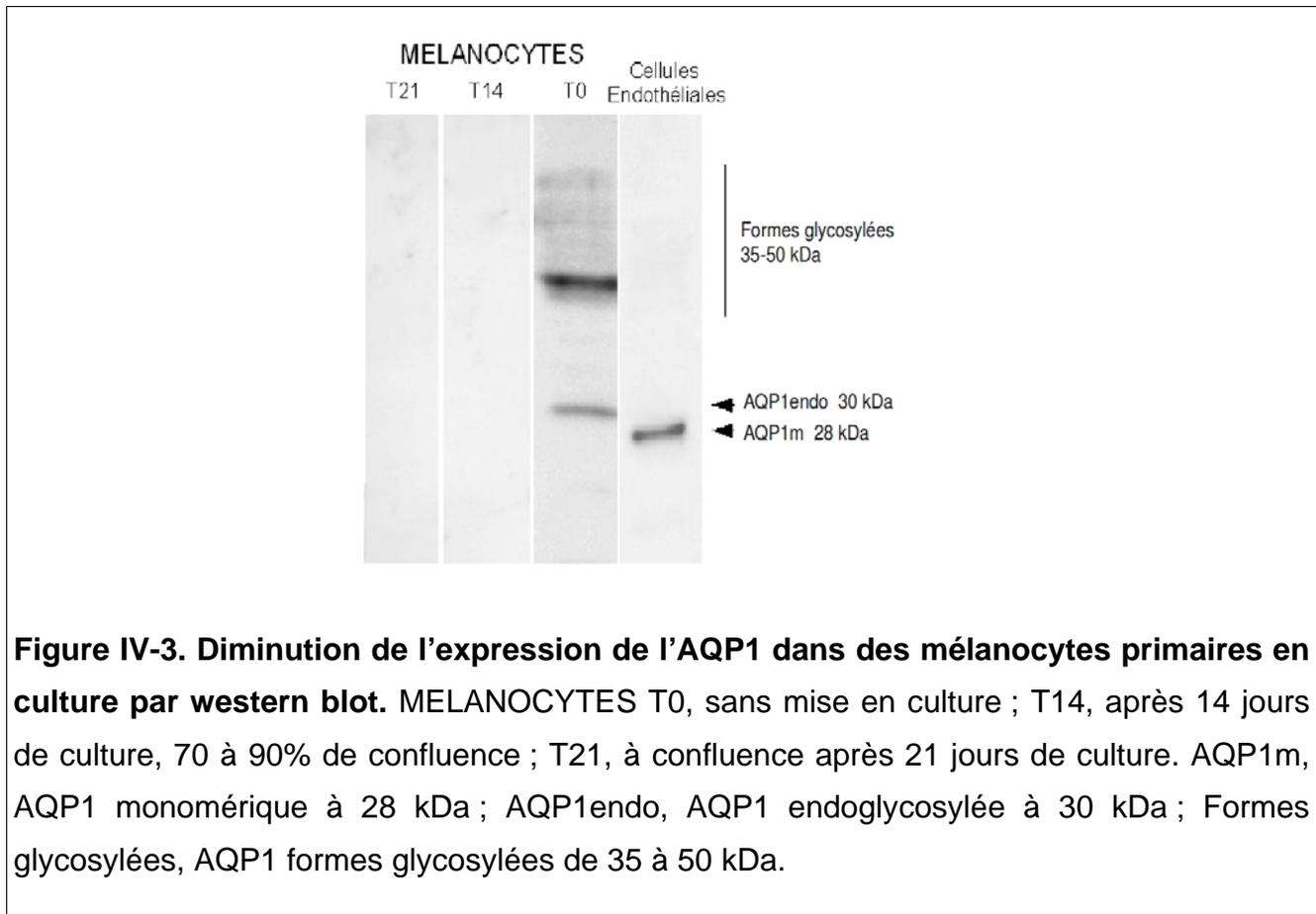
Cependant les conditions de culture ne reflètent pas l'environnement naturel auquel sont soumis les mélanocytes au sein de l'épiderme. De plus, il a été montré que les conditions de cultures notamment le temps de culture pour certaines cellules primaires induisait des variations du protéome (*Boess et al, 2003*).

Nous avons alors étudié les effets potentiels liés à la culture cellulaire en diminuant le temps de culture de nos cellules (fournisseur : Promocell ; mélanocytes : NHEM). Nous avons testé trois temps de culture différents avant de réaliser l'extraction des protéines totales et de tester l'expression de l'aquaporine 1. Au temps t0, nous n'avons pas cultivé les cellules, l'extraction est réalisée dès réception des mélanocytes. Au temps t14, les protéines totales sont extraites après 14 jours de culture, les mélanocytes sont alors proches de la confluence (entre 70 et 90% de confluence). Ce temps de culture est recommandé par le fournisseur pour le repiquage des cellules. Au temps t21, l'extraction est réalisée sur des cultures de mélanocytes pleinement confluentes. La figure IV-3 montre les résultats obtenus après western blot et immunodétection de l'aquaporine 1. Les cellules endothéliales présentes à l'extrémité du gel sont prises comme témoin de l'expression de l'AQP1 en culture. On détecte dans ces cellules la forme monomérique de l'AQP1 à 28 kDa. On remarque qu'une bande AQP1 est détectée pour l'extrait de protéines totales sans mise en culture des mélanocytes (t0). À 14 jours de culture, aucune bande n'est visible (t14), il en va de même en prolongeant le temps de culture (t21).

On peut remarquer également que l'AQP1 exprimée par les mélanocytes à t0 a une masse apparente légèrement supérieure à la bande spécifique AQP1 de 28 kDa exprimée par les cellules endothéliales. Les premières études sur l'AQP1 (Preston et al, 1993) ont montré qu'un profil similaire était lié à une glycosylation anormale de la protéine, l'endoglycosylation qui s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique. Un traitement par l'endoglycosidase H (Endo H) permet de rétablir le profil caractéristique de l'AQP1 à 28 kDa (non montré). L'aquaporine 1 exprimée est donc endoglycosylée. On remarque également une bande entre 35 et 50 kDa correspondant aux formes glycosylées de l'AQP1 à t0. Cela indique que l'AQP1 poursuit la maturation à travers la voie sécrétoire, pour être adressée à la membrane plasmique, mais qu'une part de ces AQP1 est vraisemblablement retenue partiellement au niveau du réticulum endoplasmique des mélanocytes primaires en culture.

Bien que l'expression nucléique (ARNm) reste constante au cours du temps, les prélèvements d'ARNm étant réalisés après au minimum 21 jours et après plusieurs

repiquages des cellules, l'expression protéique diminue rapidement en culture cellulaire. Nos résultats montrent donc une expression de la protéine AQP1 seulement dans les mélanocytes quasi natifs (t0).



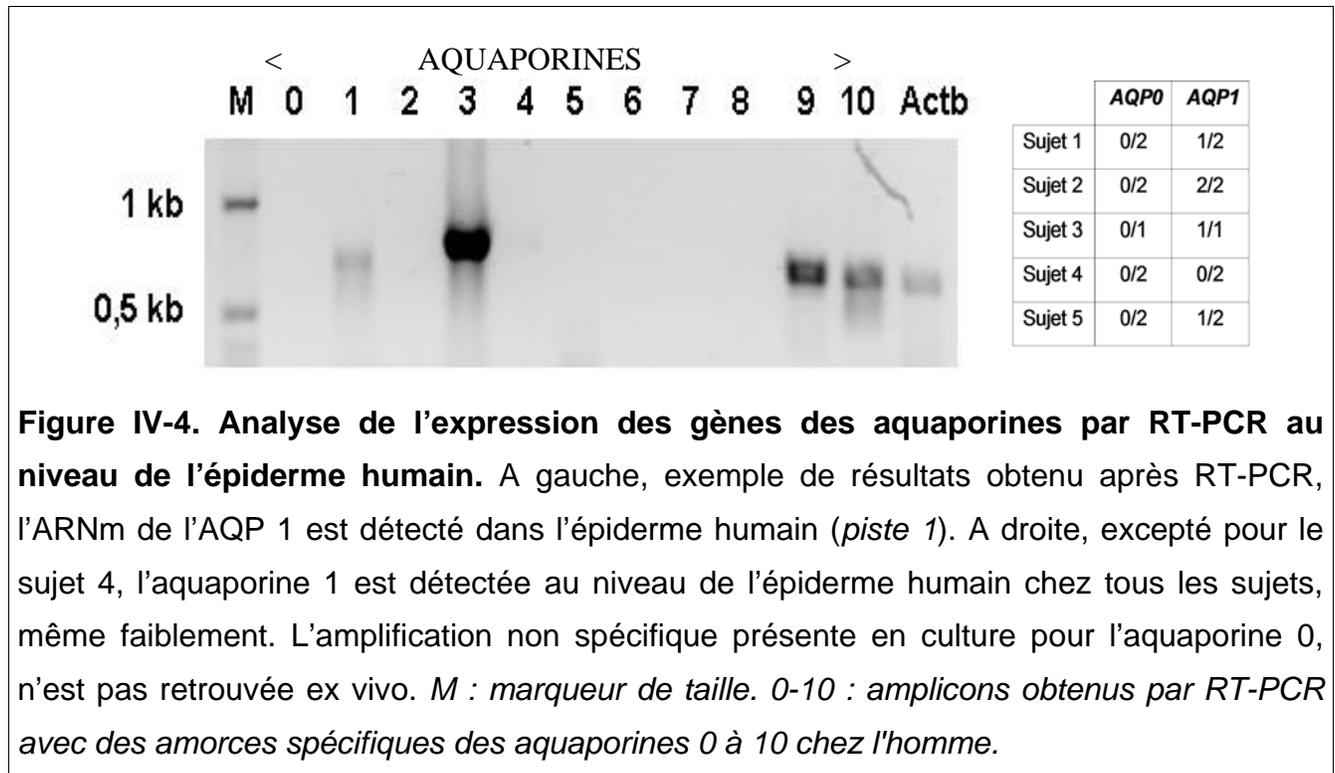
**Figure IV-3. Diminution de l'expression de l'AQP1 dans des mélanocytes primaires en culture par western blot.** MELANOCYTES T0, sans mise en culture ; T14, après 14 jours de culture, 70 à 90% de confluence ; T21, à confluence après 21 jours de culture. AQP1m, AQP1 monomérique à 28 kDa ; AQP1endo, AQP1 endoglycosylée à 30 kDa ; Formes glycosylées, AQP1 formes glycosylées de 35 à 50 kDa.

## 2. EXPRESSION DANS L'ÉPIDERME HUMAIN

### 2.A. EXPRESSION DE L'ARNm AQP1

Nous avons réalisé des RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux d'épidermes provenant de 5 patients. Comme nous pouvons le voir sur la figure IV-4, l'AQP1 est bien transcrite au niveau de l'épiderme humain. Le fragment généré avec nos amorces a une taille approximative de 750pb et comme précédemment les digestions BsrGI et SacII réalisées confirme qu'il s'agit de l'AQP1. Chez tous les patients sauf un, l'AQP1 a été détectée.

Toutefois, le résultat obtenu pour l'expression des autres aquaporines chez ce patient (sujet 4) suggère que la préparation de l'échantillon ne contient que des kératinocytes (cf. parties V et VI). Les résultats obtenus avec le sujet 4 ne sont donc pas pertinents dans le cas présent. Chez tous les patients l'aquaporine 1 est détectée, ce qui suggère que cette aquaporine est naturellement présente dans l'épiderme humain. On peut également voir sur la figure IV-4 que l'amplification non spécifique de l'AQP0 n'est pas détectée ex vivo, alors qu'elle est retrouvée systématiquement en culture (cf. figure IV-1)

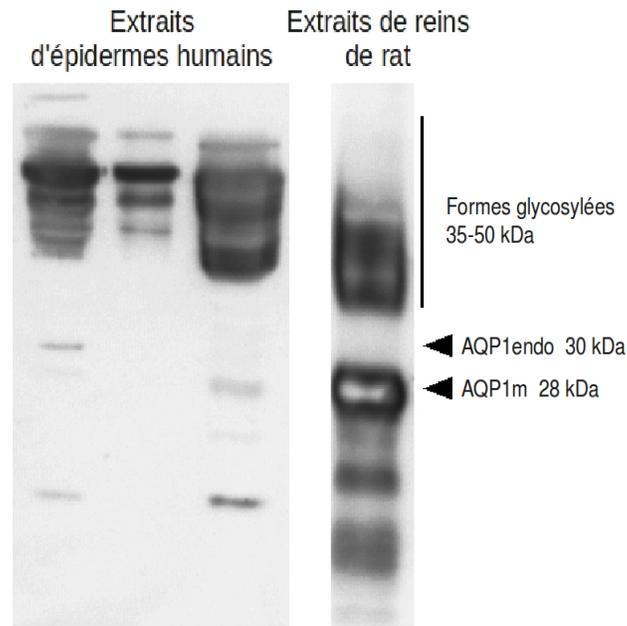


## 2.B. EXPRESSION DE LA PROTEINE AQP1

Pour confirmer l'expression de la protéine AQP1 dans l'épiderme humain nous avons réalisé une série de western blot sur des extraits de protéines totales d'épiderme humain de 3 nouveaux patients. L'immunotransfert révèle la présence de l'AQP1. La figure IV-5 montre les trois profils d'expression de l'AQP1 obtenus par immunodétection. On peut remarquer également une disparité importante entre les sujets.

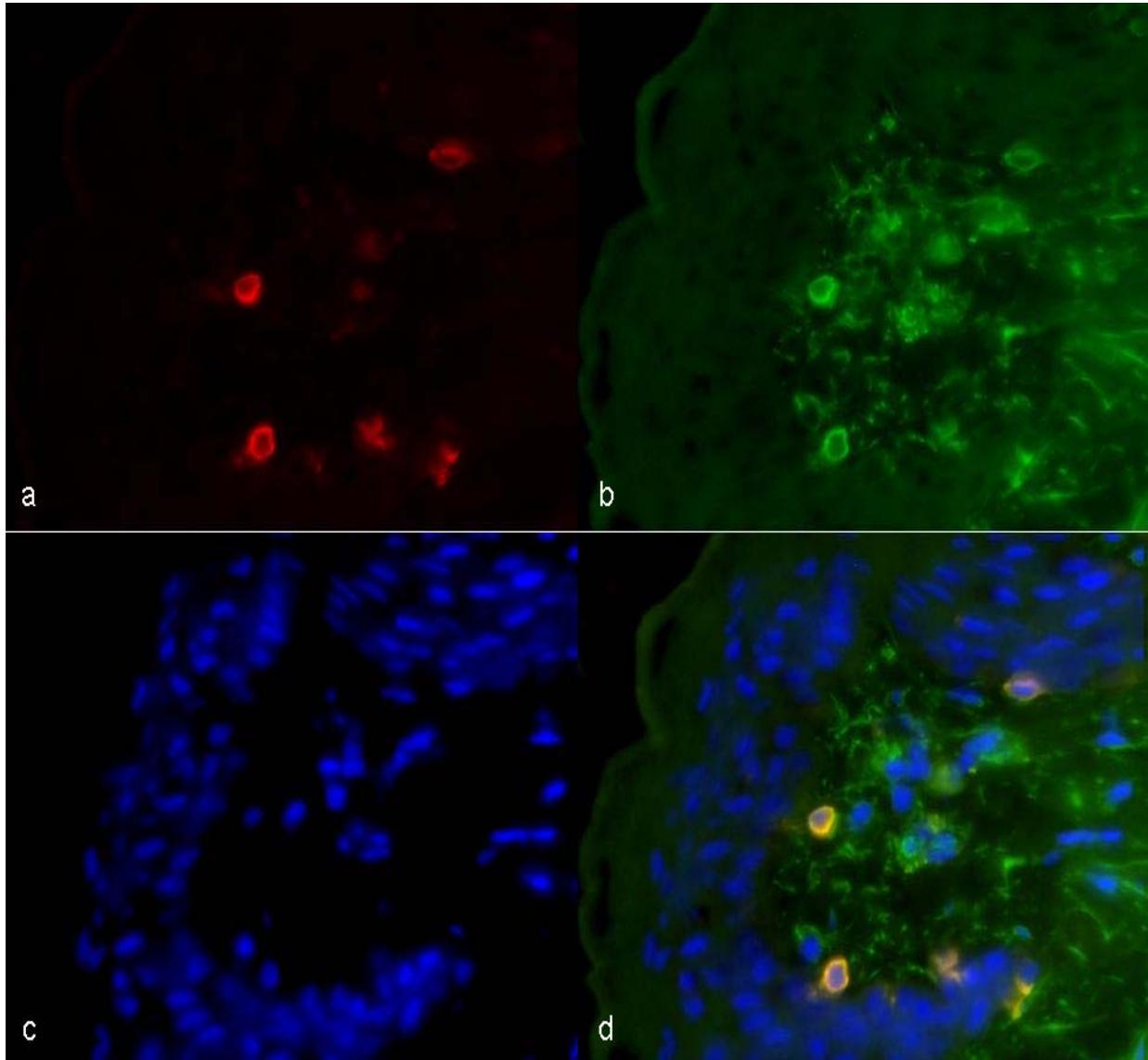
Les trois profils d'expressions obtenus sont différents, l'AQP1 apparaît cependant majoritairement sous sa forme glycosylée.

Cependant les méthodes de préparation des extraits d'épiderme aussi bien nucléiques que protéiques ne nous permettent pas d'exclure une contamination de ces extraits d'épidermes (mélanocytes et kératinocytes principalement) par des fibroblastes, des cellules provenant du derme. Nous ne pouvons pas alors affirmer avec certitude que l'aquaporine 1 révélée est exclusivement exprimée par des mélanocytes.



**Figure IV-5. Immunodétection de l'AQP1 dans l'épiderme humain.** L'AQP1 est naturellement exprimée dans l'épiderme humain. A gauche sur trois extraits différents de protéines totales, l'AQP1 est principalement détectée sous formes glycosylées entre 35 et 50 kDa. Seul un témoin présente une AQP1 endoglycosylée (AQP1endo). A droite, au niveau du rein de rat pris comme témoin de l'expression de l'AQP1, la forme native de 28 kDa (AQP1m) aussi bien que les formes glycosylées sont détectées (35-50 kDa). Le profil de glycosylation est cependant quelque peu différent chez le rat comparé à l'humain.

### 3. LOCALISATION DE L'AQUAPORINE 1



**Figure IV-6. Immunofluorescence dirigée contre l'AQP1 et TRP1 sur des coupes d'épidermes humains.** (a) En rouge, marquage des mélanocytes par un anticorps dirigé contre TRP1. (b) En vert marquage dirigé contre l'AQP1. (c) En bleu marquage des noyaux cellulaires au Hoechst. (d) La superposition révèle la colocalisation de l'AQP1 et de TRP1 dans les mélanocytes.

Du fait du faible niveau d'expression de l'AQP1 dans les mélanocytes primaires en culture, nous avons décidé d'étudier sa localisation ex vivo au niveau de coupe d'épiderme humain.

Nous avons pour cela réalisé une double immunofluorescence dirigée contre TRP-1 (cf. introduction), un marqueur spécifique des mélanocytes et l'aquaporine 1. La figure IV-6 montre les marquages réalisés. TRP-1 est marquée en rouge (a), l'AQP1 en vert (b) et en bleu un marquage des noyaux cellulaires au Hoechst (c). On remarque une colocalisation de l'AQP1 avec TRP-1 au sein des mélanocytes (d). L'expression protéique de l'AQP1 par les mélanocytes est donc confirmée. Nous n'avons pas pu étudier la localisation intracellulaire de l'AQP1 par microscopie électronique sur des coupes d'épidermes humains du fait de la faible proportion de mélanocytes (cf. introduction). Nous avons donc recherché de nouveaux modèles expérimentaux afin de poursuivre notre étude sur l'expression et la localisation de l'AQP1 dans les mélanocytes

## 4. RECHERCHE D'UN MODELE EXPERIMENTAL

### 4.A. LES CELLULES MNT-1

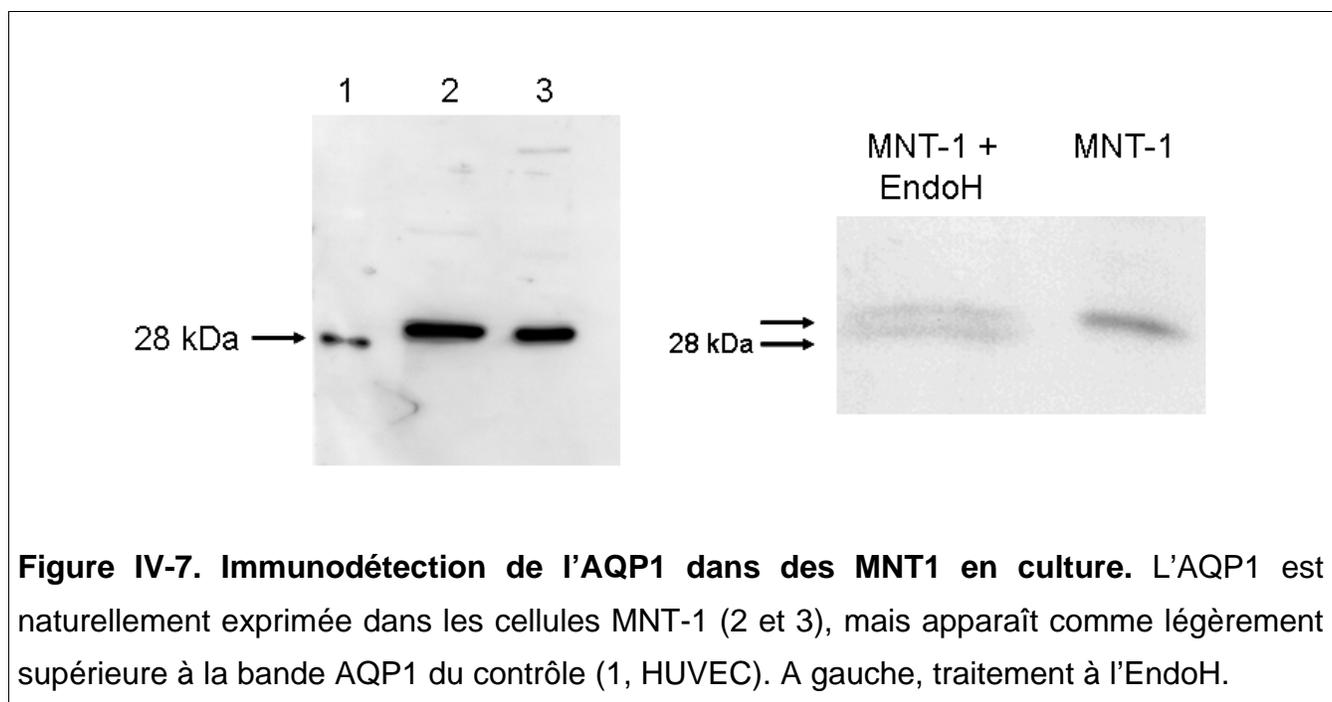
Le premier modèle est l'utilisation d'une lignée mélanocytaire à la place des cultures primaires. L'utilisation d'une lignée permet d'obtenir plus facilement et plus rapidement du matériel à tester.

