



HAL
open science

Aquaporines et membranes foetales chez la parturiente diabétique: Anomalies d'expression et régulation par l'insuline.

Damien Bouvier

► **To cite this version:**

Damien Bouvier. Aquaporines et membranes foetales chez la parturiente diabétique: Anomalies d'expression et régulation par l'insuline.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT: 2015CLF1MM12 . tel-01491080

HAL Id: tel-01491080

<https://theses.hal.science/tel-01491080v1>

Submitted on 16 Mar 2017

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.

Année 2015

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 25 septembre 2015

Damien BOUVIER

**Aquaporines et membranes fœtales chez la parturiente diabétique :
anomalies d'expression et régulation par l'insuline**

Rapporteurs : Pr. Sophie GIL, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes
Pr. Cyril HUISSOUD, Faculté de Médecine, Université Lyon 1

Examineur : Pr. Yves BOIRIE, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne

Membre : Pr. Vincent SAPIN, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne

Abréviations

Akt : kinase B protein
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
ARN : Acide RiboNucléique
ARtt : l'acide rétinoïque tout-trans
ASG : AutoSurveillance Glycémique
AQP(s) : Aquaporine(s)
COX-2 : cyclooxygénase-2
CRH: Corticotropin Releasing Hormon
DG : Diabète Gestationnel
DR : Direct Repeat
DT1 : Diabète de Type 1
DT2 : Diabète de Type 2
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GSK : glycogen synthase kinase
IGF1 : Insulin like Growth Factor 1
IL : Interleukine
IRE(s) : Insulin Response Element(s)
IRS1 : Insulin Receptor Substrate 1
IRS2 : Insulin Receptor Substrate 2
LA : Liquide Amniotique
MEE : Mésoenchyme Extra-Embryonnaire
MIP : Major Intrinsic Protein
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
p70S6K : S6 kinase protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PGDH : prostaglandine déshydrogénase
PI3K : phosphatidyl-inositol-3-kinase
RAR : Retinoic Acid Receptor
RARE(s) : Retinoic Acid Responsive Element(s)
(q)RT-PCR : (quantitative) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR : Retinoid X Receptor
SA : Semaine d'Aménorrhée
SLPI : Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor
TSC2 : tuberous sclerosis complex protein 2
ZAM : Zone à Morphologie Altérée

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------	---

BIBLIOGRAPHIE	4
---------------	---

I. <u>Grossesse chez la femme diabétique</u>	5
1. Définitions.....	5
2. Epidémiologie.....	5
3. Prise en charge.....	6
4. Complications.....	8
II. <u>Physiopathologie du Liquide Amniotique</u>	9
1. Formation et flux.....	9
2. Composition.....	9
3. Rôles.....	10
4. Pathologies.....	10
5. Régulation du volume amniotique.....	12
III. <u>Membranes fœtales</u>	13
1. Embryologie.....	13
2. Structure.....	14
3. Rôle.....	15
IV. <u>Aquaporines</u>	18
1. Présentation.....	18

2. Structure – Fonction.....	19
3. Expression.....	20
<i>a- A l'échelle de la cellule :</i>	20
<i>b- A l'échelle de l'organisme :</i>	20
<i>c- Au sein des membranes fœtales :</i>	28
4. Régulation.....	28
5. Physiopathologie.....	30
V. <u>Objectifs</u>	32

RESULTATS	34
------------------	-----------

PUBLICATION N°1	35
“Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes” (Biololy of Reproduction 2012; 86 (2), 48-51)	

PUBLICATION N°2	46
“All-trans-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment” (Placenta 2015 May 19 [Epub ahead of print])	

PUBLICATION N°3	56
“Aquaporins and fetal membranes from diabetic parturient women: expression abnormalities and regulation by insulin” (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2015; sous presse)	

DISCUSSION	69
-------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
------------------------------------	-----------

INTRODUCTION

Tous les êtres vivants sont constitués majoritairement d'eau. C'est d'ailleurs dans l'eau que la vie est apparue sur Terre il y a 3,5 milliards d'années. Les cellules vivent toujours dans un milieu aqueux et sont le siège d'échanges à travers leurs membranes entre le milieu externe, composé du sang et des liquides interstitiels, et le milieu intracellulaire, composé de diverses substances dissoutes dans l'eau. L'eau leur est essentielle pour plusieurs raisons. Elle est nécessaire à de nombreuses réactions du métabolisme. Elle est aussi nécessaire pour transporter différentes substances en solution entre l'environnement cellulaire et les cellules. Elle est enfin utilisée pour transporter l'excès de chaleur produit par les réactions cellulaires. Pour éviter de manquer d'eau à cause des fluctuations de l'environnement, les animaux et les plantes possèdent des organes et des mécanismes physiologiques spécialement adaptés pour s'en procurer et la conserver. L'eau doit pouvoir pénétrer dans l'organisme, y transiter et finalement en ressortir. Il est connu depuis longtemps que l'eau pouvait diffuser relativement facilement à travers les membranes des cellules, mais ce mécanisme est beaucoup trop lent et insuffisant pour expliquer un passage d'eau compatible avec la vie. Travaillant sur les globules rouges, les chercheurs de l'équipe de Peter Agre à Baltimore butent un jour de 1988 sur une étrange protéine logée dans la membrane cellulaire. Il faudra quelques années d'étude approfondie pour mettre en évidence que cette protéine forme en réalité une sorte de pore permettant à l'eau d'entrer et de sortir rapidement des globules rouges. Le premier canal à eau (ou canal hydrique) est identifié. Cette protéine reçut le nom d'aquaporine, la numéro 1. Depuis, plus de 200 aquaporines seront identifiées chez des mammifères, des invertébrés, des plantes ou des microorganismes. Chez l'homme, 13 aquaporines ont pour l'instant été répertoriées. Peter Agre a été gratifié du prix Nobel de chimie en 2003 pour sa découverte. Chez l'Homme, les aquaporines ont été étudiées au niveau de tous les organes, appareils, et systèmes qu'ils soient impliqués dans le métabolisme hydrique ou qu'ils nécessitent des échanges d'eau. Ces études ont porté autant sur la physiologie que sur la pathologie. Un

exemple caractéristique est l'étude de l'implication des aquaporines dans la physiologie rénale et dans certaines pathologies comme le diabète insipide.