Nous avons choisi la lignée de mélanocytes MNT-1. Il s'agit d'une lignée tumorale de mélanocytes humains hyperpigmentés. Cette lignée est couramment utilisée pour étudier la synthèse de la mélanine, la maturation et le trafic des mélanosomes (*Dell'Angelica et al, 2000 ; Raposo et al et Kushimoto et al, 2001 ; Theos et al, 2005 et 2006*).

La figure IV-7 montre l'immunodétection de l'AQP1 dans des extraits de protéines totales de MNT-1. Comme nous pouvons le voir, la bande AQP1 obtenue pour les extraits de MNT-1 est légèrement supérieure à la bande de 28 kDa caractéristique de l'AQP1 obtenue chez le témoin. Comme pour les mélanocytes primaires en culture, une bande à 28 kDa est obtenue après un traitement à l'EndoH effectuée sur les extraits de protéines totales de MNT-

1. Cette bande légèrement supérieure retrouvée chez les MNT-1 résulte d'une endoglycosylation. Ne détectant que de l'aquaporine 1 endoglycosylée, contrairement au tissu épidermique, nous devons en conclure que le métabolisme de l'AQP1 est perturbé dans les cellules MNT-1. Nous supposons que le trafic de l'AQP1 dans ces cellules est anormal, majoritairement endoglycosylée au niveau du réticulum endoplasmique, l'AQP1 pourrait y être stockée ou amenée vers des voies de dégradation.

Le profil d'expression de l'AQP1 obtenu avec les cellules MNT-1 étant trop différent de ce que nous observions ex vivo, nous avons testé un deuxième modèle expérimental.



#### 4.B. L'EPIDERME RECONSTRUIT PIGMENTE.

Nous avons utilisé comme deuxième modèle des épidermes reconstruits pigmentés (RHPE, SkinEthic). Ces épidermes sont composés de kératinocytes différenciés et de mélanocytes situés au niveau de la couche basale. Les mélanocytes conservent leur capacité à synthétiser et à transférer la mélanine aux kératinocytes via leurs dendrites. Ils sont couramment utilisés pour des tests de pigmentation ou de dépigmentation, comme la réponse aux UV ou à l'application de produits dépigmentant.

Nous avons d'abord réalisé des extraits d'ARNm pour tester l'expression de l'AQP1 dans les mélanocytes de ces épidermes reconstruits. Comme pour l'épiderme humain, nous observons l'expression d'ARNm de l'aquaporine 1 par les mélanocytes et aucune amplification non spécifique n'est détectée pour l'aquaporine 0. Comme on peut le voir sur la figure IV-8, par RT-PCR, nous avons systématiquement obtenu un amplicon spécifique de l'AQP2, malgré l'absence d'AQP2 dans l'épiderme humain natif.

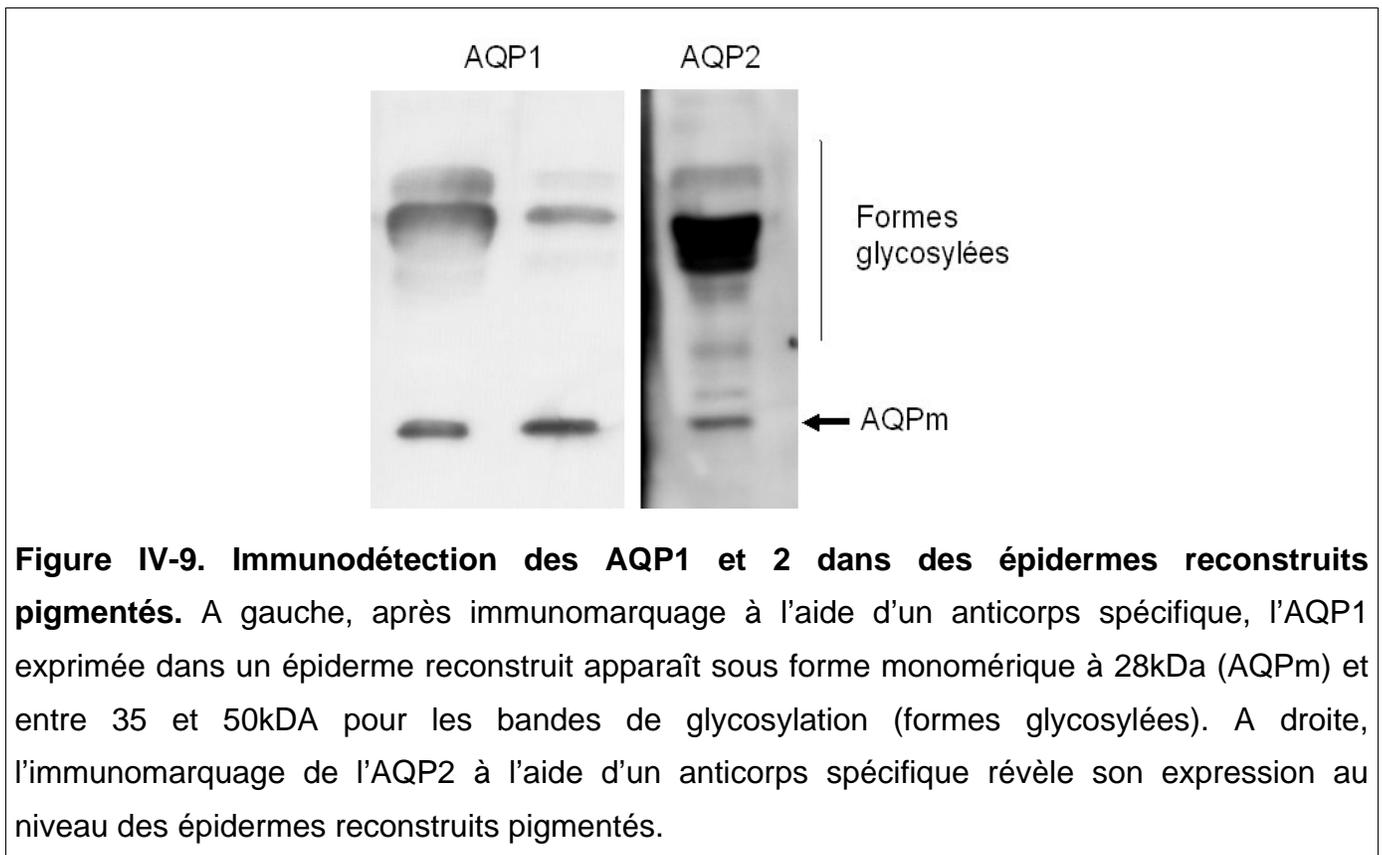
	AQP0	AQP1	AQP2
Épidermes reconstruits (n=6)	0/2	2/2	1/2
Épidermes reconstruits (n=5)	0/2	2/2	2/2

**Figure IV-8. Expression des ARNm des AQPs 0, 1 et 2 au niveau des épidermes reconstruits pigmentés.** Deux extraits regroupant six et cinq épidermes reconstruits différents ont été testés par RT-PCR pour l'expression des aquaporines. L'ARNm de l'AQP1 et de l'AQP2 est spécifiquement détecté.

Nous avons ensuite testé l'expression protéique de l'aquaporine 1. Comme on peut le voir sur la figure IV-9, l'aquaporine 1 est bien détectée par western blot. Nous observons une bande d'une taille approximative de 28 kDa et des bandes de glycosylation comprise entre 35 et 50 kDa. Ce profil d'expression se rapproche davantage de ce qui est obtenu ex-vivo (cf. figure IV-5).

Par ailleurs à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'AQP2, nous avons pu mettre en évidence son expression par western blot (cf. figure IV-9). Nous détectons ainsi la présence d'une bande à 28 kDa environ et des formes glycosylées. Cette aquaporine totalement absente dans l'épiderme humain est donc présente dans ces modèles. On peut supposer que la méthode d'obtention ou de culture de tels épidermes est en cause. Malheureusement en microscopie à fluorescence ou électronique, ces épidermes reconstruits ne présentent pas d'avantage comparé à l'épiderme humain natif dont ils ne sont qu'une

reproduction. De ce fait nous avons décidé d'écarter ce modèle expérimental pour notre étude de l'expression et de la localisation de l'aquaporine 1 dans les mélanocytes.



## 5. CONCLUSION

Nous avons montré que l'AQP1 est exprimée par les mélanocytes en culture in vitro. L'aquaporine 1 est transcrite en culture cellulaire et nous avons montré que l'expression de la protéine AQP1 diminuait en culture cellulaire d'une manière dépendante du temps de culture. De plus l'AQP1 exprimée par les mélanocytes en culture cellulaire est partiellement endoglycosylée. Enfin nous avons démontré que l'AQP1 était exprimée in vivo par les mélanocytes dans l'épiderme.

De nombreux rôles sont envisageables pour l'AQP1 dans les mélanocytes. L'AQP1 est généralement exprimée de manière constitutive à la membrane plasmique des cellules et non

à la membrane des organites intracellulaires. Cependant les mélanosomes sont initialement formés par endocytose de la membrane plasmique et pourraient donc aussi exprimer de l'AQP1. Ainsi localisée au niveau des mélanosomes, l'AQP1 pourrait intervenir dans la formation ou le transfert de la mélanine et des mélanosomes (*Jeremic et al, 2005, Sugiya et al, 2008, et Arnaoutova et al, 2008*). Cependant dans la lignée hyperpigmentée MNT-1, qui contient de nombreux mélanosomes, nous n'avons pu révéler de surexpression de l'AQP1. D'après de récentes études les aquaporines jouent un rôle dans la motilité cellulaire (cf. introduction), si l'AQP1 est localisée à l'extrémité des dendrites, elle pourrait en assurer la motilité, ou faciliter le transfert des mélanosomes.

Les mélanomes sont des tumeurs malignes développées à partir des mélanocytes. Dans les pays occidentaux, le mélanome voit son incidence doubler tous les dix ans et ce depuis cinquante ans. Les aquaporines (*Verkman et al, 2008*) et notamment l'aquaporine 1 (*Aishima et al, 2007 ; Mazal et al, 2005 ; Hoque et al, 2006*) semblent être impliquées dans la prolifération et la migration des cellules tumorales (*Verkman, 2005 ; Hu et al, 2006 et Papadopoulos et al, 2008*). Bien que nous ayons utilisé la lignée de mélanocytes tumoraux MNT-1 sans apercevoir de corrélation entre migration cellulaire et expression de l'AQP1, il conviendrait d'étudier l'expression de l'AQP1 dans de nouvelles lignées de mélanomes.

Quoiqu'il en soit, en raison de sa faible expression et de sa haute perméabilité hydrique (*Zeidel et al, 1992 et 1994*) nous pensons que le rôle probable de cette aquaporine au niveau des mélanocytes est l'équilibre hydrique avec le milieu extérieur et les kératinocytes environnants qui expriment eux aussi des aquaporines.

# **V. EXPRESSION DES AQUAPORINES PAR DES KERATINOCYTES**

## 1. INTRODUCTION

Nous avons mis en évidence dans la partie III, l'expression par les kératinocytes en culture de l'ARNm de l'AQP10 (*Boury-Jamot et al, 2006*). Les kératinocytes expriment donc deux aquaglycéroporines, AQP3 et AQP10.

L'AQP10 a été découverte relativement récemment (*Hatakeyama et al, 2001*) et a donc été moins étudiée. Elle est ainsi absente des études antérieures sur l'expression des aquaporines dans l'épiderme aussi bien chez l'homme (*Sougrat et al, 2002*) que chez la souris (*Ma et al, 2002*). De plus l'AQP10 de souris est un pseudogène et la protéine n'est pas exprimée (*Morinaga et al, 2002*). Chez l'homme il existe deux variants exprimés de l'AQP10, un variant court non fonctionnel et un variant long fonctionnel (*Li et al, 2005*). Cependant aucun rôle physiologique n'a encore été décrit pour ce variant court (*Ishibashi, 2009*). Quant au variant long, il a été identifié au niveau de l'intestin grêle. Localisé à la membrane apicale des entérocytes, l'AQP10 permettrait l'entrée d'eau et de petits solutés au niveau des villosités de l'intestin grêle (*Mobasher et al, 2004*).

L'expression de l'AQP3 par les kératinocytes a d'abord été identifiée chez le rat (*Frigeri et al, 1995*), puis chez la souris (*Ma et al, 2002*) et enfin chez l'homme (*Sougrat et al, 2002*). Les études conduites chez la souris ont montré que le glycérol était le substrat important pour assurer l'hydratation de l'épiderme.

Quant à l'AQP9, elle a clairement été identifiée chez la souris au niveau des kératinocytes de la couche granulaire (*Rojek et al, 2007*). L'ARNm de l'aquaporine 9 humaine est exprimé dans les kératinocytes différenciés en culture (cellules HaCaT, *Sugiyama et al 2001*). La détection protéique de l'AQP9 dans des cultures primaires de kératinocytes et au niveau de l'épiderme humain n'a jamais été réalisée. Nous-même n'avons pu détecter l'ARNm de l'AQP9 sur des cultures primaires de kératinocytes. Cependant lors de notre première étude où seules l'AQP3 et l'AQP10 étaient exprimées dans les kératinocytes primaire en culture, nous n'avons pris en compte que l'expression des aquaporines au niveau de kératinocytes en prolifération.

Les kératinocytes sont présents sous différents états dans l'épiderme natif (cf. introduction). En prolifération au niveau de la couche basale, les kératinocytes se différencient en migrant vers les couches supérieures de l'épiderme. Le calcium est un acteur clef de la différenciation des kératinocytes. Il est présent à travers l'épiderme et de plus en plus concentré à mesure que l'on remonte vers les couches supérieures de l'épiderme. L'ajout de calcium dans le milieu de culture induit la différenciation des kératinocytes (*Hennings et al, 1980 et Boyce et al, 1983*). C'est par ce procédé que l'ARNm de l'AQP9 a été détecté dans les cellules HaCats (*Sugiyama et al, 2001*). Il a été également montré sur des cultures primaires de kératinocytes murins que l'expression de l'AQP3 était inhibée par l'ajout de calcium extracellulaire (*Zheng et al, 2003*).

Nous nous intéressons dans cette partie à l'expression de ces trois aquaporines par les kératinocytes humains. Nous reviendrons sur le rôle de l'AQP3 au niveau de l'épiderme humain, structurellement différent de l'épiderme murin. Nous essayerons de valider la présence protéique de l'AQP10 en culture et ex vivo, mais également celle de l'AQP9. Nous étudierons également les effets sur l'expression de ces trois aquaporines lors de la différenciation induite par le calcium.

## 2. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 3

La première étude menée sur les souris invalidées pour l'aquaporine 3 a montré que ces souris présentaient une peau sèche (*Ma et al, 2002*). La couche cornée contient moins d'eau et moins de glycérol et présente une détérioration de son élasticité et de son imperméabilité. De plus l'épiderme de ces souris se régénère moins bien suite à des lésions. Les analyses effectuées par la suite sur le phénotype de ces souris AQP3<sup>-/-</sup> ont abouti progressivement à la conclusion que le transport par l'aquaporine 3 de glycérol et non d'eau est important pour la physiologie de la peau (*Hara et al, 2002 et 2003 et Hara-Chikuma et Verkman, 2005*). En bref, l'application de glycérol sur la peau de ces souris corrige le phénotype observé. Il y a restauration du contenu en eau et de l'élasticité de la couche cornée. Le glycérol est connu depuis des siècles pour améliorer l'hydratation de la peau et couramment utilisé dans la fabrication des cosmétiques (*Nardello-Rataj et al, 2008*). Alors

que l'exposition à une atmosphère saturée en eau ne produit aucun effet. Il est bien établi qu'une exposition prolongée à l'eau est néfaste pour la peau. Qui n'a pas eu les doigts ridés en sortant d'un bain ? *Warner et al (1999 et 2003)* ont expliqué ce phénomène : l'eau détruit l'ultrastructure de la couche cornée.

Structurellement l'épiderme murin est différent de l'épiderme humain. On peut voir que l'épiderme murin est remarquablement fin (fig. V-2-a) comparé à l'épiderme humain (fig. V-1-c). La couche épineuse entre la couche basale et la couche granuleuse est quasiment inexistante dans l'épiderme murin. De plus comme nous l'avons vu précédemment des différences d'expression des aquaporines existent entre l'épiderme murin et l'épiderme humain. Notre équipe s'intéresse à l'épiderme humain. Nous avons donc décidé d'étudier les conséquences d'un manque d'AQP3 à l'endroit où elle est normalement présente, les couches profondes, dans un épiderme aussi épais que celui de l'homme.

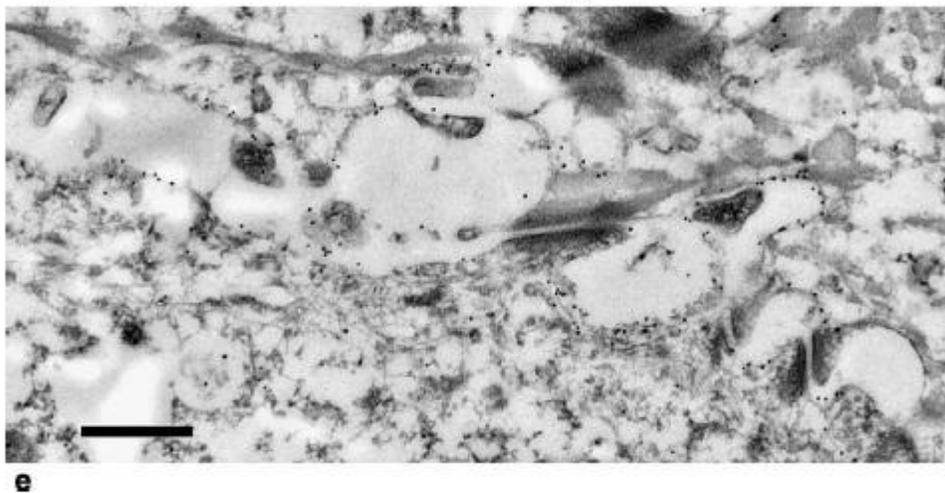
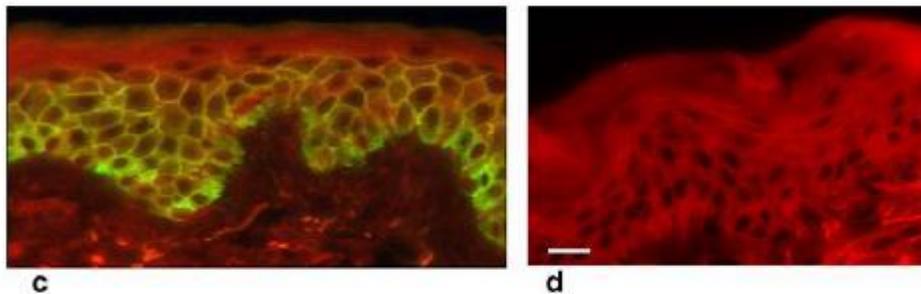
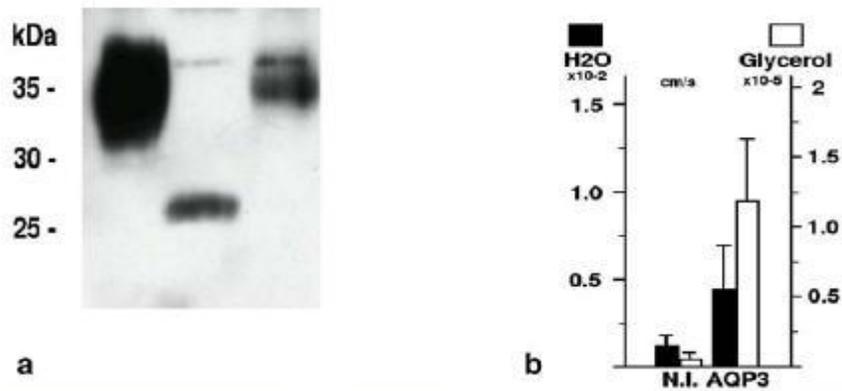
Comme on l'a vu précédemment, l'équipe a montré l'expression de l'AQP3 au niveau des kératinocytes humains en culture et dans l'épiderme. La figure V-1, résume les résultats obtenus par *Sougrat et al (2002)*. Brièvement, l'AQP3 est exprimée et fonctionnelle pour le transport d'eau et de glycérol (fig. V-1-a, -b) Elle est présente dans l'épiderme au niveau de la couche basale et de la couche épineuse. Elle disparaît au niveau de la couche granuleuse et est absente de la couche cornée (fig. V-1-c). Ce n'est donc pas la couche à étudier en premier dans un phénotype AQP3 *-/-*. Enfin L'AQP3 est localisée par microscopie électronique au niveau de la membrane plasmique (fig. V-1-d). L'équipe a démontré que l'AQP3 permettait l'hydratation de l'épiderme via un transport d'eau (*Sougrat et al, 2002*). *Agren et al (2003)* suggèrent également une perte en eau trans-épidermale via l'aquaporine 3.

Intéressons-nous maintenant aux effets d'une délétion de l'AQP3 au niveau de l'épiderme. On ne distingue à l'échelle de la microscopie optique aucune différence morphologique entre un épiderme murin sauvage et un épiderme murin invalidé pour l'AQP3 (fig. V-2, a vs. b). On remarque cependant que l'AQP3 est localisée dans une seule couche de cellules au niveau de la couche basale dans l'épiderme murin (fig. V-2-a), alors qu'elle est présente dans plusieurs couches de cellules dans l'épiderme humain (fig. V-1-c). L'épiderme murin peut-il être épaissi ? Oui, l'hyperplasie de l'épiderme peut être obtenue après

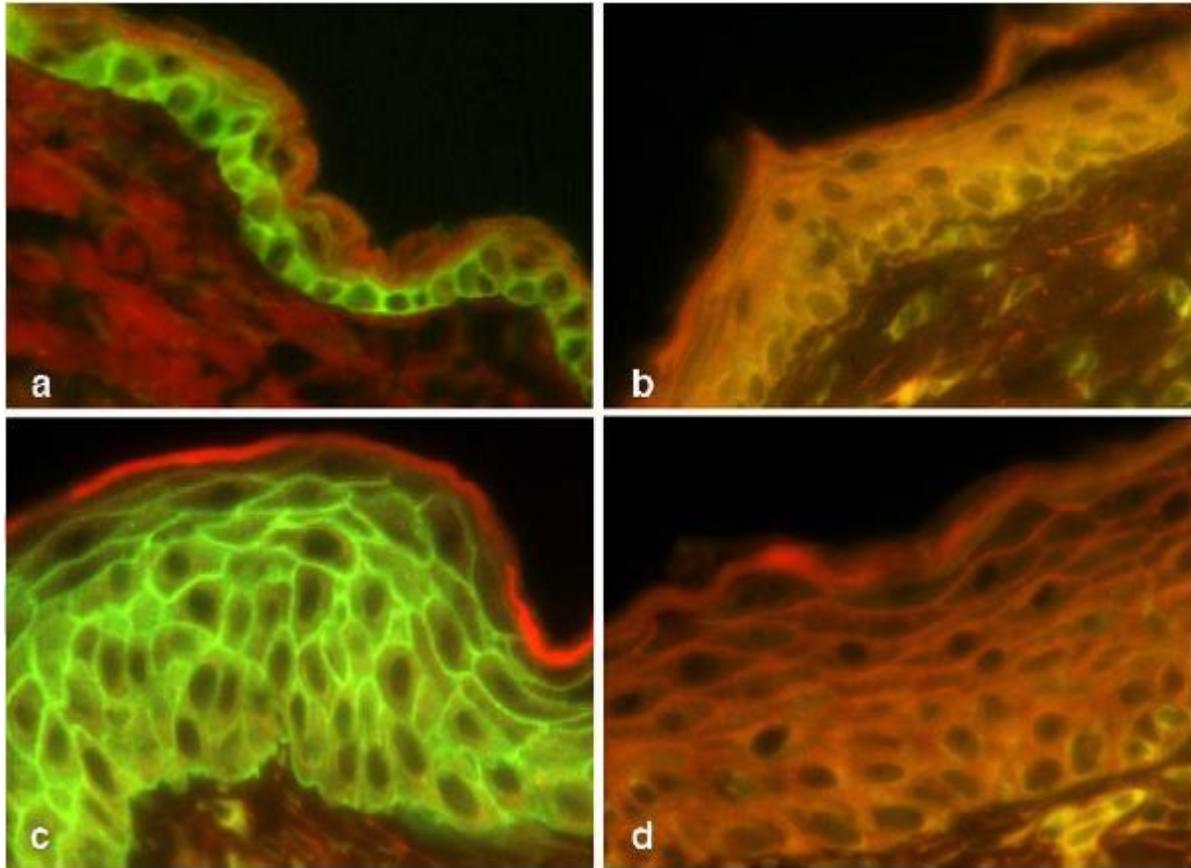
décollements répétés pendant huit jours des couches supérieures de l'épiderme. Comme on peut le voir sur la figure V-2 (c et d) l'épiderme murin épaissi ressemble davantage à l'épiderme humain (fig. V-1-c). On peut également remarquer que l'aquaporine 3 n'est plus exclusivement localisée au niveau d'une seule couche, la couche basale, mais largement redistribuée à travers l'épiderme (fig. V-2-c), à la manière de ce qui est observé dans un épiderme humain (fig. V-1-c). Mais là encore, il n'y a pas de différence morphologique visible à cette résolution lorsque l'épiderme de ces souris est épaissi (fig. V-2, c vs d). Qu'en est-il à l'échelle de la microscopie électronique ?

La figure V-3 présente des coupes fines d'épidermes murins observées au microscope électronique à transmission. Aucune différence structurale n'est visible entre l'épiderme normal de souris sauvage (fig. V-3-a) et de souris AQP3<sup>-/-</sup> (fig. V-3-b) en microscopie électronique (Ma et al, 2002). De même aucune différence n'est visible entre épiderme de souris sauvage avant (fig. V-3-a) et après épaississement (fig. V-3-c). En revanche, chez les souris AQP3<sup>-/-</sup>, on observe au niveau de l'épiderme épaissi des espaces intercellulaires dilatés entre les kératinocytes (fig. V-3-d). Ces espaces sont absents dans l'épiderme épaissi de souris sauvage (fig. V-3-c) et ne sont pas visibles dans l'épiderme des souris AQP3<sup>-/-</sup> (fig. V-3-b). Ces œdèmes intercellulaires suggèrent un défaut dans les mouvements de fluides dans l'épiderme des souris invalidées pour le gène aquaporine 3, rendu visible suite à l'hyperplasie. Lorsque l'AQP3 est exprimée à la membrane plasmique les mouvements de fluides se font à travers les kératinocytes, via l'AQP3. L'équilibre osmotique est maintenu entre les kératinocytes des différentes couches. En absence d'AQP3, les mouvements de fluides ne peuvent plus se faire qu'entre les kératinocytes, causant ces œdèmes intercellulaires. L'absence d'AQP3 provoque donc un dessèchement de l'épiderme et une spongieuse lorsque l'épiderme est épais. Qu'en est-il chez l'homme ?

Bien qu'il existe quelques rares cas d'individus n'exprimant pas d'AQP3 fonctionnelle, nous n'y avons pas eu accès. Nous n'avons donc pas pu observer les effets d'un phénotype AQP3<sup>-/-</sup> sur l'épiderme chez l'homme. Cependant la spongieuse est une affection de l'épiderme couramment associée à l'eczéma. Nous avons donc décidé d'observer l'expression de l'AQP3 chez des individus souffrants d'eczéma.

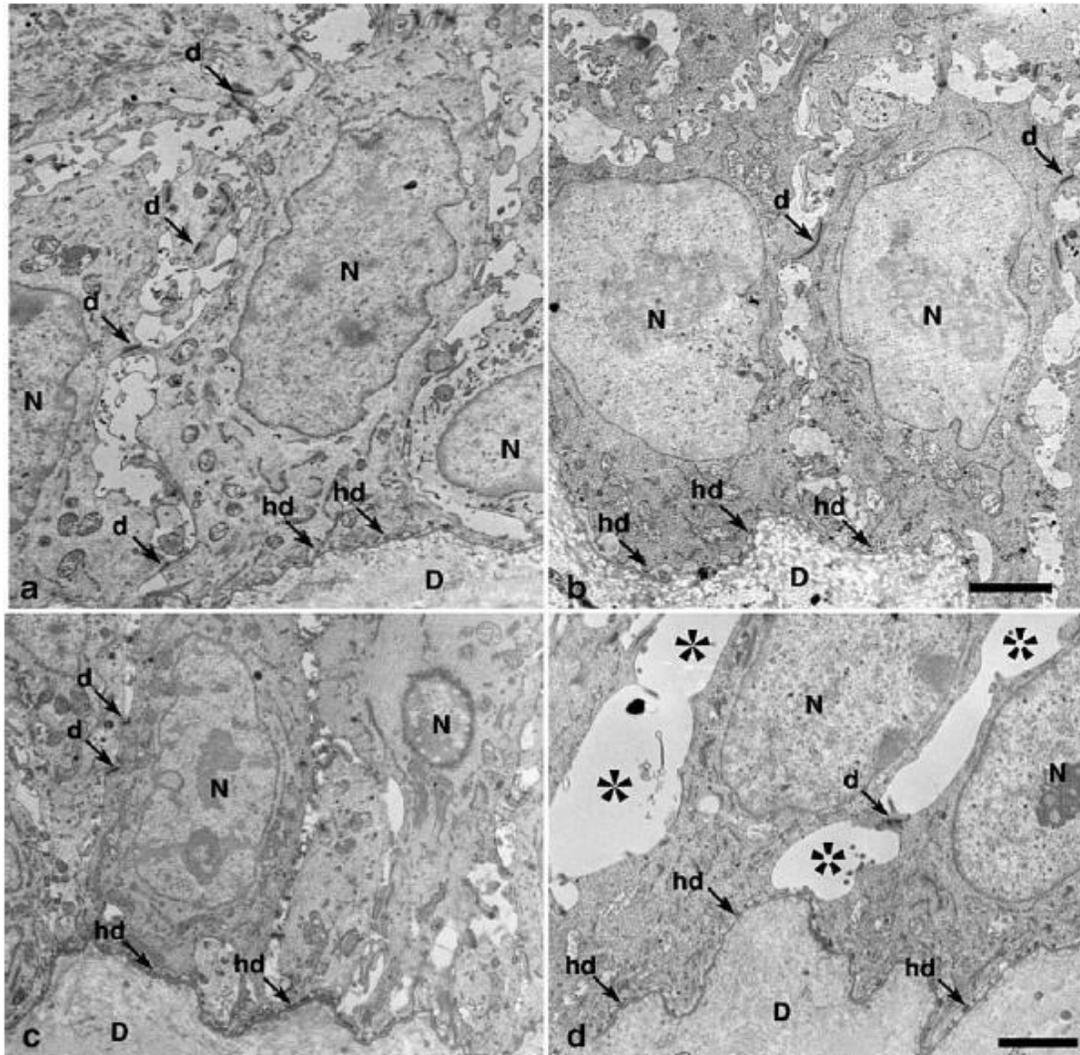


**Figure V-1. L'expression de l'AQP3 dans l'épiderme.** (a) L'AQP3 (26kDa) apparaît à 35kDa sous sa forme glycosylée chez l'homme. (b) L'AQP3 injectée dans des ovocytes (AQP3) confère une plus grande perméabilité à l'eau et au glycérol, en comparaison à des ovocytes qui n'ont pas reçu d'injection (N.I.). (c) Immunofluorescence indirecte sur des cryosections d'épidermes humains. L'AQP3 est localisée dans les kératinocytes de la couche basale à la couche épineuse. (d) Contrôle négatif. (e) Immunomarquage de l'AQP3 en microscopie électronique. Les particules d'or sont disposées le long de la membrane plasmique des kératinocytes. *D'après Sougrat et al, 2002.*



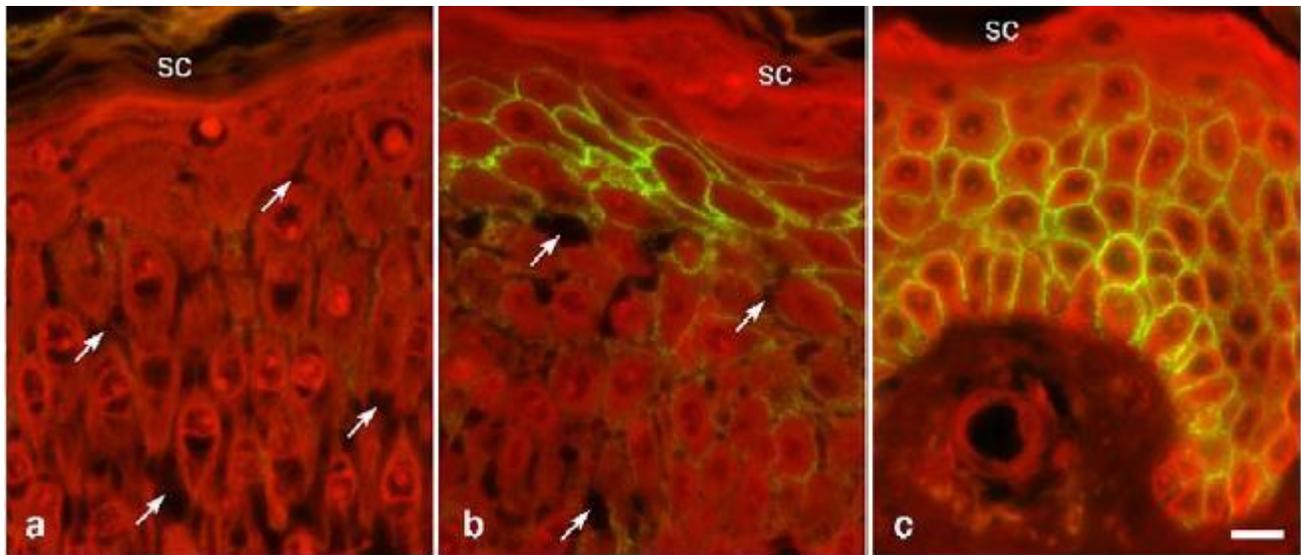
**Figure V-2. Immunofluorescence indirecte dirigée contre l'AQP3 sur des cryosections d'épidermes murins.** (a) Epiderme normal de souris sauvage. (b) Epiderme normal de souris AQP3 *-/-*. (c) Epiderme épaissi de souris sauvage. (d) Epiderme épaissi de souris AQP3 *-/-*. En vert, marquage anti-AQP3. D'après Boury-Jamot et al, 2006.

L'immunolocalisation de l'AQP3 au niveau de biopsie de trois différents patients souffrant d'eczéma est montrée dans la figure V-4. Le premier patient est atteint d'une forme sévère de spongiose à travers tout l'épiderme et l'AQP3 n'est pas détectable (fig. V-4-a). Le deuxième patient présente des régions saines et atteintes de l'épiderme (fig. V-4-b). L'AQP3 n'est détectée que dans les régions saines de l'épiderme. Le troisième patient présente un épiderme sain sans spongiose et l'AQP3 est distribuée normalement à travers l'épiderme (fig. V-4-c). Pour ces trois patients, l'expression de l'aquaporine 3 est associée aux régions saines de l'épiderme, tandis que l'AQP3 est totalement absente des zones présentant des œdèmes intercellulaires.



**Figure V-3. Epidermes murins observés en microscopie électronique.** (a) Epiderme normal de souris sauvage. (b) Epiderme normal de souris AQP3  $-/-$ . (c) Epiderme épaissi de souris sauvage. (d) Epiderme épaissi de souris AQP3  $-/-$ . N, noyau. D, derme. d, desmosome. hd, hémidesmosome. \*, œdème intercellulaire. D'après Boury-Jamot et al, 2006.

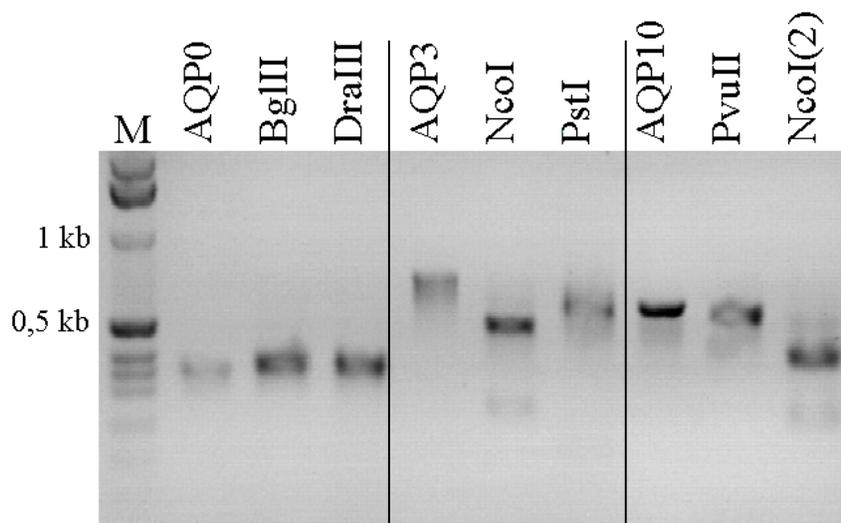
L'AQP3 est-elle la cause des spongiozes ? Ou bien la conséquence ? Il nous est impossible pour le moment de le préciser. Cependant il est clair qu'un défaut d'expression d'AQP3 est associé avec un défaut de balance hydrique et la formation d'œdèmes intercellulaires, que ce soit chez la souris ou chez l'homme.



**Figure V-4. Immunofluorescence indirecte dirigée contre l'AQP3 sur des cryosections d'épidermes de patients souffrant d'eczéma.** (a) Patient 1, eczéma avec spongiose (↗) (forme sévère). (b) Patient 2, eczéma avec spongiose. (c) Patient 3, eczéma sans spongiose. En vert marquage anti-AQP3 ; SC, stratum corneum. D'après Boury-Jamot et al (2006).

### 3. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 10

La figure V-5 présente les résultats des digestions réalisées sur les amplicons obtenus après RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux de kératinocytes en cultures (cf. partie III). Nous trouvons une amplification non spécifique pour les amorces AQP0. Des bandes sont visibles après RT-PCR pour l'AQP3 et l'AQP10. Les tailles apparentes, respectivement 750pb et 600pb, correspondent aux tailles attendues, 781pb et 651pb. Ces amplicons soumis à des digestions enzymatiques sont bien spécifiques des aquaporines 3 et 10. Comme nous l'avons vu deux variants différents de l'AQP10 humaine sont exprimées. Le variant long est fonctionnel tandis que le variant court ne l'est pas. Nos amorces ne permettent pas de les distinguer.



**Figure V-5. Digestion des amplicons AQP0, 3 et 10 obtenus après RT-PCR sur des extraits d'ARNm de cellules HaCaT.** L'AQP0 a été "digérée" par BglIII et par DraIII. L'aquaporine 3 (781pb) a été digérée par NcoI (fragments attendus : 521pb et 260pb) et par PstI (605pb et 176pb). L'aquaporine 10 (651pb) a été digérée par PvuII (582pb et 69pb) et par NcoI (410pb et 241pb, piste NcoI(2)). Les produits de digestion dont la taille est trop faible ne sont pas visibles sur le gel. DNA ladder, *piste M*.

Pour le variant court de l'AQP10 humaine, seuls deux anticorps commerciaux étaient disponibles (AQP101-S/A de alpha diagnostic et AB15131 de ABCAM\*), tous les deux dirigés contre dix-sept acides aminés spécifiques au niveau C-terminal de ce variant. Ce sont ces anticorps qui ont permis de révéler l'expression du variant court de l'AQP10 humaine au niveau des intestins (*Mobasheri et al, 2004*).

Nous avons donc testé ces deux anticorps en western blot sur des extraits de protéines totales de kératinocytes en culture, puis d'épiderme. Nous n'avons pas obtenu de résultat significatif. Aucune bande n'est visible après immunodétection. Nous avons varié les concentrations en protéines et en anticorps, ainsi que les temps d'incubation et d'exposition, sans que cela n'ait la moindre incidence sur le résultat.

L'efficacité de certains anticorps variant en fonction de la technique employée, nous les avons testés en immunofluorescence. En immunofluorescence sur des coupes d'épiderme humain, le variant court de l'aquaporine 10 n'est jamais détecté, quelques soient

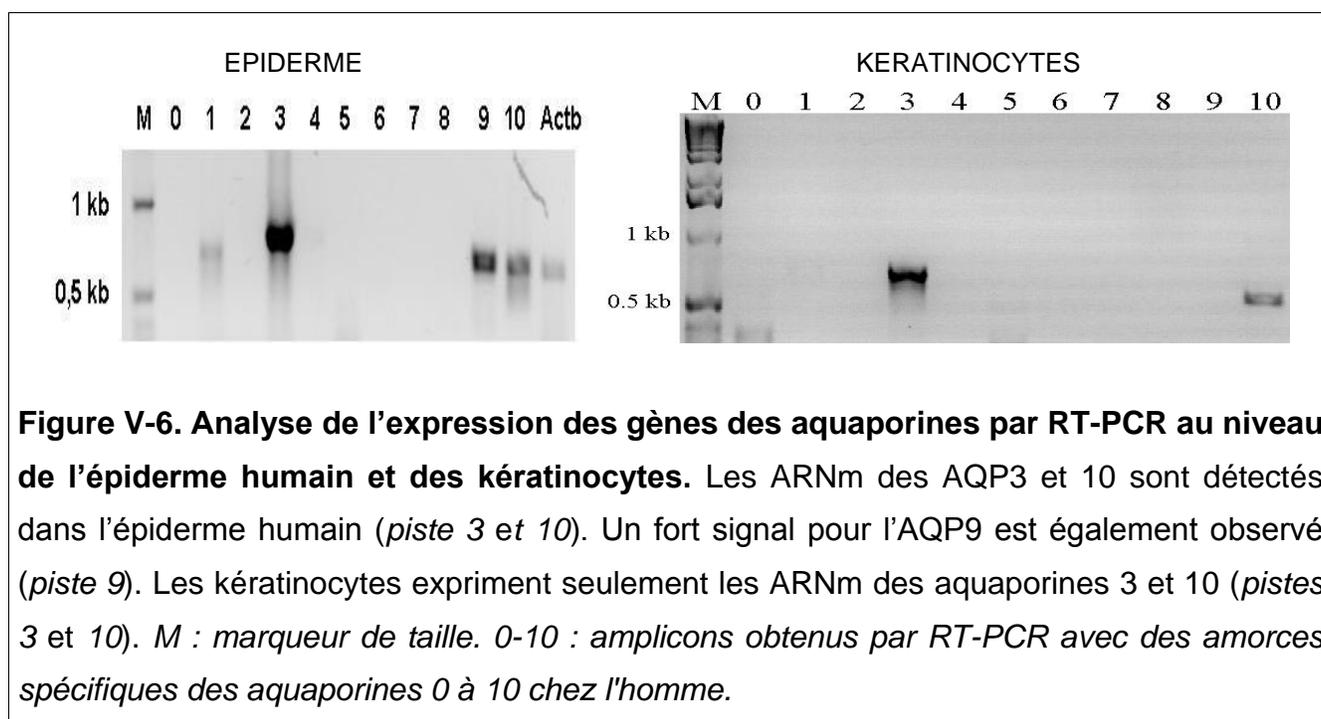
\* L'anticorps AB15131 de ABCAM n'est plus disponible à la vente.

les conditions. Soit cet anticorps ne fonctionne pas, soit le variant court de l'AQP10 n'est pas exprimé.