L'objectif de mon travail a été d'étudier le rôle des aquaporines au sein des membranes fœtales dans la physiologie et la pathologie de l'homéostasie du liquide amniotique. Dans une première partie, axée sur la physiologie, il a été défini l'ontogenèse des aquaporines dans les membranes fœtales humaines au cours de la grossesse et déterminé l'implication des rétinoïdes dans la régulation de l'aquaporine 3. Dans une deuxième partie, axée sur la physiopathologie et représentant le sujet principal de cette thèse, il a été précisé le rôle des aquaporines au sein des membranes fœtales chez des parturientes diabétiques. Mes premiers résultats et les données de la littérature m'ont encouragé à étudier le rôle de l'insuline dans la régulation de l'expression des aquaporines. Le polyhydramnios est une pathologie fréquemment associée au diabète. Les mécanismes physiopathologiques de cette complication sont peu connus. Dans ce contexte, ils sont le plus souvent reliés à la polyurie fœtale consécutive à l'hyperglycémie, et le rôle des membranes fœtales, pourtant essentielles dans les mécanismes de régulation du volume de liquide amniotique, n'a été que peu étudié. Les seules études réalisées l'ont été dans un cadre de polyhydramnios idiopathique. Elles ont par ailleurs démontré des niveaux d'expression différents des aquaporines dans les membranes fœtales, entre les grossesses ayant un volume de liquide amniotique normal ou non.

BIBLIOGRAPHIE

I. Grossesse chez la femme diabétique

1. Définitions

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

- le diabète de type I (DT1), qui fait suite à la destruction spécifique des cellules β des îlots pancréatiques de Langerhans, le plus souvent due à une maladie auto-immune, responsable d'une carence absolue de l'insulinosécrétion et d'une insulindépendance stricte (1).
- Le diabète de type II (DT2) dit non insulindépendant est le plus fréquent et touche des sujets plus âgés que le DT1. Il est la conséquence d'une insulino-résistance associée à une insulinosécrétion anormale (2).

Les femmes enceintes sont concernées par deux types de diabète : le diabète gestationnel (DG) qui se déclare pendant la grossesse et le diabète pré-gestationnel (DT1 ou DT2) qui préexiste avant la grossesse (3). Le DG, comme le DT2, est la conséquence d'une insulino-résistance associée à une insulinosécrétion anormale (4).

2. Epidémiologie

Le diabète sucré est une des maladies chroniques les plus répandues à travers le monde. La prévalence mondiale du diabète chez les adultes est estimée à plus de 220 millions en 2011 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et devrait continuer à croître pour atteindre 439 millions d'adultes en 2030, soit 7,7% de la population mondiale (5). Cette évolution est

due essentiellement au DT2 qui augmente en parallèle de ses deux facteurs de risques majeurs : l'obésité et la sédentarité. Il touche des sujets plus âgés que le DT1. En effet, le DT1 avec une prévalence de 0,15% en France (6) survient dans la moitié des cas avant l'âge de 20 ans.

Les femmes enceintes, jeunes, sont essentiellement touchées par le DT1. Néanmoins, pour les raisons déjà évoquées et parce que les grossesses actuelles sont plus tardives dans les pays développés, elles n'échappent pas à l'augmentation du DT2 (7). La prévalence des diabètes pré-gestationnels a ainsi augmenté de 3,1 pour 1000 naissances à la fin des années 90 à actuellement 4,7 pour 1000 naissances (8).

3. Prise en charge

La grossesse chez une femme diabétique est plus à risque, nécessitant une prise en charge médicale précoce et multidisciplinaire, depuis le projet de conception jusqu'à l'accouchement. Le diabétologue doit assurer l'équilibre métabolique de la patiente par le contrôle strict du taux de glycémie. Il évalue le risque médical de la grossesse et définit les modalités du traitement insulinaire. Cette surveillance pré- et péri-conceptionnelle a permis depuis 30 ans d'améliorer le pronostic de ces grossesses en diminuant les risques de mortalité périnatale et de malformations congénitales (9). Cette prise en charge est plus aisée pour le DT1, souvent connu depuis plus longtemps. La jeune diabétique est alors informée depuis quelques années des problèmes liés à la survenue d'une grossesse, et des moyens d'en permettre son déroulement satisfaisant (10).

L'émergence du DT2 pendant la grossesse devient un problème éminent. Il est souvent sous-estimé du fait de son caractère asymptomatique qui en fait toute sa gravité (6). En effet, les symptômes classiques (polyurie et polydipsie) ne surviennent qu'à des niveaux glycémiques

très supérieurs à ceux compatibles avec une grossesse normale. Dans le cas où ce DT2 est antérieurement connu, ou découvert lors du dépistage systématique en début de grossesse, une insulinothérapie doit être instaurée, car en France, les antidiabétiques oraux sont contre-indiqués pendant la grossesse. Ces patientes sont alors considérées comme diabétiques insulino-dépendantes (10).

Le traitement spécifique du DG (diététique, auto surveillance glycémique, insulinothérapie si indiquée) réduit les complications périnatales sévères, la macrosomie fœtale, et la prééclampsie par rapport à l'abstention thérapeutique, sans majoration des risques de césarienne. L'auto-surveillance glycémique (ASG) permet de surveiller les patientes et d'indiquer l'insulinothérapie. Lorsque les femmes sont traitées par insuline, l'ASG est indispensable pour adapter les doses d'insuline. L'ASG est recommandée entre 4 et 6 fois par jour (au moins une fois à jeun et deux heures après les repas selon le traitement (diététique ou insuline) et l'équilibre obtenu (accord professionnel). L'ASG doit être poursuivie jusque dans le post-partum immédiat. Les appareils doivent être étalonnés selon les procédures en vigueur. Dans l'état actuel des connaissances, l'objectif actuellement validé est d'obtenir une glycémie à jeun inférieure à 0,95 g/L. La prise en charge diététique est la pierre angulaire du traitement du DG. L'apport calorique doit être déterminé individuellement selon l'IMC préconceptionnel, la prise de poids gestationnelle, et les habitudes alimentaires. Une activité physique régulière, en l'absence de contre-indication obstétricale, environ 30 minutes trois à cinq fois par semaine est recommandée. L'insuline doit être envisagée si les objectifs glycémiques ne sont pas atteints après 7 à 10 jours de règles hygiéno-diététiques. Le schéma d'insulinothérapie sera adapté en fonction des profils glycémiques (11).

Par ailleurs, les nouveau-nés de mère diabétique sont plus fragiles que les autres et doivent naître dans des maternités de niveau 3 (10).

4. Complications

Pendant la grossesse, les femmes diabétiques cumulent les risques liés à leur grossesse et au diabète (rétinopathie, néphropathie...). La survenue de complications est plus fréquente (toxémie gravidique, fausses couches, troubles hypertensifs...) et leurs fœtus sont plus à risque d'anomalies, comme la dystocie des épaules au moment de l'accouchement, souvent secondaire à une macrosomie (12). Ces anomalies sont principalement le résultat d'une exposition fœtale précoce à l'hyperglycémie maternelle (13). Ces connaissances concernent le pronostic des grossesses chez les femmes ayant un DT1. La faible littérature disponible pour le DT2 semble suggérer peu de différences avec le DT1, et ce pour des conditions de prise en charge similaires, malgré des perturbations glycémiques moindres, un nombre moins élevé de césariennes, et un âge gestationnel à la naissance plus élevé (14). Une autre pathologie peu connue et souvent associée aux grossesses de femmes diabétiques est l'hydramnios ou polyhydramnios, qui correspond à un volume trop important de liquide amniotique.