En l'absence d'un anticorps spécifique dirigé contre le variant long de l'AQP10 humaine, nous ne pouvons pas vérifier son expression par les kératinocytes. Nous avons donc désigné un peptide de dix-sept acides aminés spécifique de la forme fonctionnelle de l'aquaporine 10 humaine au niveau C-terminale (FKAEQSEDKPEKYELSV). Cet anticorps est en phase de production.

#### 4. EXPRESSION DE L'AQUAPORINE 9

Dans la partie IV, nous avons montré par RT-PCR que de nombreuses aquaporines sont transcrites au niveau de l'épiderme ex vivo.

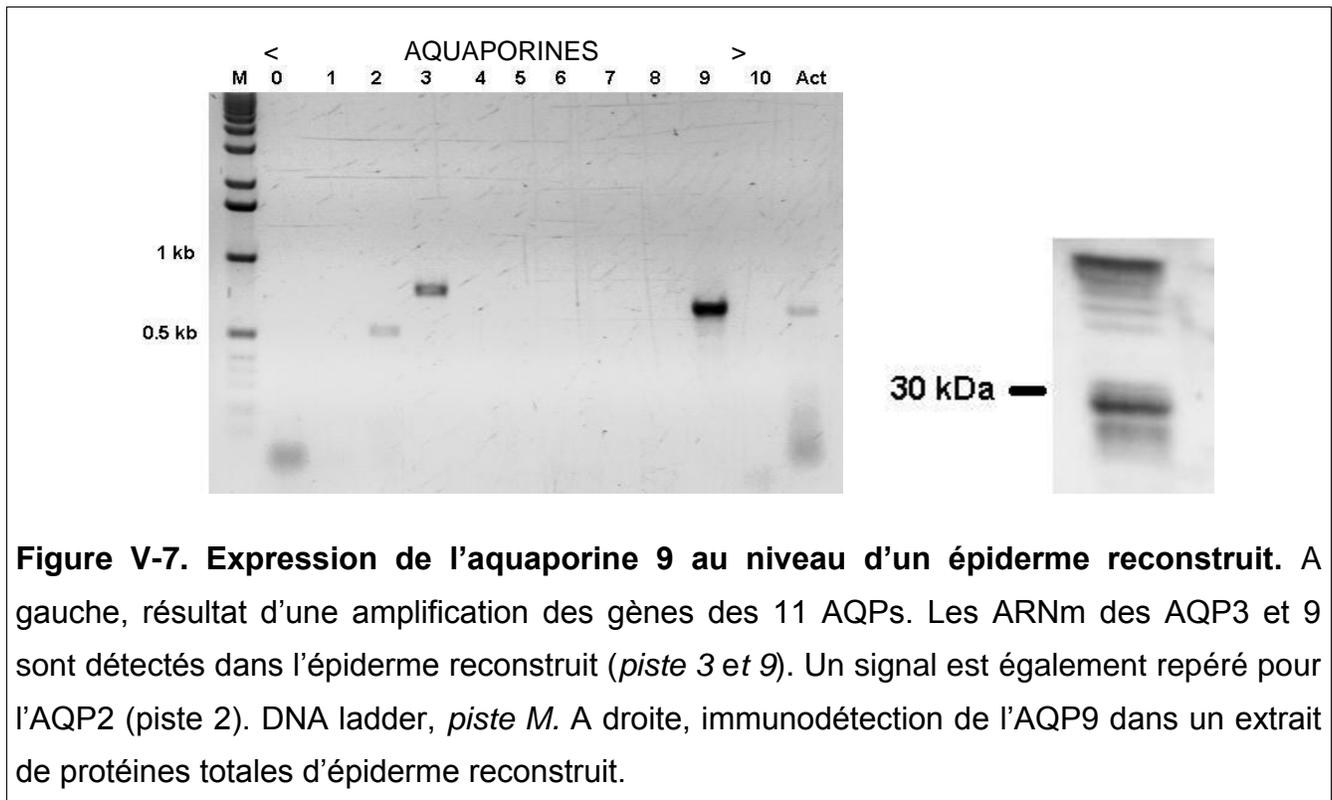


La figure V-6 rappelle les résultats obtenus sur l'expression des aquaporines in vitro dans les kératinocytes et ex vivo dans l'épiderme. Le signal observé pour l'AQP9 au niveau de l'épiderme est trop intense pour être expliqué par les seules cellules de Langerhans (cf.

figure III-3). Les kératinocytes largement majoritaires dans l'épiderme semblent être le seul type cellulaire susceptible d'expliquer l'intensité du signal aquaporine 9.

Compte-tenu des résultats obtenus par RT-PCR sur l'épiderme entier et des données disponibles dans la littérature, nous avons voulu réexaminer la présence de l'AQP9 au niveau des kératinocytes et de l'épiderme humain.

Nous avons sélectionné les épidermes reconstruits de SkinEthic (RHE, SkinEthic) pour tester l'expression de l'AQP9 par les kératinocytes différenciés. Ces épidermes reconstruits ne sont composés que de kératinocytes différenciés cultivés à l'interface air/liquide. Similaire à un épiderme humain natif, ils expriment les mêmes marqueurs de différenciation. Ils sont couramment utilisés pour des tests cosmétiques et dermatologiques.



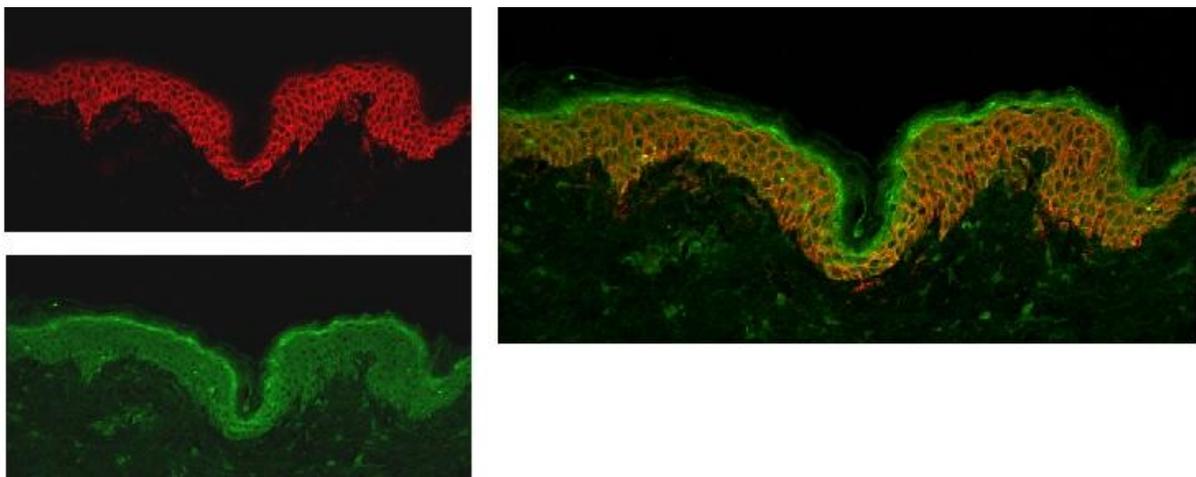
**Figure V-7. Expression de l'aquaporine 9 au niveau d'un épiderme reconstruit.** A gauche, résultat d'une amplification des gènes des 11 AQPs. Les ARNm des AQP3 et 9 sont détectés dans l'épiderme reconstruit (*piste 3 et 9*). Un signal est également repéré pour l'AQP2 (*piste 2*). DNA ladder, *piste M*. A droite, immunodétection de l'AQP9 dans un extrait de protéines totales d'épiderme reconstruit.

Par RT-PCR, un signal est détecté pour l'AQP3 et pour l'AQP9. Comme nous l'avons vu dans la partie III sur l'expression de l'AQP1 au niveau des mélanocytes, le faible signal obtenu pour l'AQP2 est un artefact du modèle expérimental, car à ce jour aucune étude ne mentionne l'expression de l'aquaporine 2 au niveau de l'épiderme humain. Il semble que la méthode d'obtention de ces épidermes induise l'expression de l'AQP2 au niveau des

kératinocytes. Nous pouvons également remarquer l'absence d'expression de l'AQP10 au niveau de kératinocytes différenciés (cf. partie V). Nous avons ensuite vérifié par western blot, l'expression de l'AQP9 au niveau de ces épidermes.

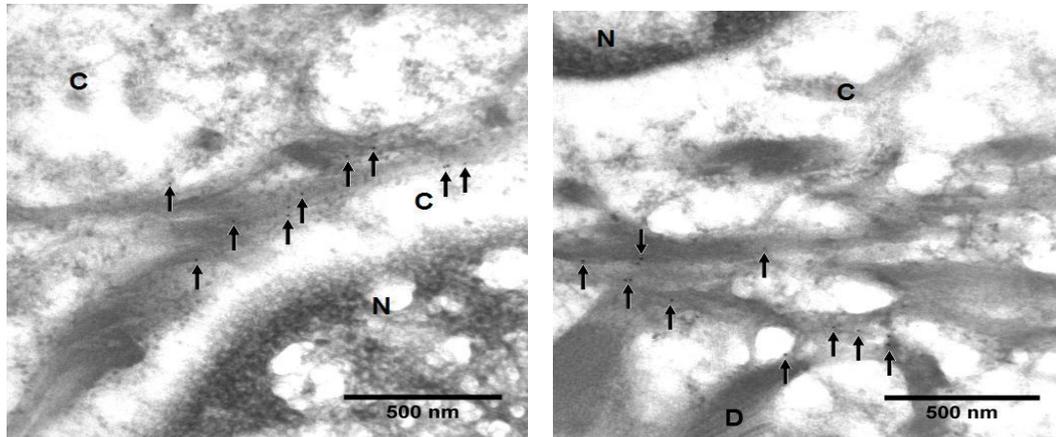
Il a été montré que l'aquaporine 9, chez la souris, est localisée dans l'épiderme au niveau de la couche granuleuse (Rojek *et al*, 2007). La couche granuleuse est la couche de cellule vivante la plus différenciée, elle est située juste sous la couche cornée. Au vu des résultats obtenus on peut s'attendre à trouver pour l'aquaporine 9 une localisation semblable au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme humain. L'épiderme humain étant plus épais que l'épiderme murin on peut éventuellement s'attendre à une localisation au niveau de la partie supérieure de la couche épineuse, couche absente de l'épiderme chez la souris.

Par immunomarquage dirigé contre l'AQP9 sur des coupes d'épiderme humain (figure VI-5), on obtient un marquage (en vert) de la couche granuleuse. Aucun marquage n'est détecté au niveau de la couche épineuse. En rouge figure le marquage dirigé contre l'aquaporine 3, de la couche basale à la couche épineuse. La superposition des deux marquages montre la répartition au sein de l'épiderme de l'aquaporine 3 et de l'aquaporine 9. Contrairement à ce que l'on a vu au niveau des cultures cellulaires, où l'AQP3 et l'AQP9 sont coexprimées, il n'y a pas de colocalisation cellulaire de ces deux aquaporines dans l'épiderme.



**Figure V-8. Double immunomarquages AQP3, AQP9 sur une coupe d'épiderme humain.** L'AQP9 (en vert) est localisée au niveau de la couche de kératinocytes la plus différenciée située juste sous la couche cornée (stratum granulosum).

A ce niveau de résolution il est impossible de déterminer si l'aquaporine 9 est exprimée à la membrane plasmique des kératinocytes ou au niveau de compartiments intracellulaires. Nous avons donc réalisé des marquages contre l'aquaporine 9 sur des coupes d'épiderme humain en microscopie électronique (figure V-9). L'aquaporine 9 n'est présente qu'au niveau de la couche granuleuse et comme on pouvait s'y attendre, principalement localisée au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.



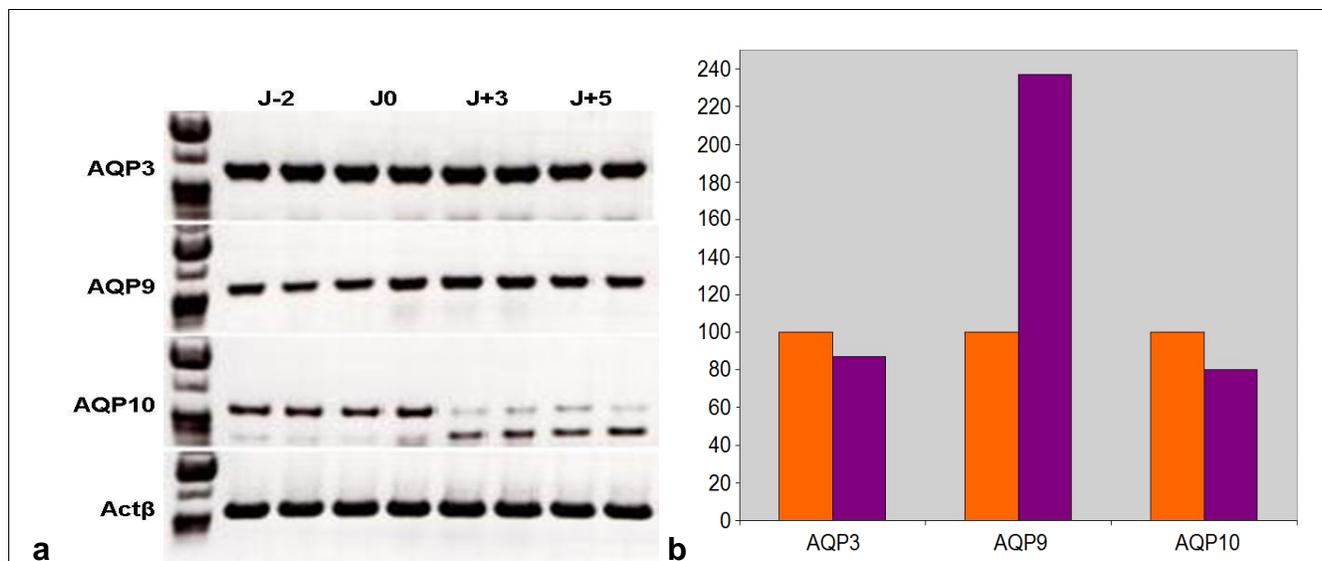
**Figure V-9. Immunomarquage sur une coupe d'épiderme humain dirigée contre l'aquaporine 9.** L'AQP9 (flèches) est localisée en microscopie électronique le long de la membrane plasmique des kératinocytes. N noyau D desmosome C cytoplasme.

## 5. EFFETS DE LA DIFFERENCIATION

Comme nous venons de le voir, les kératinocytes en prolifération expriment l'ARNm de l'AQP3 et de l'AQP10, tandis que les kératinocytes différenciés expriment les aquaporines 3 et 9. Nous avons voulu étudier plus en détail les effets de la différenciation des kératinocytes sur les aquaporines exprimées, notamment les changements d'expression au cours de la différenciation des kératinocytes. Le calcium est un acteur clef de cette différenciation. Il est naturellement présent à travers l'épiderme. De plus la concentration en calcium augmente à mesure que l'on remonte vers les couches supérieures de l'épiderme. Il a été démontré que l'ajout de calcium dans le milieu de culture induit la différenciation des kératinocytes

(Hennings *et al*, 1980 et Boyce *et al*, 1983). Cette technique de différenciation induite par le calcium est couramment utilisée en laboratoire.

La figure V-10-a montre les résultats de RT-PCR semi-quantitative obtenus pour l'expression des aquaporines 3, 9 et 10 par des kératinocytes humains primaires au cours de la différenciation induite par le calcium.

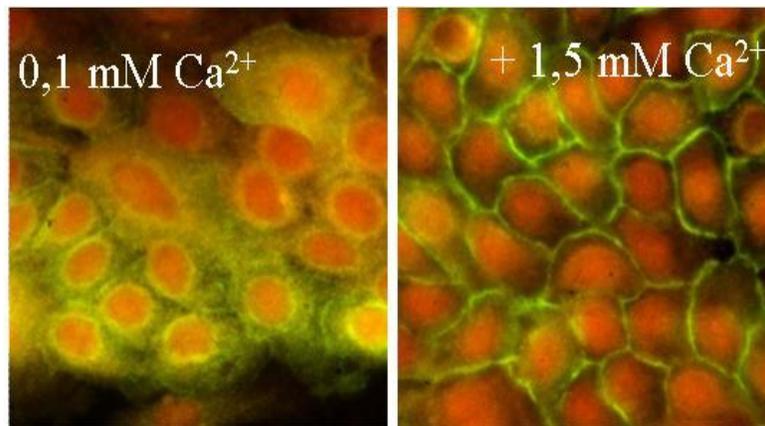


**Figure V-10. Analyse quantitative de l'expression des gènes des aquaporines 3, 9 et 10 dans des kératinocytes au cours de la différenciation induite par le calcium.** RT-PCR semi-quantitative pour les AQP3, 9 et 10 (a). L'expression de l'ARNm de l'AQP3 ne varie pas, tandis que l'expression de l'ARNm de l'AQP10 est diminuée dans les kératinocytes différenciés (J+3 et J+5). L'expression de l'ARNm de l'AQP9 augmente au cours de la différenciation, maximum à J+3. RT-PCR quantitative (b), après 24h de traitement au calcium, seule l'expression de l'AQP9 est augmentée. L'expression des AQP3 et 10 n'est pas significativement influencé à 24h par la différenciation induite par le calcium. *J-2, kératinocytes primaires en prolifération, faible concentration de calcium (0,1mM). J0, kératinocytes à confluence, induction de la différenciation par l'ajout de calcium (1,5mM). J+3, kératinocytes différenciés, après trois jours (1,5mM de Ca<sup>2+</sup>). J+5, kératinocytes différenciés, après cinq jours (1,5mM de Ca<sup>2+</sup>). Actβ, expression de l'ARNm de l'actine β pris comme contrôle.*

Nous pouvons remarquer que l'expression de l'AQP3 reste constante, lorsque les kératinocytes sont en prolifération (J-2), à confluence (J0) et après ajout de calcium au cours de la différenciation (J+3 et J+5). Contrairement à nos résultats précédents, l'expression de l'aquaporine 9 est détectée alors que les cellules sont encore en prolifération (fig. V-10 ; J-2). Cela est certainement dû au changement de fournisseur de cellules primaires et de milieu de culture. L'intensité de ce signal augmente au cours de la différenciation (de J0 à J+5), avec un maximum à J+3.

L'induction de la différenciation par le calcium effectuée à confluence semble avoir une grande influence sur l'expression des aquaporines 9 et 10, puisque l'expression de l'aquaporine est augmentée tandis que celle de l'aquaporine 10 diminue. Nous avons réalisé une série de RT-PCR quantitatives pour analyser les variations d'expression des aquaporines 3, 9 et 10, après l'ajout de calcium dans les cultures de kératinocytes (fig. V-10-b). On remarque 24 heures après l'ajout de calcium que seule l'expression de l'AQP9 est significativement augmentée (fig. V-10-b).

Nos résultats montrent clairement que la différenciation par le calcium n'a pas d'effet sur l'expression de l'aquaporine 3, mais qu'elle permet l'augmentation de l'expression de l'aquaporine 9 dès 24 heures. Au contraire de l'ARNm de l'AQP10, qui disparaît au cours de la différenciation induite par le calcium après plus de 24 heures.

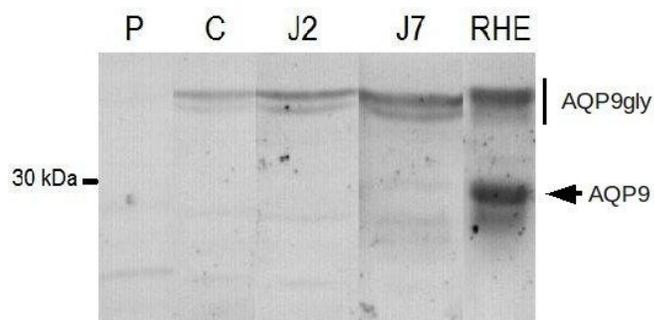


**Figure V-11. Effet de la différenciation induite par le calcium sur la localisation de l'AQP3.** Immunofluorescence indirecte dirigée contre l'AQP3 sur des cultures de kératinocytes, avant (0.1mM) et après (+1,5mM) ajout de calcium dans le milieu de culture.

Intéressons-nous maintenant aux changements que provoque la différenciation induite par le calcium sur les protéines AQP3 et AQP9.

Comme attendu pour l'AQP3, aucun changement au niveau de son expression n'est détecté au cours de la différenciation (figure V-10). Cependant comme le montre la figure V-11 l'ajout de calcium sur des kératinocytes en culture permet la translocation de l'AQP3 du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique. Ce phénomène qui a lieu au cours de la différenciation est observé *in vivo* dans l'épiderme (figure V-1-c). Sur la coupe d'épiderme humain, le marquage spécifiquement dirigé contre l'AQP3 est intracellulaire dans certains kératinocytes de la lame basale. A mesure que l'on remonte vers les couches supérieures de l'épiderme, le marquage apparaît d'avantage au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes (couche épineuse).

Pour l'aquaporine 9, l'ajout de calcium dans le milieu de culture s'accompagne d'une surexpression de l'aquaporine 9 tant au niveau transcriptionnel (fig. V-10) qu'au niveau traductionnel (fig. V-12). En culture lorsque les kératinocytes sont en phase de prolifération, nous n'observons pas de signal pour la protéine AQP9 (fig. V-12 P). L'expression de l'AQP9 débute à confluence (fig. V-12 C) et augmente au cours de la différenciation (fig. V-12 C vs J2 vs J7).



**Figure V-12. Induction de l'expression de l'AQP9 dans des HaCaTs en culture au cours de la différenciation.** P, prolifération ; C, confluence ; J2, 2 jours post confluence ; J7, 7 jours post confluence, RHE, épiderme reconstruit.

## 6. CONCLUSION

En conclusion chez l'homme, trois aquaglycéroporines (AQP3, AQP9 et AQP10) semblent exprimées par les kératinocytes. Si l'AQP3 est exprimée à travers l'épiderme (les couches cornées et granuleuses exceptées), nos données montrent que l'ARNm de l'AQP10 est exprimée par des kératinocytes en prolifération. Il conviendrait également de créer des amorces spécifiques aux deux formes de l'AQP10. Nous pourrions ainsi déterminer quel variant est exprimé. À l'instar des entérocytes qui expriment également l'AQP3 et l'AQP10 (*Mobasher et al, 2004*), nous suggérons donc que l'AQP10 soit localisée principalement au niveau des kératinocytes basaux. L'obtention d'un anticorps fiable dirigé contre l'AQP10 permettrait d'en apprendre davantage sur le rôle et la localisation précise de cette aquaporine, très peu étudiée. Il serait important d'étudier l'expression de l'AQP10 au niveau de carcinomes basaux, chez l'homme. L'AQP10 pourrait être utilisée comme marqueur des kératinocytes en prolifération, que cette prolifération soit symptomatique ou non.

Concernant l'AQP3, nous avons clairement établi qu'un défaut de son expression par les kératinocytes était lié à un défaut de transport d'eau et à la formation d'œdèmes intercellulaires au niveau d'épidermes épaissis, comme l'épiderme humain. Il apparaît que le transport d'eau par l'AQP3 est important pour une hydratation correcte de l'épiderme. L'AQP3 est présente au niveau du rein et des érythrocytes. Son rôle au niveau du rein est le transport d'eau. Dans les érythrocytes chez l'homme l'AQP3 permet le transport de glycérol, mais celui-ci n'est pas métabolisé (*Roudier et al, 1998*). Finalement les données physiologiques sur l'importance du transport de glycérol par l'AQP3 ne proviennent que d'une seule équipe et ne concernent que l'épiderme de souris. De plus nous avons démontré que l'action du glycérol sur l'hydratation de l'épiderme se faisait indépendamment de l'expression de l'AQP3 par les kératinocytes (*Boury-Jamot et al, 2006*). Maintenant que nous savons que les kératinocytes humains expriment d'autres aquaglycéroporines, il nous paraît nécessaire de réaliser de nouvelles études pour définir leur rôle dans le transport de glycérol au niveau des kératinocytes et de l'épiderme humain. Nous avons également montré que l'expression de l'AQP3 dans les kératinocytes humains était stable au cours de la différenciation induite par le calcium, contrairement à ce qui semble se produire chez la souris (*Zheng et al, 2003*). Cependant, nous avons constaté un effet sur la localisation de l'AQP3 lors de la

différenciation induite par le calcium. Il serait intéressant de vérifier si ce phénomène est dépendant de l'ajout de calcium extracellulaire ou de la différenciation des kératinocytes. En utilisant des inhibiteurs des voies calciques ou d'autres méthodes de différenciation.

Enfin nous avons montré que l'AQP9 est exprimée dans les kératinocytes humains, in vitro et in vivo. L'expression de l'AQP9 est liée à l'état de différenciation des kératinocytes et induite par l'ajout de calcium. L'AQP9 est localisée au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes de la couche granuleuse, la couche de kératinocytes nucléés la plus différenciée. Il est intéressant de voir que l'aquaporine 9 au niveau de l'épiderme est exclusivement présente au niveau de la couche granuleuse, où le métabolisme du glycérol et des acides gras est primordial dans la transformation des kératinocytes en cornéocytes et la formation de la couche cornée. Nous proposons que l'AQP9, plutôt que l'AQP3, soit le transporteur de glycérol de l'épiderme.

# **VI. DISCUSSION**

## 1. DIFFERENCES ENTRE EPIDERMES MURIN ET HUMAIN

Depuis la découverte de l'expression de l'aquaporine 3 par les kératinocytes (*Frigeri et al, 1995*), deux méthodes s'opposent pour définir le rôle des aquaporines au niveau de l'épiderme chez l'homme. Ces deux méthodes diffèrent sur le choix du modèle expérimental. Alors que certains utilisent la souris comme modèle nous basons nos études sur des cellules et des tissus d'origine humaine. Il est important de garder en mémoire les différences qui existent entre ces deux modèles avant d'essayer de définir le rôle des aquaporines dans l'épiderme.

Tout d'abord travailler sur des modèles expérimentaux murins est plus commode, plus rapide et moins onéreux. De plus on peut créer des lignées de souris transgéniques invalidées pour les gènes des aquaporines. Ces lignées sont d'une grande utilité et permettent d'obtenir de précieux résultats, chez la souris. Mais tous ces résultats doivent être transposés à l'homme avec prudence, compte tenu des différences de structures et d'expression des aquaporines entre les épidermes murins et humains.

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié, son épaisseur est primordiale si l'on considère les flux de solutés et de fluides. La perméabilité, l'hydratation, les gradients de concentration de solutés à travers le tissu seront différents si l'on compare un épiderme fin à un épiderme épais comme l'épiderme humain. Il est clair que l'épiderme murin est beaucoup plus fin que l'épiderme humain (cf. figure V-3).

Concernant les aquaporines exprimées par les cellules de l'épiderme, notre étude est à ce jour la seule à s'être intéressée à l'expression de toutes les aquaporines humaines dans l'épiderme, si l'on fait exception des aquaporines 11 et 12 récemment découverte et formant une catégorie à part. Une seule étude similaire a été conduite chez la souris (*Ma et al, 2002*), seule l'AQP3 avait été détectée, bien que l'AQP9 ait été trouvée par d'autres chez la souris. Ces travaux réalisés sur l'épiderme de souris montrent qu'il existe des différences d'expression et de localisation des aquaporines entre épidermes humains et murins. Ainsi l'aquaporine 1 est exprimée par les mélanocytes humains, alors qu'elle n'est pas détectée dans l'épiderme de souris (*Ma et al, 2002*). Nous avons

également montré que les kératinocytes humains en prolifération exprimaient de l'ARNm de l'aquaporine 10 (cf. partie V). Cela n'est pas le cas chez la souris où l'AQP10 est un pseudogène apparemment non fonctionnel (*Morinaga et al, 2002*). Enfin l'aquaporine 9 est localisée à la membrane plasmique du côté apical des kératinocytes chez la souris (*Rojek et al, 2007*), tandis que chez l'homme elle semble répartie uniformément à la membrane plasmique (cf. partie V).

Il apparaît que le meilleur moyen pour expliquer la fonction des aquaporines exprimées par les cellules de l'épiderme humain, consiste à étudier ces aquaporines chez l'homme.

## **2. FONCTIONS DES AQUAPORINES EXPRIMEES**

### **2.A. AU NIVEAU DES MÉLANOCYTES.**

Jusqu'à présent l'AQP1 n'a pas été détectée dans l'épiderme chez la souris (*Ma et al, 2002*). Cependant il en allait de même avant notre étude chez l'homme. Comme nous l'avons vu dans la partie IV, l'AQP1 est exprimée par les mélanocytes humains in vitro et ex vivo. Elle est faiblement exprimée et sa localisation intracellulaire précise reste à déterminer. Plusieurs fonctions sont envisageables pour l'AQP1 dans les mélanocytes, telles que : intervenir dans la formation ou le transfert de la mélanine et des mélanosomes (*Jeremic et al, 2005, Sugiyama et al, 2008 et Arnaoutova et al, 2008*) ; intervenir dans la migration cellulaire si elle est localisée dans les dendrites (*Saadoun et al, 2005*) ou plus simplement maintenir l'équilibre osmotique par rapport au tissu. Ainsi, déterminer la localisation de l'AQP1 (dans les mélanosomes, les dendrites ou répartie uniformément à la membrane plasmique) permettrait de préciser sa fonction. Nous avons alors essayé de localiser l'AQP1 par immunogold en microscopie électronique. Mais la nature même des mélanocytes, très riche en mélanosomes, rend l'observation particulièrement difficile. Cependant nous avons pu remarquer que les cellules MNT-1 qui ont un fort contenu en mélanosomes et très peu de dendrites expriment ni plus ni moins d'AQP1 que les mélanocytes humains normaux. De plus aucun changement d'expression de l'AQP1 au niveau des MNT-1 n'est observé après un traitement à base de PDBu qui augmente la

dendricité. Plus simplement et plus vraisemblablement l'aquaporine 1 serait exprimée de manière constitutive pour maintenir l'équilibre osmotique entre les mélanocytes et les kératinocytes avec lesquels ils interagissent.

## **2.B. AU NIVEAU DES KÉRATINOCYTES.**

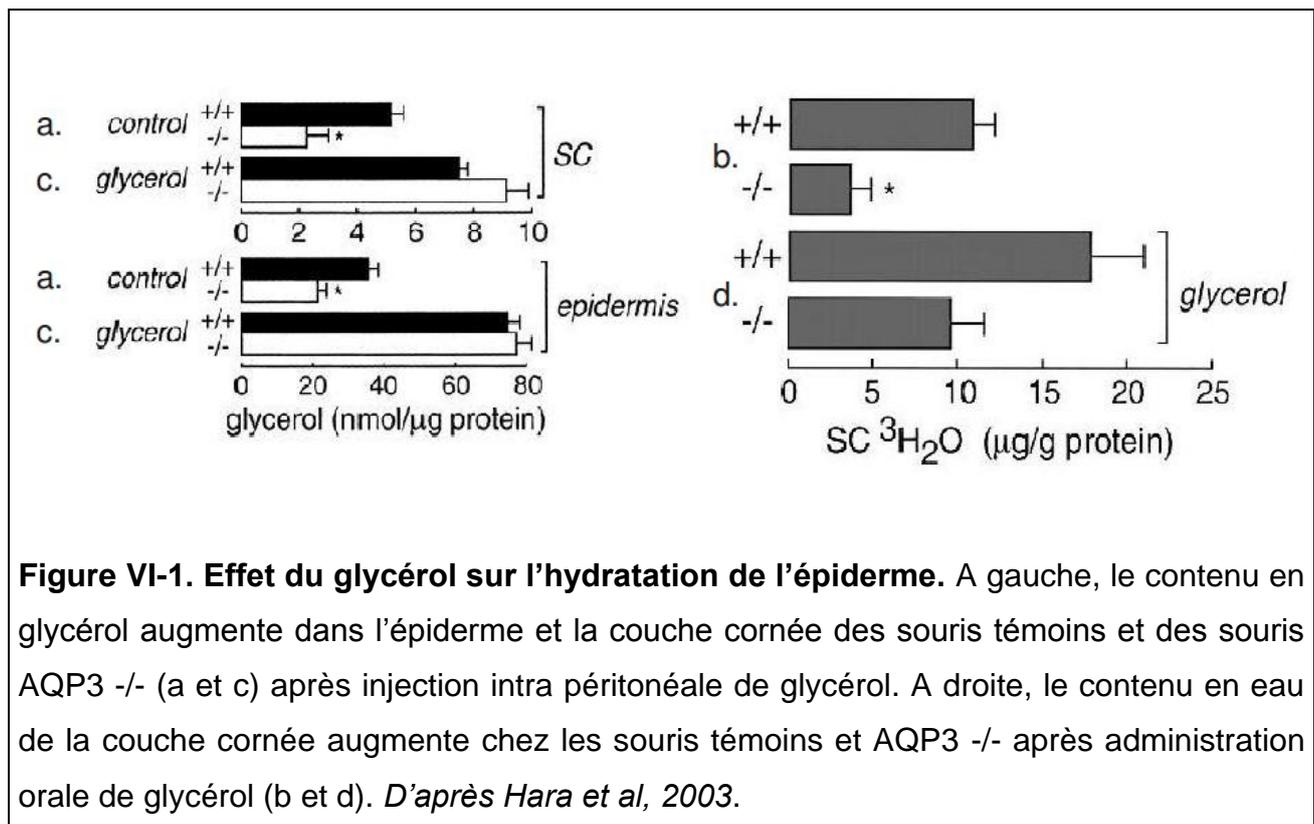
Nous avons montré que trois aquaglycéroporines étaient exprimées, les AQP3, 9 et 10. Comme nous l'avons dit en introduction l'AQP3 a d'abord été décrite comme un transporteur d'eau dans l'épiderme. Certaines études ont par la suite mis en avant le transport de glycérol par l'AQP3 pour expliquer l'hydratation de l'épiderme. Nos résultats montrent que deux aquaglycéroporines supplémentaires sont exprimées par les kératinocytes, les AQP9 et 10 qui ont jusque-là été ignorées. Il convient alors de reconsidérer le rôle de l'ensemble des aquaporines exprimées par les kératinocytes.

Nous avons souligné les nombreuses différences existantes entre épiderme murin fin et épiderme humain épais. Les études sur le transport du glycérol par l'AQP3 ont été menées sur des épidermes de souris. Lorsque les souris sont invalidées pour l'AQP3, on peut remarquer par rapport aux souris témoins une diminution de moitié du contenu en eau et en glycérol de la couche cornée et une diminution de moitié du contenu en glycérol de l'épiderme des souris AQP3 *-/-* (fig. VI-1-a et b). La présence d'AQP3 apparaît donc nécessaire au transport de glycérol et de l'eau au niveau de l'épiderme. Le glycérol est un agent hydratant connu et utilisé depuis des millénaires. Que se passe-t-il lorsque l'on traite les souris témoins et AQP3 *-/-* avec du glycérol ?

Une augmentation du contenu en glycérol et en eau est visible à travers l'épiderme et la couche cornée aussi bien chez les souris témoins que les souris AQP3 *-/-* (fig. VI-1-c et d), que ce soit par administration intra-péritonéale, topique ou orale (*Hara et al, 2003*).

On remarque que le contenu en glycérol est identique après traitement chez les souris témoins et les souris AQP3 *-/-* (fig. VI-1-c). Ainsi, chez la souris en absence d'AQP3 le transport du glycérol dans l'épiderme demeure efficient. Ceci pourrait s'expliquer par la finesse de l'épiderme murin ou encore par l'expression d'une autre aquaglycéroporine, l'AQP9. Dans ce cas, il serait intéressant d'étudier de la même manière une délétion du gène de l'AQP9 et également de voir les effets sur des épidermes fins et épaissis d'une double délétion pour les gènes AQP3 et AQP9.

On peut remarquer également que le contenu en eau de la couche cornée après traitement est augmenté dans les mêmes proportions chez les souris témoins et les souris AQP3 *-/-*. Le cas présent révèle donc un effet hydratant du glycérol indépendant de l'expression de l'AQP3. Au contraire, le contenu en eau de la couche cornée après traitement est toujours moindre chez les souris AQP3 *-/-* comparé aux souris témoins. En présence de glycérol, l'absence d'AQP3 n'affecte pas le contenu en glycérol mais seulement le contenu en eau de l'épiderme. On peut donc conclure que l'AQP3 joue un rôle dans le transport d'eau pour l'hydratation de l'épiderme.



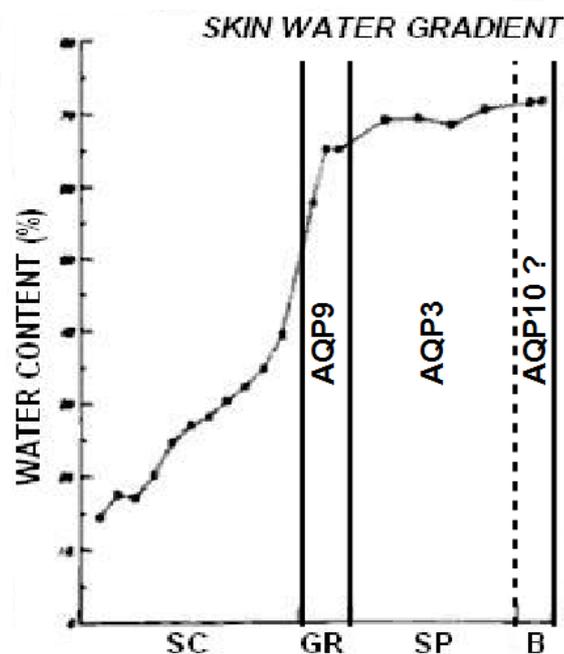
Quel rôle alors pour l'AQP3 chez l'homme ? Nous avons clairement montré qu'au sein d'un épiderme épais comme l'épiderme humain, un défaut d'expression de l'AQP3 s'accompagne d'un défaut de flux d'eau à travers les kératinocytes (Boury-Jamot et al, 2006).

De plus chez l'homme, l'AQP3 est exprimée et localisée au niveau des couches basales et épineuses qui ont un contenu en eau élevé (figure VI-2, SP et B). Mais elle est absente de la couche granuleuse, la couche responsable de la synthèse des lipides de la couche cornée (Monger et al, 1988) et dont le contenu en eau diminue (figure VI-2, GR). La discontinuité naturelle en eau au niveau de l'épiderme apparaît donc lié à l'expression de

l'AQP3. Il a été montré également qu'un stress hypersmotique induisait une surexpression de l'ARNm de l'AQP3. Cette régulation étant réversible (*Sugiyama et al, 2001*).

Enfin chez l'homme, l'AQP3 n'a jamais été décrite comme un transporteur de glycérol physiologique in vivo. Seul le transport d'eau a été clairement mis en évidence pour l'AQP3, comme dans le rein (cf. partie I-2-B-a).

En l'état, nous pensons donc que l'AQP3 assure l'hydratation de l'épiderme principalement via le transport d'eau.



**Figure VI-2. Contenu en eau à travers l'épiderme.** SC, stratum corneum; GR, stratum granulosum; SP, stratum spinosum; B, stratum germinativum. *D'après Warner et al, 1988.*

Intéressons-nous maintenant à l'aquaglycéroporine 9. Nous l'avons vu, aucune étude concernant son rôle au niveau de l'épiderme n'a été réalisée chez la souris. Nous savons seulement que l'AQP9 est exprimée au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse et localisée au niveau de la membrane apicale (*Rojek et al, 2007*). Chez l'homme, nous avons montré qu'elle était exprimée et localisée à la membrane plasmique des kératinocytes de la couche granuleuse. Pour rappel, c'est au niveau de cette couche que s'effectue la synthèse des lipides pour la couche cornée. Et c'est également à ce niveau que le contenu en eau chute brutalement (figure VI-2). Il a également été montré que l'expression de l'AQP9 par les kératinocytes était insensible à un stress

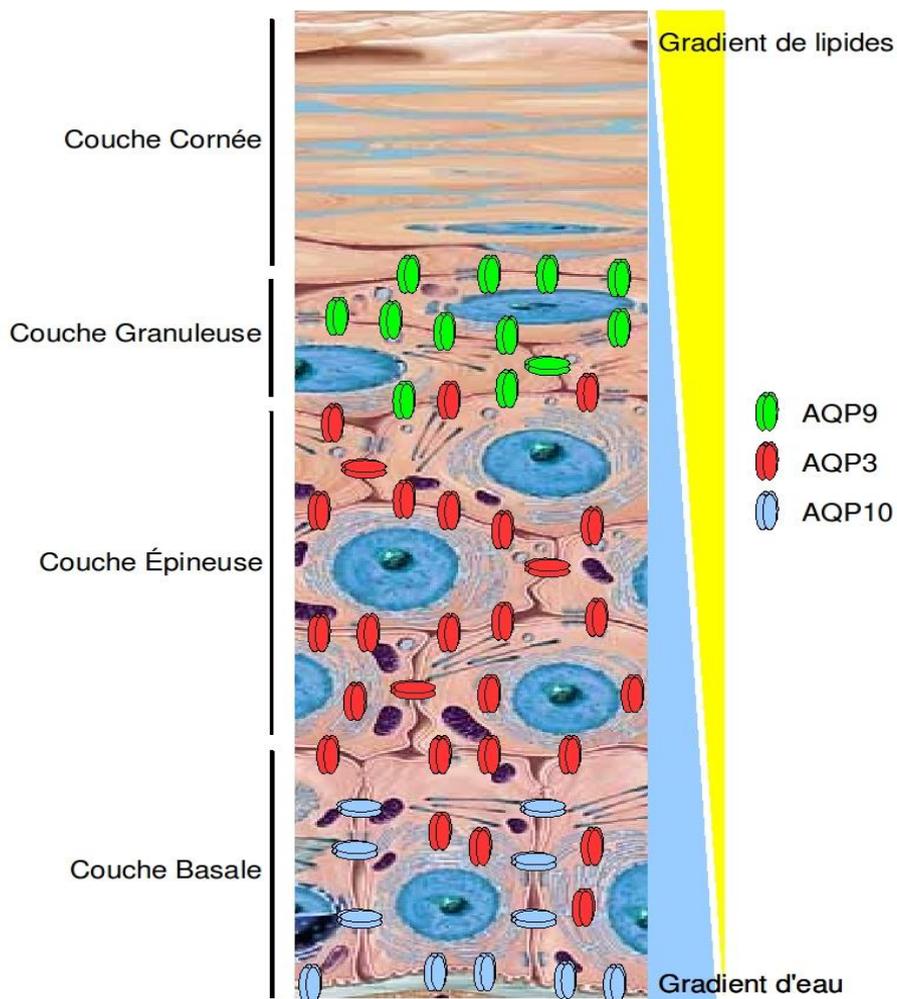
hyperosmotique (*Sugiyama et al, 2001*). Enfin sous savons que l'AQP9 est associée au métabolisme du glycérol chez l'homme (cf. partie I-2-B-b), contrairement à l'AQP3. C'est pourquoi nous postulons que l'AQP9 est le transporteur de glycérol de l'épiderme.

Concernant le rôle de l'AQP10, des études complémentaires sont nécessaires. Pour cette aquaporine, l'étude chez la souris est inutile. L'AQP10 de souris est un pseudogène peu ou pas exprimé in vivo (*Morinaga et al, 2002*). D'après nos données, l'AQP10 semble liée aux kératinocytes en prolifération chez l'homme. Nous avons montré in vitro que l'expression de l'ARNm de l'AQP10 disparaît au cours de la différenciation des kératinocytes. L'AQP10 apparaît même comme plus sensible que l'AQP3 aux effets du calcium.

De plus par RT-PCR semi-quantitative sur des extraits d'ARN d'épiderme humain, l'AQP10 apparaît bien moins exprimée que l'AQP3. Comme pour l'AQP9, l'AQP10 pourrait n'être exprimée que dans une seule couche de cellules, ce qui expliquerait un signal plus faible. Si l'AQP3 est exprimée au niveau des couches basale et épineuse, l'AQP9 au niveau de la couche granuleuse, alors l'AQP10 serait exprimée au niveau de la couche basale. Mais quel serait son rôle ? L'AQP10 est une aquaglycéroporine et très peu d'études ont été réalisées chez l'homme. Jusqu'à présent le seul rôle décrit pour l'AQP10 humaine concerne le passage de l'eau au niveau des intestins (*Ishibashi et al, 2002* et *Mobasherri et al, 2004*).