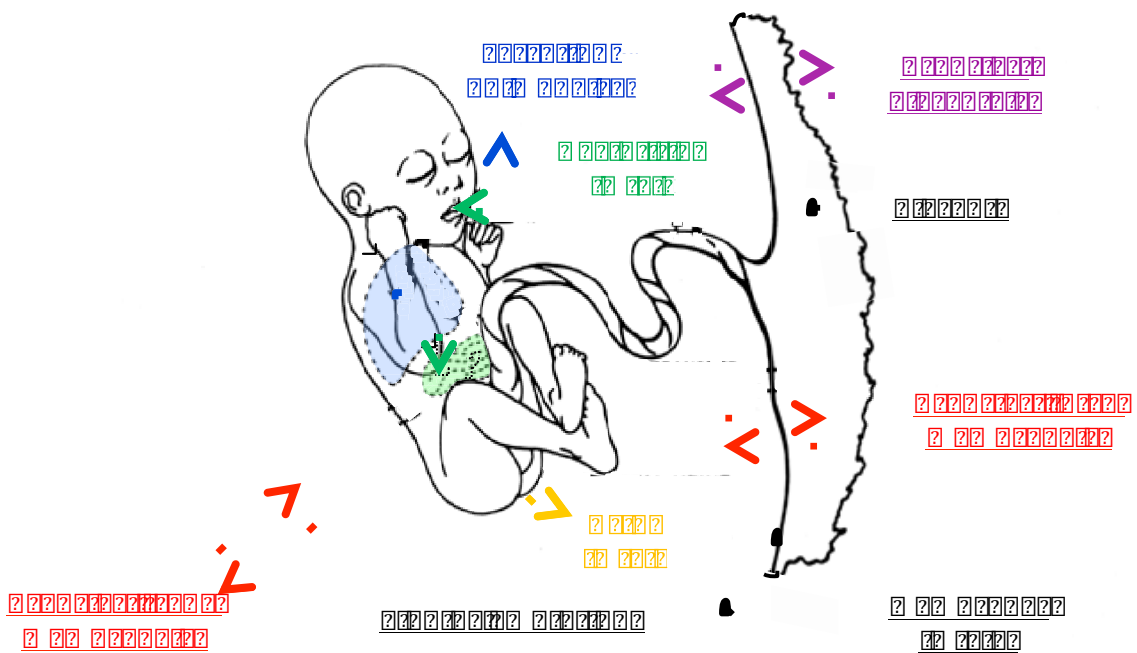


Figure 1 : Formation et régulation de l'homéostasie du liquide amniotique au cours de la grossesse humaine.
D'après Brace *et al.*, 1995

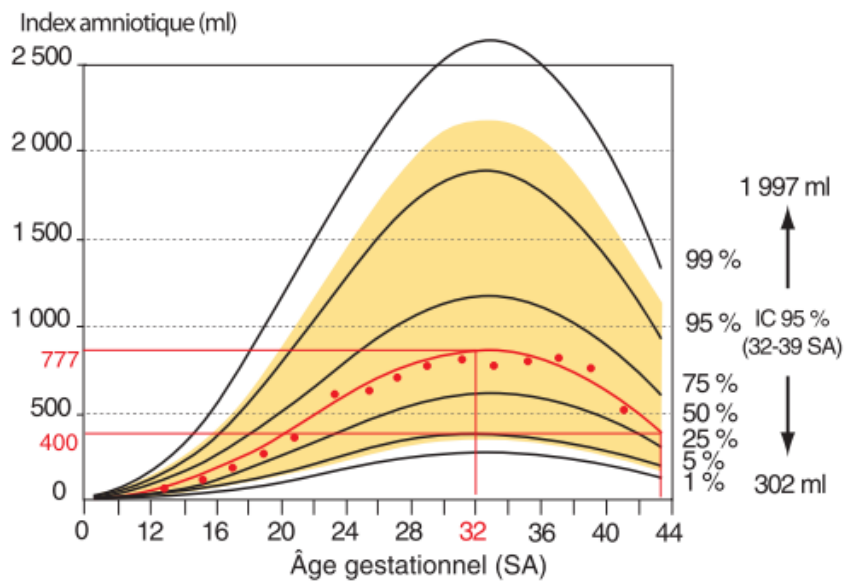


Figure 2 : Volume de liquide amniotique en fonction de l'âge gestationnel.
SA : semaines d'aménorrhée ; IC : intervalle de confiance.
D'après Mahieu-Caputo *et al.*, 2008

II. Physiopathologie du Liquide Amniotique

1. Formation et flux

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

Après la kératinisation de la peau qui débute vers la 20^{ème} SA, plusieurs éléments collaborent à la formation et à l'élimination du liquide amniotique (Figure 1) (15). Ses deux principales sources de production sont la diurèse fœtale et les sécrétions pulmonaires, tandis que ses deux principales voies de réabsorption sont la déglutition fœtale et l'absorption dans le sang fœtal à travers la surface fœtale du placenta. Les membranes chorio-amniotiques jouent le rôle d'une membrane semi-perméable au travers de laquelle se font des transferts d'eau dont les flux sont bidirectionnels. Au cours du 3^{ème} trimestre, compte tenu d'un déficit osmotique constant du liquide amniotique par rapport au plasma maternel, le flux net des échanges à travers les membranes est une sortie du liquide de la cavité amniotique vers la mère de 0,3 à 0,7 mL/h. Le volume du liquide amniotique varie au cours de la grossesse en augmentant progressivement jusqu'à 20 SA puis plus rapidement pour atteindre un pic à 34 SA (1000 mL) et redescendre à 800 mL à terme (15) (Figure 2).

2. Composition

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

concentration des urines du rein fœtal. On retrouve également tous les acides aminés protéinogènes, des enzymes, des lipides pulmonaires, du glucose, des facteurs de croissance, des hormones et des cellules fœtales en suspension (15).

3. Rôles

Le liquide amniotique a un rôle antibactérien avec des propriétés bactériostatiques puis bactéricides. Il présente de plus un rôle mécanique d'une part en permettant les mouvements fœtaux et donc le développement de l'appareil locomoteur du fœtus, et d'autre part un rôle protecteur contre les traumatismes. Il assure également l'homéostasie physique de l'environnement fœtal (température, volume) (15).

4. Pathologies

Il existe des anomalies qualitatives ou quantitatives du liquide amniotique. Les anomalies de volume, qui nous intéressent dans ce travail, sont directement associées à une augmentation de la mortalité périnatale et du taux de morbidité (16). Selon l'anomalie de volume, on distingue soit une quantité trop faible de liquide amniotique, l'oligoamnios ou oligohydramnios, soit un excès de liquide, l'hydramnios ou polyhydramnios.

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

commencement des pertes, durée, importance, et surtout l'âge gestationnel à la délivrance.

ii) l'hydramnios complique 1 à 2% des grossesses. Dans plus de la moitié des cas, l'hydramnios est considéré comme idiopathique en l'absence de cause évidente. On observe soit une augmentation de production (comme dans le diabète), soit une diminution de résorption (comme dans l'atrésie de l'œsophage) (16). Malgré un pronostic favorable dans la majorité des cas, l'hydramnios présente des risques de complications plus élevées : anomalies congénitales, rupture de la poche des eaux et accouchements prématurés, présentation défavorable due à une mobilité fœtale excessive...

Le diabète représenterait 25% des causes de polyhydramnios. Toutefois, la prévalence de l'hydramnios chez les femmes diabétiques est très variable selon les études. Cette complication survient plus fréquemment dans un contexte de mauvais contrôle glycémique et plusieurs mécanismes physiopathologiques sont proposés. Parmi eux, l'hyperglycémie fœtale responsable d'une polyurie par effet osmotique est la plus communément admise. Les enfants diabétiques atteints de macrosomie ont également un débit cardiaque et un volume plasmatique augmentés qui accroît le débit de filtration glomérulaire et donc la production urinaire. Un autre mécanisme envisageable serait une concentration de glucose augmentée dans le liquide amniotique qui entraînerait l'arrivée d'eau par gradient de concentration (16)(17).

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

Une mortalité ou des complications périnatales plus importantes pourraient être attendues en associant les risques des grossesses diabétiques et ceux des grossesses compliquées d'un polyhydramnios. Mais cela n'a pas été montré. Un accouchement plus précoce, le plus

souvent programmé par césarienne, pourrait être une explication. D'autre part, il n'a pas été montré de différences selon les types de diabète et leur durée d'évolution avant la grossesse (17).

5. Régulation du volume amniotique

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

Dans l'adaptation du volume amniotique, les membranes fœtales ont un rôle évident que ce soit en physiologie ou en pathologie.

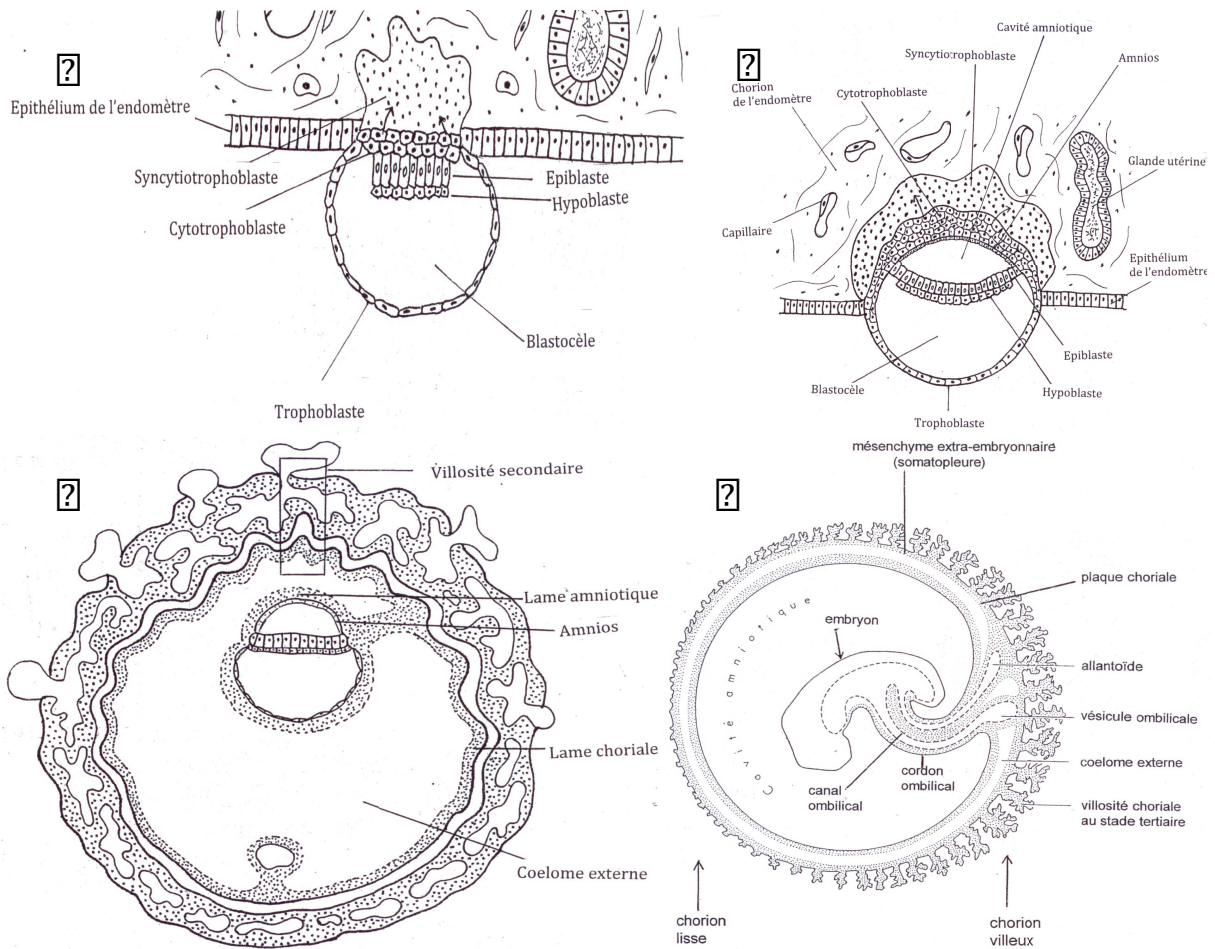


Figure 3 : Embryologie des membranes chorio-amniotiques.

D'après Monnet, 2008, laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand

A : Œuf humain à environ J7 après la fécondation

B : Œuf humain à environ J8 après la fécondation

C : Œuf humain à la fin de la deuxième semaine du développement embryonnaire. Les lames amniotique et choriale sont deux contingents du mésenchyme extra-embryonnaire.

D : Distinction entre les chorions vilieux et lisse.