On ne peut, sur ce que l'on sait, postuler sur le transport de glycérol par l'AQP10. Le fait que l'AQP10 soit partiellement coexprimée avec l'AQP3, comme dans les entérocytes (*Mobasherri et al, 2004*) plaide pour un transport d'eau. De la même manière que dans les cellules intestinale, l'AQP10 pourrait être exprimée au niveau des membranes basales ou basolatérales des kératinocytes et permettre l'entrée d'eau du derme dans l'épiderme, l'AQP3 assurant ensuite le transport de l'eau à travers l'épiderme. Nous avons montré dans les kératinocytes en prolifération que l'AQP3 est principalement localisée dans les membranes intracellulaires. L'AQP10 pourrait donc être exprimée de manière constitutive au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes basaux pour permettre le transport d'eau transcellulaire en lieu et place de l'AQP3.

Il faudrait également étudier davantage le lien entre prolifération des kératinocytes et expression de l'AQP10. Cette aquaporine pourrait être utilisée comme marqueur des kératinocytes basaux. Il conviendrait alors de voir s'il existe un lien entre l'expression des aquaporines et la prolifération des kératinocytes.



**Figure VI-3. Schéma de la répartition des AQPs 3, 9 et 10 exprimées par les kératinocytes à travers l'épiderme.** L'AQP10 est localisée au niveau de la couche basale (kératinocytes en prolifération) au niveau des membranes basolatérales. L'AQP3 est localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques des kératinocytes des couches basale et épineuse. L'AQP9 est localisée au niveau de la couche granuleuse. Les AQPs 3 et 10 sont responsables du transport d'eau, tandis que l'AQP9 sert de transporteur de glycérol.

Enfin les cellules du corps humain sont composées de 65% à 90% d'eau. Il nous semble raisonnable de penser que l'AQP3 et les aquaporines ont un rôle purement physiologique dans le passage de l'eau ou du glycérol, pas seulement dans des tissus où ce rôle est primordial tel que le rein, mais également dans des tissus complexe comme l'épiderme. D'une manière générale, nous pensons que les aquaporines exprimées par les kératinocytes jouent donc un rôle dans l'hydratation de ce tissu, comme nous le proposons

dans la figure VI-3. Cette figure montre une répartition possible des aquaglycéroporines 3, 9 et 10 dans l'épiderme. Dans ce modèle les AQPs 3 et 10 sont coexprimées dans les kératinocytes basaux. Les kératinocytes de la couche épineuse expriment l'AQP3, qui sert au transport de l'eau. L'AQP9 est exprimée par les kératinocytes différenciés de la couche granuleuse. Elle permettrait principalement le transport du glycérol.

### **3. AQUAPORINES ET CANCERS**

Depuis le début des années 2000 le lien potentiel entre cancer et aquaporines est abondamment étudié. Nous voulons apporter ici notre vision quant au lien existant entre aquaporine et cancer, à la lumière des données disponibles dans la littérature chez l'homme et de nos résultats préliminaires.

#### **3. A. ÉTAT DES LIEUX**

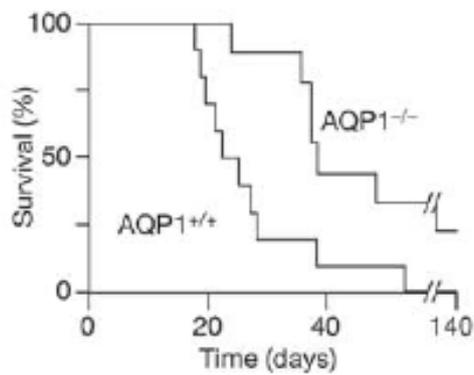
Les premières études se sont concentrées sur l'analyse de l'expression des aquaporines dans des cellules et des tissus tumoraux *in vivo* ou *ex vivo* (Mazal *et al*, 2005). Bien que les cancers de la peau soient les cancers les plus fréquents, l'expression des aquaporines y est très peu étudiée. Nous l'avons vu en introduction, en France on dénombre plus de 100 000 nouveaux cas chaque année. Les plus fréquents et les moins graves sont les carcinomes baso-cellulaires et spinocellulaires ou épidermoïdes (cf. Partie I-1-C-d). Les mélanomes, issus des mélanocytes, sont des cancers plus rares (4 000 à 5 000 nouveaux cas par an en France) mais plus graves; ils peuvent guérir définitivement si le traitement est mis en œuvre précocement (cf. Partie I-1-D-c). Pourtant comme pour les cellules de la peau chez l'homme, aucune étude exhaustive sur l'expression des aquaporines n'a été entreprise sur les cancers cutanés. La plupart des études se sont concentrées sur l'expression tumorale d'aquaporines au niveau des reins, du foie, du cerveau ou encore des intestins (Kageyama *et al*, 1996 ; Mazal *et al*, 2005 ; Markert *et al*, 2001 et Moon *et al*, 2003). Bien que certaines études n'aient constaté aucun changement dans l'expression des aquaporines, une majorité d'entre elle a montré une corrélation entre modification de l'expression des aquaporines et tumeurs (Aishima *et al*, 2007 ;

*Hoque et al, 2006 et Hu et al, 2005*). Les modifications de l'expression observées allaient soit dans le sens d'une inhibition des aquaporines ou au contraire d'une surexpression des aquaporines. Dans certains cas, les aquaporines ont été mise en cause dans la prolifération tumorale ou encore dans la migration tumorale (*McCoy et Sontheimer, 2007*). Sans pour autant conclure que les aquaporines sont responsables de la formation des tumeurs, elles semblent en faciliter la croissance et la diffusion lorsqu'elles sont surexprimées. Les aquaporines de par leur niveau d'expression (surexpression ou inhibition) peuvent donc servir de marqueurs pour certains types de tumeurs (*Kafé et al, 2004, Mobasheri et al, 2005*) mais encore de cible thérapeutique. Seulement deux études ont été réalisées pour l'épiderme. Elles ont rapporté l'expression d'AQP1 dans un mélanome (*Monzani et al, 2009*) et l'expression d'AQP3 dans un kératocarcinome, sur trois analysés (*Nakakoshi et al, 2006*).

### **3.B. L'AQUAPORINE, UN COUPABLE IDÉAL ?**

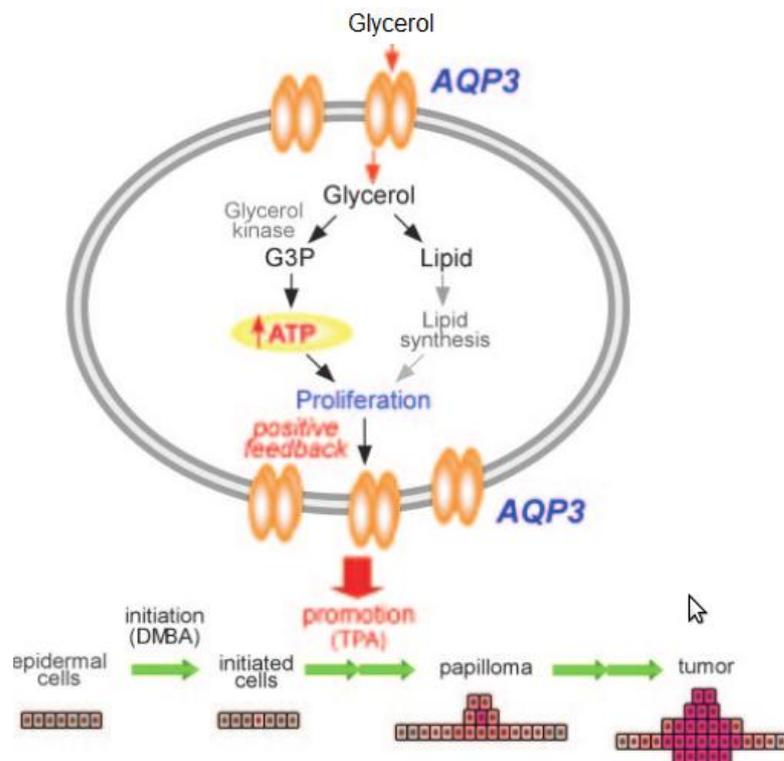
Des études complémentaires se sont intéressées à l'effet des aquaporines sur la prolifération et la motilité cellulaires. Typiquement l'aquaporine étudiée est transfectée à des cellules pour des tests de prolifération et de motilité in vitro. In vivo, des cellules tumorales sont injectées à des souris saines et des souris invalidées pour l'aquaporine testée. On compare alors entre souris saines et invalidées l'invasion tumorale et la survie (*Saadoun et al, 2005*).

La figure VI-4 montre le taux de survie chez des souris saines et invalidées pour le gène AQP1 après injection de cellules tumorales. On constate que la survie chez les souris KO est légèrement améliorée, les tumeurs ont un plus petit volume dans les souris AQP1 -/-. Autrement dit, l'absence d'expression des AQPs peut dans certains cas ralentir la progression des tumeurs. Mais en aucun cas, sur la base de ces données, l'augmentation de l'expression d'une aquaporine peut être considérée comme provoquant ou facilitant la progression tumorale. Pourtant ce genre d'approche a été utilisé pour conclure que les aquaporines sont responsables d'une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules, notamment dans les cellules tumorales (*Hu et al, 2006*).



**Figure VI-4. Survie comparée de souris sauvages et invalidées pour le gène AQP1 infectées par un mélanome murin. D'après Saadoun et al, 2005.**

Le glycérol est un agent hydratant couramment utilisé dans les cosmétiques depuis des millénaires (Nardello-Rataj et al, 2008). Mais le transport de glycérol via l'AQP3 (fig. VI-5) est selon ces auteurs un élément clef de la de la croissance tumorales (Hara-Chikuma et al, 2008).



**Figure VI-5. Mécanisme proposé de promotion tumorale via l'expression de l'AQP3. D'après Hara-Chikuma et al, 2008.**

En favorisant l'entrée de glycérol, l'AQP3 favoriserait le métabolisme cellulaire et donc la prolifération. Peu à peu, la surexpression des aquaporines qui étaient considérées comme une conséquence tumorale est devenue une cause pour les auteurs de ces études. Finalement l'équipe de Verkman a proposé une mise en garde contre la modification intentionnelle de l'expression des aquaporines (*Verkman, 2008*). Selon lui, les produits contenant du glycérol et favorisant la surexpression des aquaporines pourraient présenter un risque.

Comment l'AQP3 principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique dans des kératinocytes en prolifération, peut-elle faciliter le passage du glycérol à travers la membrane plasmique ? On a vu que ces études basées sur le modèle murin (*Hara-Chikuma et al, 2005 et 2008*) montrent clairement que le transport de glycérol au niveau des kératinocytes est indépendant de l'expression de l'AQP3. Il a été montré que l'AQP3 chez la souris était colocalisée avec la Phospholipase D2 (PLD2) qui métabolise le glycérol en phosphatidylglycérol (PG), une molécule intervenant dans la régulation des fonctions des kératinocytes (*Zheng et al, 2003*). De manière plus intéressante, ces auteurs ont montré chez la souris (*Bollag et al, 2007*) :

- que la surexpression de l'AQP3 dans les kératinocytes avait un effet négatif sur l'activité du promoteur de la kératine 5, qui est un marqueur de la prolifération,
- que cette surexpression de l'AQP3 avait un effet positif sur l'activité du promoteur de la kératine 10, qui est un marqueur de la différenciation,
- que le glycérol entrant inhibe la synthèse d'ADN et que cet effet est augmenté par l'ajout de calcium extracellulaire ou par l'expression de l'AQP3.

Ces auteurs concluent que le module de signalisation formée par l'AQP3 et la PLD2 interviendrait dans l'initiation de la différenciation des kératinocytes, via le transport du glycérol et sa transformation en phosphatidylglycérol.

Quant aux études basées chez l'homme, elles ignorent les autres aquaporines exprimées (AQP9 et AQP10). Les auteurs de ces études proposent un modèle dans lequel le glycérol transporté par l'AQP3 exerce une régulation positive de l'expression de l'AQP3, cependant il a été montré que le glycérol n'avait aucun effet sur l'expression de l'AQP3 chez l'homme (*Sugyama et al, 2001 et Nakakoshi et al, 2006*).

Enfin, concernant le lien entre prolifération tumorale et expression des aquaporines, il y a à notre sens une mauvaise interprétation des données disponibles. Tout d'abord

n'oublions pas que les cellules expriment de manière native des aquaporines. Il est donc normal que des cellules tumorales expriment également des aquaporines. Jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée à l'ensemble des aquaporines (AQP0 à 12) exprimées par les cellules tumorales. Il serait intéressant d'étudier la prolifération d'une tumeur pour laquelle chaque aquaporine exprimée serait inhibée. Pareilles études n'ont pas été réalisées, les auteurs préférant étudier le cas inverse mais peu pertinent, de souris invalidées pour une aquaporine donnée (cf. fig VI-4). Ces études ne font que souligner l'importance des aquaporines pour la survie cellulaire, quelle que soit la cellule considérée.

L'expression des aquaporines ne devrait donc pas être nécessairement considérée comme une cause ou une conséquence de la prolifération tumorale, mais plutôt être envisagée comme un moyen pour différencier les tumeurs ou encore comme une cible thérapeutique.

#### **4. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES**

Concernant le lien entre l'expression d'aquaporine et la prolifération cellulaire, notre équipe a créé de nombreuses lignées stables de cellules exprimant des aquaporines. En suivant le même protocole de transfection, sans contrôle du site d'insertion dans le génome hôte et du nombre de copies insérées, nous n'avons jamais observé d'augmentation en termes de prolifération ou de migration cellulaire pour ces cellules. Ainsi par comptage cellulaire nos clones stables de cellules HaCaT, MDCK et Hela surexprimant des aquaporines couplés à des GFP prolifèrent moins vite. Nous pensons que leur métabolisme est probablement ralenti par la surexpression de ces aquaporines.

Nous avons également étudié et comparé l'expression des aquaporines dans des cellules primaires et tumorales issues d'épidermes humains. Les mélanocytes tumoraux MNT-1 expriment l'AQP1, comme les mélanocytes humains normaux. Nous avons observé pour ces deux types cellulaires le même profil d'expression de l'AQP1 (cf. partie IV). Nous avons également étudié le cas de kératinocytes tumoraux. Les kératinocytes

tumoraux A431 n'expriment l'AQP3 qu'après confluence, contrairement aux kératinocytes humains normaux (fig. VI-6 vs fig. VI-7).

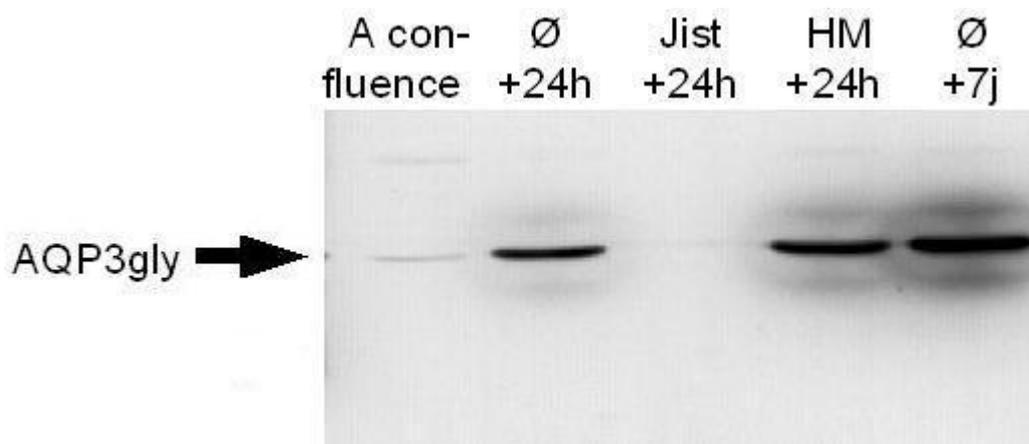
Notre équipe a travaillé enfin sur ces principes actifs qui stimulent l'expression des aquaporines, notamment la jistenine qui stimule l'expression de l'aquaporine 3 dans les kératinocytes (*Dumas et al, 2002 et 2007*) et plus récemment avec le principe actif HM qui stimule l'expression de l'aquaporine 9. La figure VI-6 montre l'expression de l'AQP3 sous forme glycosylée par des kératinocytes soumis à différentes conditions de culture. Ces formes glycosylées nous indiquent que l'AQP3 a poursuivi sa maturation à travers la voie sécrétoire. Vraisemblablement, elle est alors localisée majoritairement à la membrane plasmique. Comme on peut le voir l'expression de l'aquaporine 3 par les kératinocytes évolue au cours du temps. En prolifération, on observe de l'AQP3 principalement sous forme native et peu d'AQP3 sous forme glycosylée. Comme on l'a vu sur la figure V-11, l'AQP3 est principalement localisée au niveau des membranes intracellulaires. Les formes glycosylées de l'AQP3 sont majoritaires à confluence. Après 7 jours de différenciation induite par le calcium, il n'y a plus d'expression de l'AQP3. On remarque que l'actif HM, stimulant l'expression de l'AQP9 supprime toute expression de l'AQP3, après seulement 24h de traitement. À l'opposé pour une même période de traitement la jistenine stimule effectivement l'expression de l'AQP3 sous forme glycosylée.



**Figure VI-6. Expression de l'AQP3 dans des kératinocytes.** L'expression de l'AQP3 est détectée par western blot dans différentes conditions : en prolifération (Prolif) ; à confluence (Conf) ; après 7 jours de différenciation induite par le calcium (Diff) ; à confluence après 24h de traitement par deux actifs différents, HM et la jisténine.

Nous avons reproduit cette expérience sur une lignée de cellules tumorales, pour étudier la cinétique d'expression de l'AQP3 en présence d'un actif favorisant son expression dans les kératinocytes. Les kératinocytes A431 sont issus d'un cancer

épidermoïde. Tout d'abord on peut voir qu'à confluence ces cellules expriment peu d'AQP3 (fig. VI-7) comparé à ce que l'on obtient pour des kératinocytes normaux. On peut donc supposer que l'AQP3 dans ces cellules n'est pas impliquée dans la prolifération cellulaire. Puis dès 24 heures après confluence et sans traitement, l'expression de l'AQP3 est augmentée (fig. VI-7 Ø+24h). Sept jours après confluence et sans traitement supplémentaire, l'expression d'AQP3 a encore augmenté (fig. VI-7 Ø+7j). Seule l'expression d'AQP3 sous forme glycosylée est observée. Nous avons alors testé les deux actifs sur cette lignée. Alors que la jisténine stimule l'expression de l'AQP3 dans les kératinocytes humains normaux, son effet est ici inversé. Elle supprime toute expression de l'AQP3 dans cette lignée tumorale. Le mélange d'actifs HM qui stimule l'expression de l'AQP9 et abolit l'expression de l'AQP3 dans des kératinocytes humains normaux, augmente au contraire l'expression de l'AQP3 dans cette lignée tumorale. Nous avons donc des résultats complètement opposés à ceux obtenus pour les kératinocytes humains, que ce soit en présence ou en absence d'actifs stimulant l'expression d'aquaporine.



**Figure VI-7. Immunodétection de l'AQP3 après transfert des protéines totales de kératinocytes tumoraux A431 en culture.** Ø+24h, 24h sans traitement après confluence ; Jist+24h, 24h sous jistenine après confluence ; HM+24h, 24h sous HM après confluence ; Ø+7j, 7 jours sans traitement après confluence.

D'un côté l'extrait de jisténine inhibe l'expression de l'AQP3 dans les cellules tumorales A431, on pourrait penser que la prolifération de ces cellules est empêchée (cf. figure VI-5). D'un autre côté, le profil d'expression obtenu après traitement à la jisténine est identique au profil des cellules à confluence. Cela signifie-t-il que la jisténine favorise

un retour à l'état prolifératif ? En l'absence de plus de données, telles que la localisation intracellulaire de l'AQP3 ou encore l'expression d'autres aquaporines, il est impossible de trancher.

## 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pour conclure, nous avons mis en évidence une expression complexe et diversifiée des aquaporines par les cellules composant l'épiderme humain. Pourtant des questions demeurent.

Nous avons montré que l'AQP1 était présente dans les mélanocytes humains normaux et dans les mélanocytes tumoraux MNT-1. Cependant nous n'avons pu la localiser précisément et son rôle reste à déterminer. Pour cela nous pouvons envisager d'étudier les conséquences d'un manque d'AQP1 sur la prolifération, la motilité cellulaire, la dendricité et la survie des mélanocytes normaux ou tumoraux. Il conviendrait d'étudier également les effets du rayonnement UV sur l'expression de cette aquaporine.

D'autre part, nous avons également montré que les kératinocytes exprimaient trois aquaglycéroporines différentes (AQPs 3, 9 et 10). Nous avons mis en évidence des régulations de l'expression des aquaporines au cours de la différenciation des kératinocytes, il serait intéressant d'étudier davantage ce mécanisme, de même que le changement de localisation de l'AQP3 au cours de la différenciation. Les kératinocytes sont-ils un cas particulier ou est-ce généralisable ? Des données préliminaires semblent montrer que ce changement de localisation de l'AQP3 dépendant du calcium n'est pas le fait que des seuls kératinocytes. Notre équipe développe un modèle expérimental de cellules MDCK exprimant des protéines de fusion AQP3-GFP, dans lequel la localisation de l'AQP3 semble être dépendante de la concentration de calcium extracellulaire. N'oublions pas que nous n'avons étudié que l'expression des aquaporines 0 à 10, qu'en est-il des aquaporines 11 et 12 ?

Enfin, il conviendrait également d'étudier avec attention les AQP9 et 10 exprimées par les kératinocytes. Pour l'AQP10, il reste à préciser sa localisation, mais également sa

fonction. Agit-elle comme un transporteur d'eau, de glycérol ou des deux ? Comment ces deux aquaporines sont-elles régulées ? La création d'anticorps spécifiques dirigés contre l'AQP9 et l'AQP10 humaine devrait permettre pour la première fois l'étude ex vivo de l'expression et de la localisation de ces trois aquaporines dans l'épiderme. L'étude de différentes conditions (épiderme blessé, vieilli, exposé au Uvs...) devraient également apporter des éléments de réponses.

## **VII. BIBLIOGRAPHIE**

**Ackerman A. B. ; Böer A. ; Bennin B. ; Gottlieb G. J.** *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases.* Ardor Scribendi 2002-2006.

**Adams S. ; Pankow S. ; Werner S. ; Munz B.** *Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair.* J Invest Dermatol. 2007 ; 127(3):538-44.