III. Membranes fœtales

1. Embryologie

Chez l'humain, la genèse des membranes débute au cours de la 2^{ème} semaine du développement embryonnaire lors de la nidation où 4 évènements se déroulent en parallèle (18). Au point d'apposition de l'œuf sur l'endomètre, le trophoblaste prolifère et se différencie en cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste (Figure 3A) qui vont entourer tout l'œuf au cours de l'invasion du chorion de l'endomètre. Deuxièmement, vers J10, l'épiblaste donne, les amnioblastes qui vont tapisser la cavité amniotique (Figure 3B), et une masse tissulaire, le mésenchyme extra-embryonnaire (MEE) qui tapisse la face interne du cytotrophoblaste et qui va se creuser de cavités formant le cœlome externe. Le mésenchyme entre le cœlome et le cytotrophoblaste représente la lame chorale, celui entre le cœlome et la cavité amniotique représente la lame amniotique (Figure 3C). Troisièmement, les cellules du chorion de l'endomètre réalisent une réaction déciduale et le chorion définit trois zones : les caduques basilaire (entre l'œuf et le myomètre), ovulaire (entre l'œuf et la cavité utérine) et pariétale (tout le reste). Enfin, en milieu de 2^{ème} semaine apparaissent les villosités primaires (bourgeons de syncytiotrophoblaste avec un axe de cytotrophoblaste) puis secondaires en fin de 2^{ème} semaine (axe envahi par le MEE de la lame chorale) (Figure 3C) puis tertiaires en début de 3^{ème} semaine (formation d'îlots vasculo-sanguins dans le MEE).

Entre la 4^{ème} semaine et le 4^{ème} mois, les villosités prolifèrent au niveau du pôle embryonnaire, donnant le chorion villositéux (relié au fœtus par le cordon ombilical) qui va avec la caduque basilaire former le placenta. Les villosités dégénèrent au niveau du pôle ante-embryonnaire, donnant le chorion lisse qui va fusionner avec la lame amniotique (oblitérant le cœlome externe) pour donner la membrane chorio-amniotique (Figure 3D).

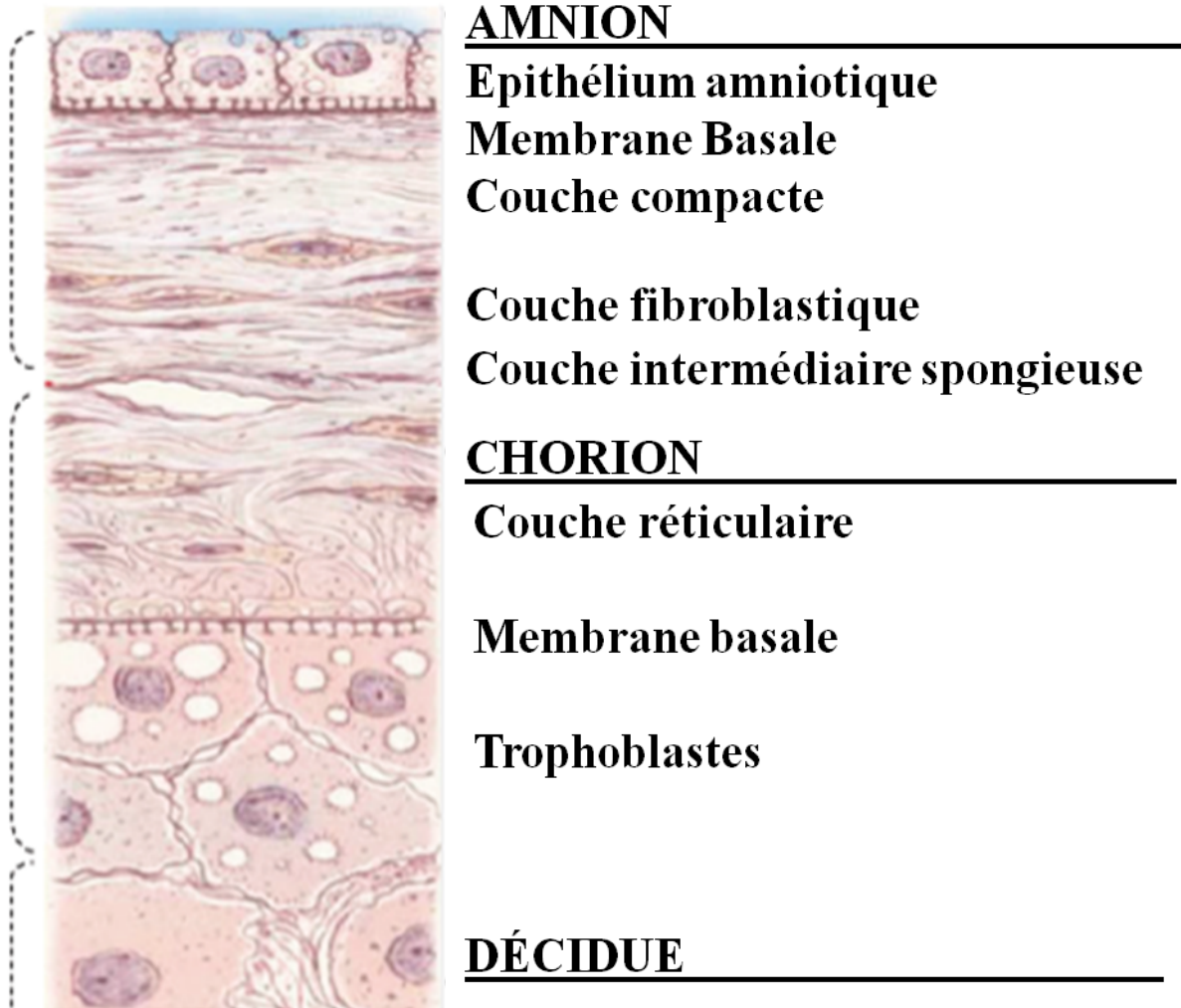


Figure 4 : Structure des membranes fœtales.
 D'après Goldenberg *et al.*, 2000

2. Structure

L'amnion est la couche la plus interne et proche du fœtus et le chorion est accolé à la décidue maternelle (19)(Figure 4).

L'amnion est en contact direct avec le liquide amniotique. Il est non vascularisé (les nutriments essentiels à son développement étant apportés par le liquide amniotique) et non innervé, d'épaisseur allant de 0,08 à 0,12 mm. Il présente 5 couches qui sont de la cavité amniotique vers le chorion :

- l'épithélium amniotique avec une monocouche de cellules cuboïdes,
- la membrane basale formée de collagènes de types III et IV et de glycoprotéines non collagéniques telles que la laminine et la fibronectine, sécrétées par les cellules épithéliales amniotiques
- la couche compacte composée de tissu conjonctif, et qui représente probablement la structure la plus résistante de l'amnion,
- la couche fibroblastique constituée de cellules mésenchymales et de macrophages enchâssés dans une matrice extracellulaire, et qui représente la couche la plus épaisse de l'amnion,
- la couche intermédiaire spongieuse connectant l'amnion au chorion (20). La présence d'un maillage de fibres collagènes (principalement de type III) ainsi que l'abondance de glycoprotéines et de protéoglycanes hydratés lui confère une apparence histologique spongieuse. Cette structure absorbe ainsi les déformations (mouvements du fœtus) et les chocs physiques, et constitue une zone de glissement entre l'amnion et le chorion.

Le chorion, 4 fois plus épais que l'amnion mais moins résistant aux forces de tension, vascularisé, est composé de 3 couches :

- la couche réticulaire avec un réseau de fibres (collagènes, protéoglycanes) et des cellules fusiformes et stellaires,
- la membrane basale chorale, riche en collagène de type IV, en laminine et fibronectine, constitue le support de la couche trophoblastique et adhère fermement à la couche réticulaire,
- la couche trophoblastique constituée de 2 à 10 couches de cellules trophoblastiques superficielles. Elle est en contact avec la décidue maternelle.

3. Rôle

Les membranes fœtales sont des structures complexes essentielles au développement normal du fœtus. Elles délimitent la cavité amniotique contenant le liquide amniotique dans lequel se déroule la croissance de ce dernier. Elles présentent donc un rôle essentiel de protection du fœtus face aux multiples agressions extérieures. Les membranes chorio-amniotiques permettent l'adaptation au volume et aux tensions croissantes, notamment grâce aux différents collagènes qui leur confèrent résistance et élasticité (21).

De plus, les membranes fœtales ont un rôle dans les défenses immunitaires (21). En effet, elles agissent comme une barrière, notamment face aux infections grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (22)(23). Il a été décrit que les cellules amniotiques ont la capacité à réduire de manière significative l'expression des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 α et IL-1 β (24). Les cellules épithéliales amniotiques ont également été décrites comme exprimant des peptides antimicrobiens tels que les β -défensines (la β 3-défensine majoritairement dans l'épithélium amniotique), la SLPI (Secretory Leukocyte

Proteinase Inhibitor) et l'élafine, agissant tous comme des composants du système immunitaire inné, protégeant des infections (25)(26).

En outre, les membranes fœtales jouent un rôle majeur dans l'initiation de la parturition. Il s'agit d'un phénomène complexe faisant intervenir des signaux provenant de tous les acteurs de la grossesse : le placenta, le liquide amniotique, l'endomètre utérin et bien sûr les membranes fœtales (27). A la fin de la gestation, le liquide amniotique s'enrichit en protéines du surfactant pulmonaire, en phospholipides et en cytokines inflammatoires qui, au contact de l'amnion, vont augmenter l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et induire une hausse de la production de prostaglandine E2 dans ce tissu. En parallèle, les niveaux en cortisol et en CRH (Corticotropin Releasing Hormon) augmentent dans le liquide amniotique et stimulent ainsi la production de COX-2 et de prostaglandine E2 dans l'amnion (28)(29). Tout au long de la grossesse, le chorion produit la prostaglandine déshydrogénase (PGDH) dont l'action est d'inactiver les prostaglandines, empêchant de ce fait les contractions utérines en dehors de l'accouchement. A la fin de la grossesse, l'activité de cette PGDH diminue nettement, exposant alors la décidue, le cervix et le myomètre à l'action pro-inflammatoire de la prostaglandine E2 (30). Cette dernière médie la libération des métalloprotéases qui fragilisent les membranes fœtales et facilitent leur rupture. De même, la CRH produite par le placenta et circulante dans le liquide amniotique favorise la sécrétion de la métalloprotéase de la matrice 9 (MMP9) dans les membranes fœtales, facilitant leur rupture (31). Enfin, les membranes fœtales expriment également le récepteur de la relaxine, hormone sécrétée par le placenta et la décidue maternelle, capable de réguler l'expression de métalloprotéases de la matrice (32)(33)(34). Tous ces événements sont probablement à l'origine d'une zone de fragilité des membranes fœtales au niveau du cervix, qui sera à l'origine de la rupture des membranes au moment de la parturition. Elle prend alors le nom de zone à morphologie altérée (ZAM) (35).

Enfin, les membranes fœtales interviennent dans l'homéostasie du liquide amniotique. A l'échelle cellulaire et moléculaire, l'eau passe à travers les membranes via différents systèmes de transport perméatif passif comme la simple diffusion, la diffusion accélérée mais aussi la diffusion facilitée grâce à des protéines membranaires transporteuses d'eau comme les aquaporines (36)(37)(38).

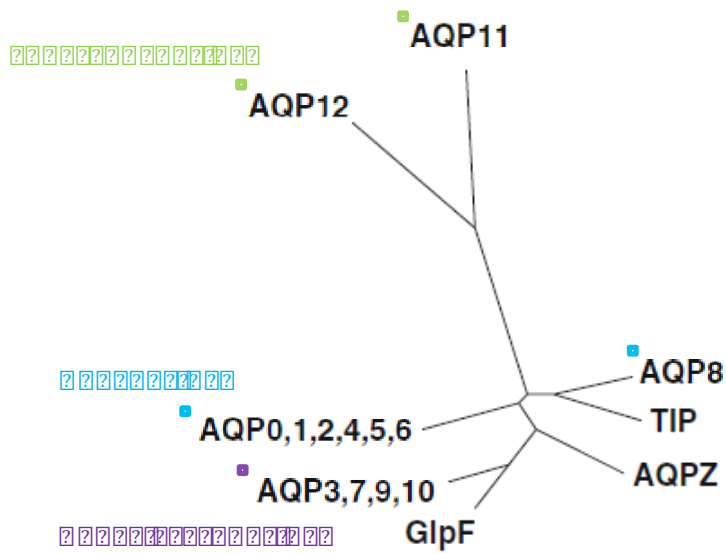


Figure 5 : Arbre phylogénétique des aquaporines construit selon la méthode de neighbor-joining.
 AQPZ et GlpF sont des AQPs issuent d'*Escherichia coli*. TIP est un tonoplaste, AQP issue d'*Arabidopsis thaliana*. AQP0 à 12 sont les AQPs humaines.
 D'après Ishibashi *et al.*, 2009

IV. Aquaporines

1. Présentation

Il s'agit de petites protéines membranaires (24-30 kDa) dont le nom vient de leur capacité à augmenter la perméabilité des bicouches lipidiques membranaires à l'eau (39). Elles existent chez toutes les espèces (40). Chez l'humain, leurs gènes comptent 4 à 8 introns, ont une taille de 3,6 à 47 kb, et se répartissent sur les chromosomes 1, 7, 9, 10, 12, 15 et 16 (41). A l'heure actuelle, les AQPs forment une famille constituée de 13 membres (AQP0 à 12) séparées en 3 groupes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (42)(Figure 5) :

- Les « aquaporines classiques », comprenant les AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8, qui sont uniquement perméables à l'eau. Les AQPs 6 et 8 sont classées dans ce groupe de par leur forte homologie de séquence bien que l'AQP 6 soit perméable aux nitrates et l'AQP8 à l'ammoniaque et à l'urée.
- Les « aquaglycéroporines », comprenant les AQPs 3, 7, 9, et 10, qui sont perméables à l'eau, à l'urée, et au glycérol.
- Les « super-aquaporines », un sous-groupe récemment proposé pour 2 aquaporines : AQP11 et 12, qui sont localisées dans le cytoplasme et dont les perméabilités ne sont pas complètement déterminées (43).