**Agren J. ; Zelenin S. ; Håkansson M. ; Eklöf A. C. ; Aperia A. ; Nejsum L. N. ; Nielsen S. ; Sedin G.** *Transepidermal water loss in developing rats: role of aquaporins in the immature skin.* Pediatr Res. 2003 ; 53(4):558-65.

**Aishima S. ; Kuroda Y. ; Nishihara Y. ; Taguchi K. ; Iguchi T. ; Taketomi A. ; Maehara Y. ; Tsuneyoshi M.** *Down-regulation of aquaporin-1 in intrahepatic cholangiocarcinoma is related to tumor progression and mucin expression.* Hum Pathol. 2007 ; 38(12):1819-25.

**Ancans J. ; Tobin D. J. ; Hoogduijn M. J. ; Smit N. P. ; Wakamatsu K. ; Thody A. J.** *Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells.* Exp Cell Res. 2001 ; 268(1):26-35.

**Arnautova I. , Cawley N. X. , Patel N. , Kim T. , Rathod T. , Peng Loh Y.** *Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells.* Mol Endocrinol. 2008 ; 22(8):1924-34.

**Bamberger C. Pollet D. ; Schmale H.** *Retinoic acid inhibits downregulation of DeltaNp63alpha expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes.* J Invest Dermatol. 2002 ; 118(1):133-8.

**Berens W. ; Van Den Bossche K. ; Yoon T.-J. ; Westbroek W. ; Valencia J. C. ; Out C. J. ; Naeyaert J.-M. ; Hearing V. J. ; Lambert J.** *Different approaches for assaying melanosome transfer.* Pigment Cell Res. 2005 ; 18(5):370-81.

**Bikle D. D. ; Oda Y. ; Xie Z.** *Calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>D: interacting drivers of epidermal differentiation.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 ; 89-90(1-5):355-60.

**Bikle D. D. ; Pillai S.** *Vitamin D, Calcium, and Epidermal Differentiation.* Endocr Rev. 1993 ; 14(1):3-19.

**Bikle D. D. ; Pillai S. ; Gee E. ; Hincenbergs M.** *Tumor necrosis factor-alpha regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production by human keratinocytes.* Endocrinology. 1991 ;129(1):33-8.

**Boess F. ; Kamber M. ; Romer S. ; Gasser R. ; Muller D. ; Albertini S. ; Suter L.** *Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems.* Toxicol Sci. 2003 ; 73(2):386-402.

**Bollag W. B. ; Xie D. ; Zheng X. ; Zhong X.** *A potential role for the Phospholipase D2-Aquaporin-3 signaling module in early keratinocyte differentiation : production of a Phosphatidylglycerol signaling lipid.* J Invest Dermatol. 2007 ; 127(12):2823-31.

**Boukamp P. ; Petrussevska R. T. ; Breitkreutz D. ; Hornung J. ; Markham A. ; Fusenig N. E.** *Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* J Cell Biol. 1988 ; 106(3):761-71.

**Boulais N. , Misery L.** *The epidermis : a sensory tissue.* Eur J Dermatol. 2008 Mar ;18(2):119-27.

**Boury-Jamot M. ; Daraspe J. ; Bonté F. ; Perrier E. ; Schnebert S. ; Dumas M. ; Verbavatz J.-M.** *Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis.* Handb Exp Pharmacol. 2009 ; (190):205-17.

**Boury-Jamot M. ; Sougrat R. ; Tailhardat M. ; Le Varlet B. ; Bonté F. ; Dumas M. ; Verbavatz J.-M.** *Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter?* Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1758(8):1034-42.

**Boyce S. T. ; Ham R. G.** *Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture.* J Invest Dermatol. 1983 ; 81(1 Suppl):33s-40s.

**Candi E. ; Schmidt R. ; Melino G.** *The cornified envelope: a model of cell death in the skin.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 ; 6(4):328-40.

**Carbrey J. M. ; Gorelick-Feldman D. A. ; Kozono D. ; Praetorius J. ; Nielsen S. ; Agre P.** *Aquaglyceroporin AQP9 : solute permeation and metabolic control of expression in liver.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ; 100(5):2945-50.

**Catalán V. ; Gómez-Ambrosi J. ; Pastor C. ; Rotellar F. ; Silva C. ; Rodríguez A. ; Gil M. J. ; Cienfuegos J. A. ; Salvador J. ; Vendrell J. ; Frühbeck G.** *Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver.* Obes Surg. 2008 ; 18(6):695-701.

**Ceperuelo-Mallafre V. ; Miranda M. ; Chacón M. R. ; Vilarrasa N. ; Megia A. ; Gutiérrez C. ; Fernández-Real J. M. ; Gómez J. M. ; Caubet E. ; Frühbeck G. ; Vendrell J.** *Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab. 2007 ; 92(9):3640-5.

**Christophers E. ; Kligman A. M.** *Visualization of the cell layers of the stratum corneum.* J Invest Dermatol. 1964 ; 42:407-9.

**Cummings B.** *Series in life science 2000.* Addison Wesley Longman.

**De Baey A. ; Lanzavecchia A.** *The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis.* J Exp Med. 2000 ; 191(4):743-8.

**Deen P. M. ; Verdijk M. A. ; Knoers N. V. ; Wieringa B. ; Monnens L. A. ; van Os C. H. ; van Oost B. A.** *Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine.* Science. 1994 ; 264(5155):92-5.

**De Groot B. L. ; Engel A. ; Grubmüller H.** *The structure of the aquaporin-1 water channel: a comparison between cryo-electron microscopy and X-ray crystallography.* J Mol Biol. 2003A ; 325(3):485-93.

**De Groot B. L. ; Frigato T. ; Helms V. ; Grubmüller H.** *The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel.* J Mol Biol. 2003B ; 333(2):279-93.

**De Groot B. L. ; Grubmüller H.** *Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF.* Science. 2001 ; 294(5550):2353-7.

**Dell'Angelica E. C. ; Aguilar R. C. ; Wolins N. ; Hazelwood S. ; Gahl W. A. ; Bonifacino J. S.** *Molecular characterization of the protein encoded by the Hermansky-Pudlak syndrome type 1 gene.* J Biol Chem. 2000 ; 275(2):1300-6.

**Denda M.** *Skin barrier function as a self-organizing system.* Forma. 2000 15:227-232.

**Denda M. ; Sato J. ; Masuda Y. ; Tsuchiya T. ; Koyama J. ; Kuramoto M. ; Elias P. M. ; Feingold K. R.** *Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function.* J Invest Dermatol. 1998 ; 111(5):858-63.

**Denker B. M. ; Smith B. L. ; Kuhajda F. P. ; Agre P.** *Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28.000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules.* J Biol Chem. 1988 ; 263(30):15634-42.

**Deveci M. ; Gilmont R. R. ; Terashi H. ; Ahmed A. H. ; Smith D. J. ; Marcelo C.** *Melanocyte-conditioned medium stimulates while melanocyte/keratinocyte contact inhibits keratinocyte proliferation.* J Burn Care Rehabil. 2001 ; 22(1):9-14.

**Devuyst O.** *La perméabilité épithéliale à l'eau : du concept à la physiopathologie.* Louvain Médical. 1998 117:394-408.

**Devuyst O. ; Ni J. ; Verbavatz J.-M.** *Aquaporin-1 in the peritoneal membrane : implications for peritoneal dialysis and endothelial cell function.* Biol Cell. 2005 ; 97(9):667-73.

**Dumas M. ; Gondran C. ; Barré P. ; Sougrat R. ; Verbavatz J.-M. ; Heusèle C. ; Schnébert S. ; Bonté F.** *Effect of an *Ajuga turkestanica* extract on aquaporin 3 expression, water flux, differentiation and barrier parameters of the human epidermis.* Eur J Dermatol. 2002 ; 12(6):XXV-XXVI.

**Dumas M. ; Sadick N. S. Noblesse E. ; Juan M. ; Lachmann-Weber N. ; Boury-Jamot M. ; Sougrat R. ; Verbavatz J.-M. ; Schnebert S. ; Bonté F.** *Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins.* J Drugs Dermatol. 2007 ; 6(6 Suppl):s20-4.

**Elias P. M.** *The Epidermal Permeability Barrier: From the Early Days at Harvard to Emerging Concepts.* J Invest Dermatol. 2004 ; 122(2):xxxvi-xxxix.

**Elias P. M.** *Stratum corneum defensive functions: an integrated view.* J Invest Dermatol. 2005 ; 125(2):183-200.

**Elias P.M. ; Brown B. E. ; Fritsch P. ; Goerke J. ; Gray G. M. ; White R. J.** *Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum.* J Invest Dermatol. 1979 ; 73(5):339-48.

**Engel A. ; Fujiyoshi Y. ; Agre P.** *The importance of aquaporin water channel protein structures.* EMBO J. 2000 ; 19(5):800-6.

**Fleischmajer R. ; Witten V. H.** *Studies of thorium X applied to human skin.* J Invest Dermatol. 1955 ; 25(4):223-32.

**Fluhr J. W. ; Behne M. J. ; Brown B. E. ; Moskowitz D. G. ; Selden C. ; Mao-Qiang M. ; Mauro T. M. ; Elias P. M. ; Feingold K. R.** *Stratum Corneum Acidification in Neonatal Skin: Secretory Phospholipase A2 and the Sodium/Hydrogen Antiporter-1 Acidify Neonatal Rat Stratum Corneum.* J Invest Dermatol. 2004 ; 122(2):320-9.

**Freinkel R. K. ; Woodley D.** *The biology of the skin.* Parthenon Publishing, New-York 2001.

**Friedman M. H.** *Principles and models of biological transport.* Springer 2008.

**Frigeri A. ; Gropper M. A. ; Umenishi F. ; Kawashima M. ; Brown D. ; Verkman A. S.** *Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues.* J Cell Sci. 1995 ; 108 (Pt 9):2993-3002.

**Fu D. ; Libson A. ; Miercke L. J. ; Weitzman C. ; Nollert P. ; Krucinski J. ; Stroud R. M.** *Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity.* Science. 2000 ; 290(5491):481-6.

**Fuchs E.** *Skin stem cells : rising to the surface.* J Biol Chem. 2008 ; 180(2):273-84.

**Gilbert S. F.** *Developmental Biology Seventh Edition.* Sinauer Associates 2004.

**Giusti F. ; Martella A. ; Bertoni L. ; Seidenari S.** *Skin barrier, hydration, and pH of the skin of infants under 2 years of age.* Pediatr Dermatol. ; 18(2):93-6.

**Goldstein D. A. ; Solomon A. K.** *Determination of equivalent pore radius for human red cells by osmotic pressure measurement.* J Gen Physiol. ; 44:1-17.

**Grice K. ; Sattar H. ; Baker H.** *The effect of ambient humidity on transepidermal water loss.* J Invest Dermatol. 1972 ; 58(6):343-6.

**Grubauer G. ; Feingold K. R. ; Harris R. M. ; Elias P. M.** *Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier.* J Invest Dermatol. ; 30(1):89-96.

**Gunathilake R. ; Schurer N. Y. ; Shoo B. A. ; Celli A. ; Hachem J. P. ; Crumrine D. ; Sirimanna G. ; Feingold K. R. ; Mauro T. M. ; Elias P. M.** *pH-regulated mechanisms account for pigment-type differences in epidermal barrier function.* J Invest Dermatol. 2009 ; 129(7):1719-29.

**Gupta P. B. ; Kuperwasser C. ; Brunet J. P. ; Ramaswamy S. ; Kuo W. L. ; Gray J. W. ; Naber S. P. ; Weinberg R. A.** *The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation.* Nat Genet. ; 37(10):1047-54.

**Hara M. , Ma T. , Verkman A. S.** *Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity and barrier recovery.* J Biol Chem. 2002 ; 277(48):46616-21.

**Hara M. ; Verkman A. S.** *Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ; 100(12):7360-5.

**Hara-Chikuma M. , Sohara E. , Rai T. , Ikawa M. , Okabe M. , Sasaki S. , Ushida S. , Verkman A. S.** *Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice : adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation.* J Biol Chem. 2005 ; 280(16):15493-6.

**Hara-Chikuma M. ; Verkman A. S.** *Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin.* Biol Cell. 2005 ; 97(7):479-86.

**Hara-Chikuma M. ; Verkman A. S.** *Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule.* J Am Soc Nephrol. 2006 ; 17(1):39-45.

**Hara-Chikuma M. , Verkman A. S.** *Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption.* Mol Cell Biol. 2008 ; 28(1):326-32.

**Hasegawa H. ; Lian SC. ; Finkbeiner W. E. ; Verkman A. S.** *Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and antibody staining.* Am J Physiol. 1994 ; 266(4 Pt 1):C893-903.

**Hatakeyama S. ; Yoshida Y. ; Tani T. ; Koyama Y. ; Nihei K. ; Ohshiro K. ; Kamiie J.-I. ; Yaoita E. ; Suda T. Hatakeyama K. ; Yamamoto T.** *Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum.* Biochem Biophys Res Commun 2001 ; 287(4):814-9.

**Hennings H. ; Michael D. ; Cheng C. ; Steinert P. ; Holbrook K. ; Yuspa S. H.** *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal Cells in culture.* Cell. 1980 ; 19(1):245-54.

**Heymann J. B. ; Engel A.** *Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels.* News Physiol Sci. 1999 ; 14:187-193.

**Hibuse T. ; Maeda N ; Funahashi T. ; Yamamoto K. ; Nagasawa A. ; Mizunoya W. ; Kishida K. ; Inoue K. ; Kuriyama H. ; Nakamura T. ; Fushiki T. ; Kihara S. ; Shimomura I.** *Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 ; 102(31):10993-8.

**Hibuse T . , Maeda N. ; Nagasawa A. ; Funahashi T.** *Aquaporins and glycerol metabolism.* Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1758(8):1004-11.

**Hitomi K.** *Transglutaminases in skin epidermis.* Eur J Dermatol. 2005 ; 15(5):313-9.

**Hohl D. ; Lichti U. ; Breitzkreutz D. ; Steinert P. M. ; Roop D. R.** *Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid.* J Invest Dermatol. 1991 ; 96(4):414-8.

**Hoque M. O. ; Soria J.-C. ; Woo J. ; Lee T. ; Lee J. ; Jang S. J. ; Upadhyay S. ; Trink B. ; Monitto C. ; Desmaze C. ; Mao L. ; Sidransky D. ; Moon C.** *Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth.* Am J Pathol. 2006 ; 168(4):1345-53.

**Hu H. ; Yao H. T. ; Zhang W. P. ; Zhang L. ; Ding W. ; Zhang S. H. ; Chen Z. ; Wei E. Q.** *Increased expression of aquaporin-4 in human traumatic brain injury and brain tumors.* J Zhejiang Univ Sci B. 2005 ; 6(1):33-7.

**Hu J. ; Verkman A. S.** *Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels.* FASEB J. 2006 ; 20(11):1892-4.

**Hub J. S. ; De Groot B. L.** *Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ; 105(4):1198-203.

**Ishibashi K.** *Aquaporin subfamily with unusual NPA box.* Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1758(8):989-93.

**Ishibashi K.** *New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12.* Handb Exp Pharmacol. 2009 ;(190):251-62.

**Ishibashi K. ; Morinaga T. ; Kuwahara M. ; Sasaki S. ; Imai M.** *Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin.* Biochim Biophys Acta. 2002 ;1576(3):335-40.

**Itoh T. , Rai T. , Kuwahara M. , Ko S. B. H. , Ushida S. , Sasaki S. , Ishibashi K.** *Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells.* Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 330(3):832-8.

**Jeremic A. ; Cho W. J. ; Jena B. P.** *Involvement of water channels in synaptic vesicle swelling.* Exp Biol Med (Maywood). 2005 ; 230(9):674-80.

**Jung J. S. ; Preston G. M. ; Smith B. L. ; Guggino W. B. ; Agre P.** *Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model.* J Biol Chem. 1994 ; 269(20):14648-54.

**Kageyama Y. ; Sasaki S. ; Yamamura Y. ; Oshima H. ; Ikawa Y.** *Water channel protein subtype suggests the origin of renal cell carcinoma.* J Urol. 1996 ; 156(1):291-5.

**Kamsteeg E.-J. ; Heijnen I. ; van Os C. H. ; Deen P. M.** *The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers.* J Cell Biol. 2000 ; 151(4):919-30.

**Kamsteeg E.-J. ; Hendriks G. ; Boone M. ; Konings I. B. M. ; Oorschot V. ; van der Sluijs P. ; Klumperman J. ; Deen P. M. T.** *Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 ; 103(48):18344-9.

**Kishida K. ; Kuriyama H. ; Funahashi T. ; Shimomura I. ; Kihara S. ; Ouchi N. ; Nishida M. ; Nishizawa H. ; Matsuda M. ; Takahashi M. ; Hotta K. ; Nakamura T. ; Yamashita S. ; Tochino Y. ; Matsuzawa Y.** *Aquaporin Adipose, a putative glycerol channel in adipocytes.* J Biol Chem. 2000 ; 275(27):20896-902.

**Kondo H. ; Shimomura I. ; Kishida K. ; Kuriyama H. ; Makino Y. ; Nishizawa H. ; Matsuda M. ; Maeda N. ; Nagaretani H. ; Kihara S. ; Kurachi Y. ; Nakamura T. ; Funahashi T. ; Matsuzawa Y.** *Human aquaporin adipose (AQPap) gene.* Genomic

*structure, promoter analysis and functional mutation.* Eur J Biochem. 2002 ; 269(7):1814-26.

**Korting H. C. ; Hübner K. ; Greiner K. ; Hamm G. ; Braun-Falco O.** *Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5.5 and pH 7.0. Results of a crossover trial in healthy volunteers.* Acta Derm Venereol. 1990 ; 70(5):429-31.

**Kuriyama H. ; Kawamoto S. ; Ishida N. ; Ohno I. ; Mita S. ; Matsuzawa Y. ; Matsubara K. ; Okubo K.** *Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability.* Biochem Biophys Res Commun 1997 ; 241(1):53-8.

**Kushimoto T. ; Basrur V. ; Valencia J. ; Matsunaga J. ; Vieira W. D. ; Ferrans V. J. ; Muller J. ; Appella E. ; Hearing V. J.** *A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 ; 98(19):10698-703.

**Landmann L.** *Epidermal permeability barrier : transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study.* J Invest Dermatol. 1986 ; 87(2):202-9.

**Lee M. D. ; Bhakta K. Y. ; Raina S. ; Yonescu R. ; Griffin C. A. ; Copeland N. G. ; Gilbert D. J. ; Jenkins N. A. ; Preston G. M. ; Agre P.** *The human aquaporin-5 gene molecular characterization and chromosomal localization.* J Biol Chem. 1996 ; 271(15):8599-604.

**Leitch V. ; Agre P. ; King L. S.** *Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 ; 98(5):2894-8.

**Li H. ; Kamiie J. ; Morishita Y. ; Yoshida Y. ; Yaoita E. ; Ishibashi K. ; Yamamoto T.** *Expression and localization of two isoforms of AQP10 in human small intestine.* Biol Cell. 2005 ; 97(11):823-9.

**Lin J. Y ; Fisher D. E.** *Melanocytes biology and skin pigmentation.* Nature. 2007 ; 445(7130):843-50.

**Ma L. ; Huang Y.-G. ; Deng Y.-C. ; Tian J.-Y. ; Rao Z.-R. ; Che H.-L. ; Zhang H.-F. ; Zhao G.** *Topiramate reduced sweat secretion and aquaporin-5 expression in sweat glands of mice.* Life Sci. 2007 ; 80(26):2461-8.

**Ma T. ; Hara M. ; Sougrat R. ; Verbavatz J.-M. ; Verkman A. S.** *Impaired Stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3.* J Biol Chem. 2002 ; 277(19):17147-53.

**Ma T. ; Yang B. ; Gillespie A. ; Carlson E. J. ; Epstein C. J. ; Verkman A. S.** *Severly impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels.* J Biol Chem. 1998 ; 273(8):4296-9.

**Maeda N. ; Funahashi T. ; Hibuse T. ; Nagasawa A. ; Kishida K. ; Kuriyama H. ; Nakamura T. ; Kihara S. ; Shimomura I. ; Matsuzawa Y.** *Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 ; 101(51):17801-6.

**Maeda N. ; Funahashi T. ; Shimomura I.** *Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2008 ; 4(11):627-34.

**Maeda N. ; Hibuse T. ; Funahashi T.** *Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism ; involvement in obesity.* Handb Exp Pharmacol. 2009 ; (190):233-49.

**Marchini G. ; Stabi B. ; Kankes K. ; Lonne-Rahm S. ; Ostergaard M. ; Nielsen S.** *AQP1 and AQP3, psoriasin and nitric oxide synthases 1-3 are inflammatory mediators in erythema toxicum neonatorum.* Pediatr Dermatol. 2003 ; 20(5):377-84.

**Markert J. M. ; Fuller C. M. ; Gillespie G. Y. ; Bubien J. K. ; McLean M. C. ; Hong R. L. ; Lee K. ; Gullans S. R. ; Mapstone T. B. ; Benos D. J.** *Differential gene expression profiling in human brain tumors.* Physiol Genomics. 2001 ; 5(1):21-33.

**Marks M. S. ; Seabra M. C.** *The melanosome : membrane dynamics in black and white.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 ; 2(10):738-48.

**Mazal P. R. ; Susani M. ; Wrba F. ; Haitel A.** *Diagnostic significance of aquaporin-1 in liver tumors.* Hum Pathol. 2005 ; 36(11):1226-31.

**McCoy E. ; Sontheimer H.** *Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes.* Glia. 2007 ; 55(10):1034-43.

**McGrath J.A.; Eady R.A.J.; Pope F.M.** *Chapter 3 : Anatomy and Organization of Human Skin.* Rook's Textbook of Dermatology (Seventh Edition) 2008.

**Menon G. K. ; Elias P. M. ; Feingold K. R.** *Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient.* Br J Dermatol. 1994 ; 130(2):139-47.

**Menon G. K. ; Grayson S. ; Elias P. M.** *Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry.* J Invest Dermatol. 1985 ; 84(6):508-12.

**Minami S. ; Kobayashi H. ; Yamashita A. ; Yanagita T. ; Uezono Y. ; Yokoo H. ; Shiraishi S. ; Saitoh T. ; Asada Y. ; Komune S. ; Wada A.** *Selective expression of aquaporin 1, 4 and 5 in the rat middle ear.* Hear Res. 2001 ; 158(1-2):51-6.