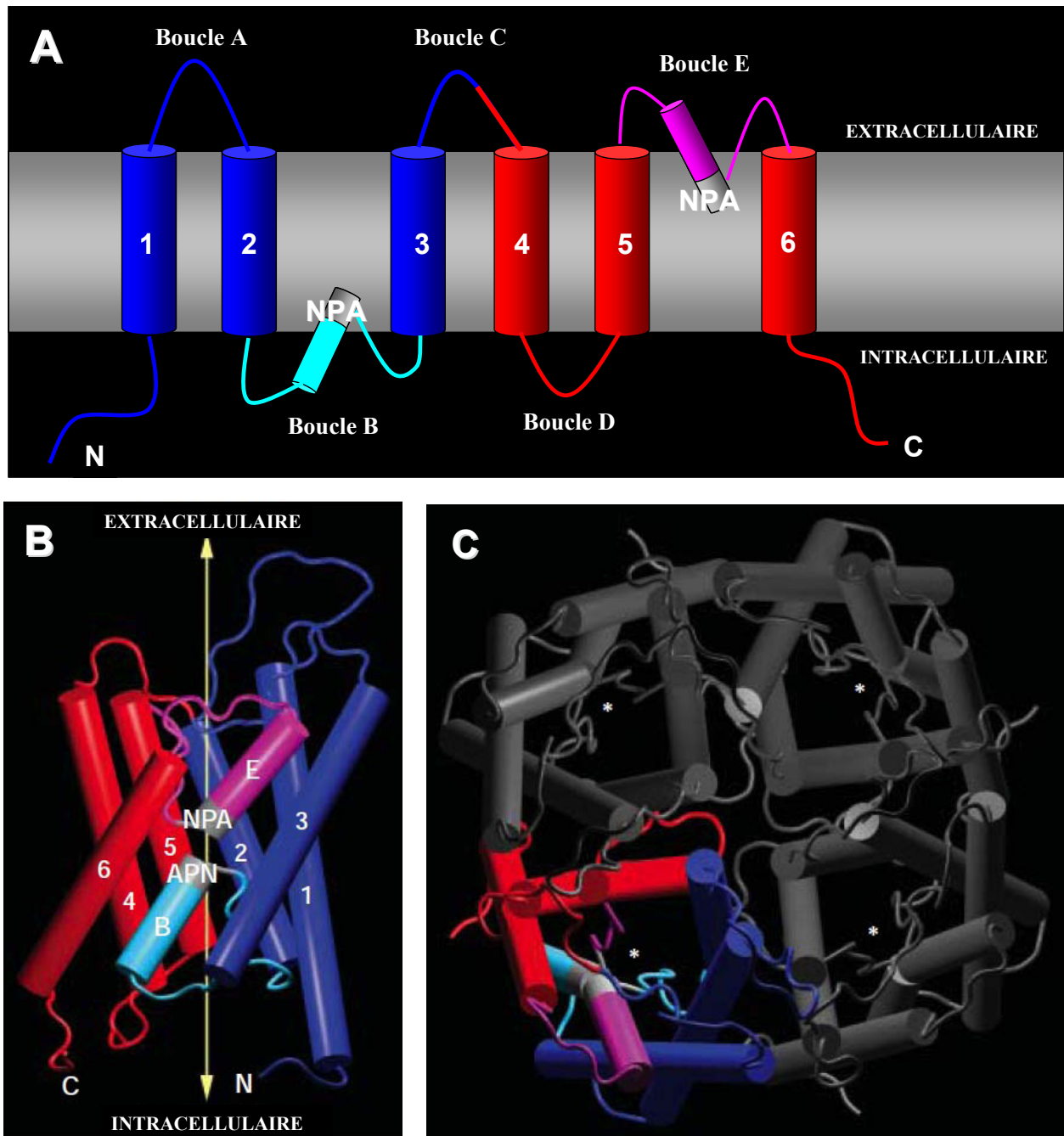


Figure 6 : Structure des aquaporines. Structure primaire d'un monomère avec 6 domaines transmembranaires, 5 boucles, et 2 motifs NPA (A) qui se replient pour former le pore aqueux (B). Disposition en tétramère ; l'astérisque précise le pore aqueux de chaque monomère (C). D'après King *et al.*, 2004

2. Structure – Fonction

Des analyses de modélisation bio-informatique ont révélé que l'AQP1 existe sous forme de monomère mais n'est fonctionnelle dans la membrane cellulaire que sous forme de tétramère (comme les autres AQPs) (Figure 6) (44). Chaque monomère est constitué de 6 hélices transmembranaires (1-6) reliées par 5 boucles (A-E) (40). Les boucles A, C et E sont extracellulaires et les boucles B et D sont intracellulaires. Le motif NPA (Asn-Pro-Ala) constitue le cœur des AQPs. Il en existe 2 par monomère : le premier se situe sur la boucle B dans la partie amino-terminale et le second sur la boucle E dans la partie carboxy-terminale. La première et la deuxième moitié de la molécule présentent de fortes homologies internes et sont orientées en sens opposé dans la bicouche lipidique. Par repliement, les extrémités NH₂ et COOH se rapprochent, de même que les motifs NPA des boucles B (intracellulaire) et E (extracellulaire). Ces 2 boucles forment un 7^{ème} domaine transmembranaire dans lesquels les 2 motifs NPA se font face, créant ainsi un passage pour l'eau à travers le pore protéique (Figure 6A et B) (40). Cette structure en « sablier » ainsi que l'organisation en tétramère ont été confirmées par des cartes tridimensionnelles utilisant la cryo-microscopie électronique (Figure 6C).

Contrairement aux canaux ioniques, chaque monomère d'AQPs est un pore laissant passer de l'eau (45).

Sur un plan fonctionnel, la voie traversant le monomère est formée d'un alignement de résidus hydrophobes conservés permettant le passage de l'eau sous forme d'une file de molécules liées par des liaisons hydrogènes. La présence dans le pore de deux sites de restriction (un formé par l'Arg195 et l'autre par les 2 motifs NPA) prévient le passage des protons. La perméabilité au glycérol, retrouvée pour les aquaglycéroporines, dépend de la présence d'acides aminés aromatiques (40).