**Missiaen L. ; Robberecht W. ; Van Den Bosch L. ; Callewaert G. ; Parys J. B. ; Wuytack F. ; Raeymaekers L. ; Nilius B. ; Eggermont J. ; De Smedt H.** *Abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and disease.* Cell Calcium. 2000 ; 28(1):1-21.

**Miyamura Y. ; Coelho S. G. ; Wolber R. ; Miller S. A. ; Wakamatsu K. ; Zmudzka B. Z. ; Ito S. ; Smuda C. ; Passeron T. ; Choi W. ; Batzer J. ; Yamaguchi Y. ; Beer J. Z. ; Hearing V. J.** *Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation.* Pigment Cell Res. 2007 ; 20(1):2-13.

**Mobasher A. ; Marples D.** *Expression of the AQP-1 channel in normal human tissues : a semiquantitative study using tissue microarray technology.* Am J Physiol Cell Physiol. 2004 ; 286(3):C529-37.

- Mobasheri A. ; Shakibaei M. ; Marples D.** *Immunohistochemical localization of aquaporin 10 in the apical membranes of the human ileum: a potential pathway for luminal water and small solute absorption.* Histochem Cell Biol. 2004 ; 121(6):463-71.
- Möller C. ; Fotiadis D. ; Suda K. ; Engel A. ; Kessler M. ; Müller D. J.** *Determining molecular forces that stabilize human aquaporin-1.* J Struct Biol. 2003 ; 142(3):369-78.
- Monger D. J. ; Williams M. L. ; Feingold K. R. ; Brown B. E. ; Elias P. M.** *Localization of sites of lipid biosynthesis in mammalian epidermis.* J Lipid Res. 1988 ; 29(5):603-12.
- Monzani E. ; Bazzotti R. ; Perego C. ; La Porta C. A.** *AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin.* PLoS One. 2009 ; 4(7):e6167.
- Moon C. ; Rousseau R. ; Soria J.-C. ; Hoque M. O. ; Lee J. ; Jang S. J. ; Trink B. ; Sidransky D. ; Mao L.** *Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells.* Am J Hematol. 2004 ; 75(3):128-33.
- Moon C. ; Soria J. C. ; Jang S. J. ; Lee J. ; Obaidul Hoque M. ; Sibony M. ; Trink B. ; Chang Y. S. ; Sidransky D. ; Mao L.** *Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis.* Oncogene. 2003 ; 22(43):6699-703.
- Morinaga T. ; Nakakoshi M. ; Hirao A. ; Imai M. ; Ishibashi K.** *Mouse aquaporin 10 gene (AQP10) is a pseudogene.* Biochem Biophys Res Commun 2002 ; 294(3):630-4.
- Morishita Y. ; Matsuzaki T. ; Hara-Chikuma M. ; Andoo A. ; Shimono M. ; Matsuki A. ; Kobayashi K. ; Ikeda M. ; Yamamoto T. ; Verkman A. ; Kusano E. ; Ookawara S. ; Takata K. ; Sasaki S. ; Ishibashi K.** *Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule.* Mol Cell Biol. 2005 ; 25(17):7770-9.
- Mulders S. M. ; Preston G. M. ; Deen P. M. ; Guggino W. B. ; Van Os C. H. ; Agre P.** *Water channel properties of major intrinsic protein of lens.* J Biol Chem. 1995 ; 270(15):9010-16.

**Müller E. J. ; Williamson L. ; Kolly C. ; Suter M. M.** *Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?* J Invest Dermatol. 2008 ; 128(3):501-16.

**Murata K. ; Mitsuoka K. ; Hirai T. ; Walz T. ; Agre P. ; Heymann J. B. ; Engel A. ; Fujiyoshi Y.** *Structural determinants of water permeation through aquaporin-1.* Nature. 2000 ; 407(6804):599-605.

**Nakakoshi M. ; Morishita Y. ; Usui K. ; Ohtsuki M. ; Ishibashi K.** *Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3.* Biol Cell. 2006 ; 98(2):95-100.

**Nardello-Rataj V. ; Bonté F.** *Chimie et cosmétiques : une longue histoire ponctuée d'innovations.* L'actualité chimique N°323-324 2008.

**Nejsum L. N.** *The renal plumbing system : aquaporin water channels.* Cellular and Molecular Life Sci. 2005 ; 62(15):1692-706.

**Nejsum L. N. ; Kwon T.-H. ; Jensen U. B. ; Fumagalli O. ; Frokiaer J. ; Krane C. M. ; Menon A. G. ; King L. S. ; Agre P. C. ; Nielsen S.** *Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 ; 99(1):511-6.

**Nemes Z. ; Marekov L. N. ; Steinert P. M.** *Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity.* J Biol Chem. 1999 ; 274(16):11013-21.

**Nielsen S. ; Frokiaer J. ; Marples D. ; Kwon T.-H. ; Agre P. ; Knepper M. A.** *Aquaporins in the kidney : from molecules to medicine.* Physiol Rev. 2002 ; 82(1):205-44.

**Nielsen S. ; King L. S. ; Christensen B. M. ; Agre P.** *Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat.* Am J Physiol. 1997 ; 273(5 Pt 1):C1549-61.

**Nielsen S. ; Kwon T.-H. ; Frokiaer J. ; Agre P.** *Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders.* J Intern Med. 2007 ; 261(1):53-64.

**Nielsen S. ; Smith B.L. ; Christensen E. I. ; Agre P.** *Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epitheli and capillary endothelia.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 ; 90(15):7275-9.

**Nihei K. ; Koyama Y. ; Tani T. ; Yaoita E. ; Ohshiro K. ; Adhikary L. P. ; Kurosaki I. ; Shirai Y. ; Hatakeyama K. ; Yamamoto T.** *Immunolocalization of aquaporin-9 in rat hepatocytes and Leydig cells.* Arch Histol Cytol. 2001 ; 64(1):81-8.

**Nouri K.** *Skin Cancer.* McGraw-Hill Professional 2007.

**Papadopoulos M C. ; Saadoun S. ; Verkman A. S.** *Aquaporins and cell migration.* Pflugers Arch. 2008 ; 456(4):693-700.

**Pasonen-Seppänen S. M. ; Maytin E. V. ; Törrönen K. J. ; Hyttinen J. M. ; Hascall V. C. ; MacCallum D. K. ; Kultti A. H. ; Jokela T. A. ; Tammi M. I. ; Tammi R. H.** *All-trans retinoic acid-induced hyaluronan production and hyperplasia are partly mediated by EGFR signaling in epidermal keratinocytes.* J Invest Dermatol. 2008 ; 128(4):797-807.

**Peiss C. N. ; Randall W. C. ; Hertzman A. B.** *Hydration of the Skin and Its Effect on Sweating and Evaporative Water Loss.* J Invest Dermatol. 1956 ; 26(6):459-70.

**Pisano M. M. ; Chepelinsky A. B.** *Genomic cloning, complete nucleotide sequence, and structure of the human gene encoding the major intrinsic protein (MIP) of the lens.* Genomics. 1991 ; 11(4):981-90.

**Potts R. O. ; Francoeur M. L.** *The influence of stratum corneum morphology on water permeability.* J Invest Dermatol. 1991 ; 96(4):495-9.

**Preston G. M. ; Agre P.** *Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons : member of an ancient channel family.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 ; 88(24):11110-4.

**Preston G. M. ; Carroll T. P. ; Guggino W. B. ; Agre P.** *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein.* Science. 1992 ; 256(5055):385-7.

**Preston G. M. ; Jung J. S. ; Guggino W. B. ; Agre P.** *The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel.* J Biol Chem. 1993 ; 268(1):17-20.

**Proksch E. ; Brandner J. M.; Jensen J.-M.** *The skin: an indispensable barrier.* Exp Dermatol. 2008 ; 17(12):1063-72.

**Prudente S. ; Flex E. ; Morini E. ; Turchi F. ; Capponi D. ; De Cosmo S. ; Tassi V. ; Guida V. ; Avogaro A. ; Folli F. ; Maiani F. ; Frittitta L. ; Dallapiccola B. ; Trischitta V.** *A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities.* Diabetes. 2007 ; 56(5):1468-74.

**Ranchin B. ; Boury-Jamot M. ; Blanchard G. ; Dubourg L. ; Hadj-Aïssa A. ; Morin D. ; Durroux T. ; Cochat P. ; Bricca G. ; Verbavatz J.-M. ; Geelen G.** *Familial Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis : Dissociation between Aquaporin-2 and Vasopressin Excretion.* J Clin Endocrinol Metab. 2010 ; 95(9):E37-43.

**Raposo G. ; Marks M. S.** *The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis.* Traffic. 2002 ; 3(4):237-48.

**Raposo G. ; Marks M. S.** *Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 ; 8(10):786-97.

**Raposo G. ; Tenza D. ; Murphy D. ; Berson J. F. ; Marks M. S.** *Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells.* J Cell Biol. 2001 ; 152(4):809-24.

**Reichrath J.** *Molecular Mechanisms of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas.* Landes Bioscience 2006.

**Rodríguez A. ; Catalán V. ; Gómez-Ambrosi J. ; Frühbeck G.** *Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice.* FEBS Lett. 2006 ; 580(20):4771-6.

**Rojek A. ; Praetorius J. ; Frokiaer J. ; Nielsen S. ; Fenton R. A.** *A current view of the mammalian aquaglyceroporins.* Annu Rev Physiol. 2008 ; 70:301-27.

**Rojek A. M. ; Skowronski M. T. ; Füchtbauer E. M. ; Füchtbauer A. C. ; Fenton R. A. ; Agre P. ; Frøkiaer J. ; Nielsen S.** *Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 ; 104(9):3609-14.

**Roudier N. ; Verbavatz J.-M. ; Maurel C. ; Ripoche P.; Tacnet F.** *Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells.* J Biol Chem. 1998 ; 273(14):8407-12.

**Saadoun S. ; Papadopoulos M. C. ; Hara-Chikuma M. ; Verkman A. S.** *Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption.* Nature. 2005 ; 434(7034):786-92.

**Scheuplein R.J. ; Blank I. H.** *Permeability of the skin.* Physiol Rev. 1971 ; 51(4):702-47.

**Schrier R. W.** *Body water Homeostasis : clinical disorders of urinary dilution and concentration.* J Am Soc Nephrol. 2006 ; 17(7):1820-32.

**Shiels A. ; Bassnett S. ; Varadaraj K. ; Mathias R. ; Al-Ghoul K. ; Kuszak J. ; Donoviel D. ; Lilleberg S. ; Friedrich G. ; Zambrowicz B.** *Optical dysfunction of the crystalline lens in aquaporin-0-deficient mice.* Physiol Genomics. 2001 ; 7(2):179-86.

**Slominski A. ; Tobin D. J. ; Shibahara S. ; Wortsman J.** *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation.* Physiol Rev. 2004 ; 84(4):1155-228.

**Smith E. L. ; Walworth N. C. ; Holick M. F.** *Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions.* J Invest Dermatol. 1986 ; 86(6):709-14.

**Sohara E. ; Rai T. ; Sasaki S. ; Uchida S.** *Physiological roles of AQP7 in the kidney : lessons from AQP7 knockout mice.* Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1758(8):1106-10.

**Sohara E. ; Uchida S. ; Sasaki S.** *Function of aquaporin-7 in the kidney and the male reproductive system.* Handb Exp Pharmacol. 2009 ; (190):219-31.

**Song Y. ; Sonawane N. ; Verkman A. S.** *Localization of aquaporin-5 in sweat glands and functional analysis using knockout mice.* J Physiol. 2002 ; 541(Pt 2):561-8.

**Sougrat R. , Morand M. , Gondran C. , Baaré P. , Gobin R. , Bonté F. , Dumas M. , Verbavatz J.-M.** *Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis.* J Invest Dermatol. 2002 ; 118(4):678-85.

**Sugiya H. , Matsuki-Fukushima M. , Hashimoto S.** *Role of aquaporins and regulation of secretory vesicle volume in cell secretion.* J Cell Mol Med. 2008 ; 12(5A):1486-94.

**Sugiyama Y. , Ota Y. , Hara M. , Inoue S.** *Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes.* Biochim Biophys Acta. 2001 ; 1522(2):82-8.

**Sui H. ; Han B. G. ; Lee J. K. ; Walian P. ; Jap B. K.** *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.* Nature. 2001 ; 414(6866):872-8.

**Sullivan M. ; Nicholls J.** *The Nutritional Approach to Experimental Dermatology.* J Invest Dermatol. 1940 ; 3(4):309–316.

**Theos A. C. ; Tenza D. ; Martina J. A. ; Hurbain I. ; Peden A. A. ; Sviderskaya E. V. ; Stewart A. ; Robinson M. S. ; Bennett D. C. ; Cutler D. F. ; Bonifacino J. S. ; Marks M. S. ; Raposo G.** *Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes.* Mol Biol Cell. 2005 ; 16(11):5356-72.

**Theos A. C. ; Truschel S. T. ; Tenza D. ; Hurbain I. ; Harper D. C. ; Berson J. F. ; Thomas P. C. ; Raposo G. ; Marks M. S.** *A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis.* Dev Cell. 2006 ; 10(3):343-54.

**Thody A. J. ; Higgins E. M. ; Wakamatsu K. ; Ito S. ; Burchill S. A. ; Marks J. M.** *Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis.* J Invest Dermatol. 1991 ; 97(2):340-4.

**Tobin D. J.** *Biochemistry of human skin - our brain on the outside.* Chem Soc Rev. 2006 ; 35(1):52-67.

**Vacca A. ; Frigeri A. ; Ribatti D. ; Nicchia G. P. ; Nico B. ; Ria R. ; Svelto M. ; Dammacco F.** *Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma.* Br J Haematol. 2001 ; 113(2):415-21.

**Van Den Bossche K. , Naeyaert J.-M. , Lambert J.** *The quest for the mechanism of melanin transfer.* Traffic. 2006 ; 7(7):769-78.

**Verbavatz J.-M. ; Brown D. ; Sabolic I. ; Valenti G. ; Ausiello D. A. ; Van Hoek A. N. ; Ma T. ; Verkman A. S.** *Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes : a freeze-fracture study.* J Cell Biol. 1993 ; 123(3):605-18.

**Verkman A. S.** *More than just water channels : unexpected cellular roles of aquaporins.* J Cell Sci. 2005 ; 118(Pt 15):3225-32.

**Verkman A. S.** *A cautionary note on cosmetics containing ingredients that increase aquaporin-3 expression.* Exp Dermatol. 2008 ; 17(10):871-2.

**Verkman A. S. ; Hara-Chikuma M. ; Papadopoulos M. C.** *Aquaporins - new players in cancer biology.* J Mol Med. 2008 ; 86(5):523-9.

**Visscher M.O. ; Chatterjee R. ; Munson K. A. ; Pickens W. L. ; Hoath S. B.** *Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life.* Pediatr Dermatol. 2000 ; 17(1):45-51.

**Von Heijne G.** *Membrane channels.* Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry, 2003.

**Wang Y. ; Schulten K. ; Tajkhorshid E.** *What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF.* Structure. 2005 ; 13(8):1107-18.

**Warner R. R. ; Boissy Y. L. ; Lilly N. A. ; Spears M. J. ; McKillop K. ; Marshall J. L. ; Stone K. J.** *Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants.* J Invest Dermatol. 1999 ; 113(6):960-6.

**Warner R. R. ; Myers M. C. ; Taylor D. A.** *Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile.* J Invest Dermatol. 1988 ; 90(2):218-24.

**Warner R. R. ; Stone K. J. ; Boissy Y. L.** *Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure.* J Invest Dermatol. 2003 ; 120(2):275-84.

**Watanabe R. ; Wu K. ; Paul P. ; Marks D. L. ; Kobayashi T. ; Pittelkow M. R. ; Pagano R. E.** *Up-regulation of glucosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation.* J Biol Chem. 1998 ; 273(16):9651-5.

**Yamaguchi Y. , Brenner M. , Hearing V. J.** *The regulation of skin pigmentation.* J Biol Chem. 2007 ; 282(38):27557-61.

**Zeidel M. L. ; Ambudkar S. V. ; Smith B. L. ; Agre P.** *Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein.* Biochemistry. 1992 ; 31(33):7436-40.

**Zeidel M. L. ; Nielsen S.; Smith B. L. ; Ambudkar S. V. ; Maunsbach A. B. ; Agre P.** *Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes.* Biochemistry. 1994 ; 33(6):1606-15.

**Zhang R. ; van Hoek A. N. ; Biwersi J. ; Verkman A. S.** *A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k.* Biochemistry. 1993 ; 32(12):2938-41.

**Zheng X. ; Bollinger W. ; Bollag W.** *Aquaporin 3 Colocates with Phospholipase D2 in Caveolin-Rich Membrane Microdomains and Is Downregulated Upon Keratinocyte Differentiation.* J Invest Dermatol. 2003 ; 121(6):1487-95.

**Zhu F. ; Tajkhorshid E. ; Schulten K.** *Molecular dynamics study of aquaporin-1 water channel in a lipid bilayer.* FEBS Lett. 2001 ; 504(3):212-8.

# **VIII. REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier les trois personnes les plus importantes dans  
l'aboutissement de ce projet.

Merci pour votre soutien, votre patience, vos remarques.

Marc Dumas,  
de Dior Recherche, merci pour ton soutien constant et tes remarques qui furent d'une  
grande aide.

Marc le Maire,  
mon directeur de thèse, merci pour ta patience, ton soutien et tes conseils.

Jean-Marc Verbavatz,  
mon directeur d'équipe, merci pour tout.

Je tiens à remercier celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

Dans l'équipe :

Alain Rambourg (honneur au doyen),  
pour ses critiques franches et concises (je cite : "c'est de la m...":)

Isabelle Boisdé et Renée Gobin,  
pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Elympe Vodouhé, Jean Daraspe et Wael Khazen.  
pour leur aide à tout niveau.

Jean-Marc Verbavatz,  
pour m'avoir supporté si longtemps.

Toute l'équipe de Dior Recherche,  
avec une mention spéciale pour Emmanuelle Noblesse et Marc Dumas, merci encore.

L'équipe d'Ahmed Zahraoui (directeur du labo) avec Violaine David, Gwenaëlle Lepavec,  
Nancy Abou Zeid et Manel Boumediene.

Ainsi qu'au CEA Ghada Ajlani, pour ses conseils en biologie moléculaire. Manuel  
Garrigos, le squat de sa salle de culture me fut bien utile. François Leteurtre et Véronique  
Berthonaud, pour les mêmes raisons entre autres. Marc le Maire, une fois de plus merci.

L'ISV et tout particulièrement Béatrice Satiat-Jeunemaitre pour avoir accueilli quelques  
temps le SLF (Sans Labo Fixe) que je suis.

Ghislaine Geelen et l'équipe du laboratoire d'exploration fonctionnelle endocrinienne et  
métabolique à Lyon

Tous les membres de l'école doctorale pour m'avoir permis de continuer, ainsi que  
monsieur le doyen Bobin.

Je tiens enfin à remercier :

Ma femme, pour sa patience et son soutien.

Mes parents, qui m'ont également soutenu tout du long et qui ont relu le manuscrit.

Mon petit frère, qui a également fait des remarques pertinentes.

Et tout ma famille qu'ils aient contribué ou non.

Pour terminer avec ces remerciements, il est probable que j'en ai oublié certaines ou certains, veuillez s'il-vous-plaît me pardonner, je vous remercie de tout cœur.

# **IX. ANNEXES**

*Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter?*

DOI : 10.1016/j.bbamem.2006.06.013

*Skin Aquaporins: Function in Hydration, Wound Healing, and Skin Epidermis Homeostasis*

DOI : 10.1007/978-3-540-79885-9\_10

*Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins.*

[http://jddonline.com/supplement\\_library](http://jddonline.com/supplement_library)

*Familial Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis: Dissociation between Aquaporin-2 and Vasopressin Excretion*

DOI : 10.1210/jc.2009-2524

## RÉSUMÉ

Les aquaporines (AQPs) sont des petites protéines formant des canaux hydriques à travers les membranes cellulaires. Les AQPs 0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8 assurent le transport sélectif de l'eau tandis que les AQPs 3, 7, 9 et 10 permettent également le passage du glycérol. Nous avons étudié leur expression dans l'épiderme, la couche supérieure de notre peau supposée imperméable. Dans les mélanocytes, des cellules dendritiques responsables de la pigmentation, seule l'AQP1 est exprimée. Nous avons montré que les kératinocytes, les cellules majoritaires de l'épiderme, expriment en prolifération les AQPs 3 et 10, alors que les kératinocytes différenciés expriment les AQPs 3 et 9. La localisation de l'AQP3 a été précédemment rapportée à la membrane plasmique des kératinocytes, de la couche basales à la couche épineuse. Nous avons localisé l'AQP9 dans les kératinocytes différenciés de la couche granuleuse au contenu riche en glycérol et réduit en eau. De fait nous pensons que l'AQP9 y sert de transporteur de glycérol. Enfin contrairement à d'autres auteurs, nous n'avons pu mettre en évidence de lien entre prolifération tumorale et expression des aquaporines.

Mots clés : Aquaporine, peau, épiderme, mélanocytes, kératinocytes, transport d'eau, transport de glycérol, hydratation, différenciation induite par le calcium, cancer cutané.

## SUMMARY

Aquaporins (AQPS) are a family of small proteins forming water channels across cell membranes. AQPs 0, 1, 2, 4, 5, 6 and 8 are strictly water channel whereas AQPs 3, 7, 9 and 10 allow transport of water and glycerol. We have studied their expression in the epidermis, the outer-most water-impermeable layer of the skin. In melanocytes, dendritic cells responsible for pigmentation, only AQP1 is expressed, in vitro and ex vivo. We have shown that keratinocytes, principal cells of the epidermis, express AQPs 3 and 10 in proliferation, whereas differentiated keratinocytes express AQPs 3 and 9. The localisation of AQP3 to plasma membrane of keratinocytes was previously reported from the basal layer to the spinous layer of the skin. We localised AQP9 in the fully differentiated keratinocytes of the granular layer, where there is a high glycerol and low water content. So we think that AQP9 likely functions as a glycerol transporter. Unlike other authors, we were unable to identify a link between tumorous proliferation and the expression of aquaporins.

Key words : Aquaporins, skin, epidermis, melanocytes, keratinocytes, water transport, glycerol transport, hydration, differentiation induced by calcium, skin cancer.