3. Expression

a- A l'échelle de la cellule :

La plupart des AQPs sont localisées au sein de la membrane plasmique (AQPs 0, 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10) alors que d'autres se retrouvent exclusivement dans les membranes intracellulaires (AQPs 6, 11, 12) (41). Les AQPs 2 et 5, intracellulaires à l'état basal, s'intègrent à la membrane cellulaire à partir du moment où elles sont activées par un stimulus.

b- A l'échelle de l'organisme :

- Présentation

L'expression des AQPs est variée. Certaines sont ubiquitaires comme l'AQP1 et d'autres sont retrouvées préférentiellement sur des organes précis, selon, semble-t-il, les fonctions physiologiques qui leur incombent. Ainsi, sur certains organes comme le poumon et le rein, le rôle fondamental des AQPs dans les mouvements d'eau a été démontré. On retrouve par exemple les AQPs 1 et 2, respectivement au niveau du tube proximal et du tube collecteur du rein, qui assurent la réabsorption d'eau et la concentration des urines (44). Les aquaglycéroporines (AQPs 3, 7, et 9) vont jouer quant à elles un rôle majeur dans les échanges de glycérol. On les retrouve à des endroits stratégiques pour ce métabolite : dans les adipocytes pour la lipogenèse et la lipolyse et donc le contrôle du stockage des graisses, dans les hépatocytes pour la néoglucogenèse, et au niveau intestinal pour son absorption via l'AQP3 (46)(47).

- AQP0

Mise en évidence sous le nom de MIP26 (Major Intrinsic Protein of 26 kDa) dans l'œil de bœuf (48), l'AQP0 a été décrite comme membre de la famille des aquaporines suite à la

découverte en 1991 de l'AQP1 (49)(50). A ce jour, les études réalisées sur l'AQP0 ont permis de mettre en évidence son expression uniquement dans l'œil, au sein de deux structures : le cristallin et la rétine. Constituant environ 60% des protéines membranaires du cristallin, l'AQP0 a été décrite comme impliquée dans le maintien de la transparence de cette structure. En effet, les individus présentant des mutations dans le gène de l'AQP0 ainsi que les souris mutées/invalidées pour ce même gène développent des cataractes précoces (51)(52)(53)(54). En outre, une analyse en microarray révéla l'expression de l'AQP0 dans la rétine de souris (55). Cette protéine pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité des neurones rétinien de deuxième ordre chez le rat (56).

○ AQP1

L'AQP1 est une protéine quasi-ubiquitaire (41). Toutefois, malgré un profil d'expression très étendu dans l'organisme, sa fonctionnalité n'est décrite que dans quelques organes. Ainsi, des souris invalidées pour ce gène ont permis de mettre en évidence son importance dans le rein (défaut de réabsorption de l'eau lors du phénomène de concentration urinaire) (57), dans les neurones sensoriels spinaux (défauts sensoriels) (58), dans les canaux intestinaux lymphatiques (malabsorption des graisses) (59), dans les yeux (diminution de la pression intraoculaire) (60), dans le plexus choroïde (défaut de sécrétion du liquide céphalorachidien) (61), ainsi que, pendant la grossesse, dans les membranes fœtales (polyhydramnios) (62). Outre les échanges aqueux, l'AQP1 a été décrite comme canal gazeux (63). Dans la membrane plasmique, l'AQP1 existe sous la forme d'homotétramères dont chaque sous-unité contient un pore aqueux individuel. Au centre de ces quatre monomères un cinquième pore principalement composé d'acides aminés hydrophobes laisserait traverser les molécules non polaires telles que le dioxygène et le dioxyde de carbone (64). La diffusion du monoxyde d'azote a également été démontrée comme facilitée par l'AQP1 dans les cellules vasculaires

et endothéliales du muscle (65). Enfin, l'invalidation du gène de l'AQP1 entraîne un défaut d'angiogenèse tumorale ainsi qu'une diminution de la migration des cellules endothéliales, suggérant l'implication de l'AQP1 dans ces deux phénomènes (66).

○ AQP2

L'AQP2 est une protéine dont l'expression, la fonctionnalité et la régulation ont largement été décrites dans le rein. Dans cet organe, la perméabilité à l'eau des membranes cellulaires est essentiellement assurée par l'AQP2. Celle-ci a, en effet, été démontrée comme régulée, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau de sa translocation à la membrane plasmique, par la vasopressine (67). L'importance de cette protéine est mise en exergue dans les souris AQP2^{-/-}, puisque ces animaux développent un diabète insipide léthal à deux semaines post-natal (67). Par ailleurs, l'expression de l'AQP2 a également été décrite dans le sac endolymphatique de l'oreille chez l'humain (68) ainsi que dans le rete testis, le canal efférent et l'épididyme chez le chien (69).

○ AQP3

L'AQP3, mise en évidence chez l'Homme en 1995, est distribuée dans de nombreux organes (70). Des études ont ainsi mis en évidence son expression dans le rein, les voies respiratoires, la peau, le cerveau, les ovaires, le cœur, le foie, la rate, le tractus gastro-intestinal, les érythrocytes et les yeux (41)(71)(72)(73). Au cours de la grossesse, l'AQP3 est également exprimée dans les annexes extra-embryonnaires (74). Il semblerait que, bien que les souris invalidées pour le gène codant l'AQP3 présentent des défauts de concentration urinaire et d'hydratation de la peau. Néanmoins, les individus présentant ces mêmes mutations aient un phénotype normal. De plus, les souris invalidées pour l'AQP3 semblent protégées contre les

tumeurs de la peau ; l'absence de cette protéine limitant également la prolifération et la migration cellulaire (75)(76).

- AQP4

Classiquement, l'AQP4 est l'aquaporine principale du cerveau. Exprimée dans le parenchyme cérébral, les cellules épendymaires, les astrocytes, ainsi que les noyaux paraventriculaires, l'AQP4 semble impliquée dans l'homéostasie du milieu extracellulaire en facilitant les mouvements d'eau entre les différents compartiments cellulaire lors d'une activité neuronale (77). Elle pourrait également faciliter la diffusion de l'eau des vaisseaux vers les neurones osmosensibles et contribuer à la détection des variations de pression osmotique plasmatique. De plus, l'AQP4 semble impliquée positivement dans la prévention de l'œdème du cerveau. En effet, les souris AQP4^{-/-} développeraient moins d'œdèmes, limitant également les dommages atteignant le cerveau (78). Au-delà du cerveau, l'AQP4 est aussi exprimée dans les cellules pariétales gastriques, dans les cellules musculaires, dans les cellules du canal collecteur rénal ainsi que dans l'œil et dans la trachée. Les souris invalidées pour le gène de l'AQP4 présentent des problèmes de vue, d'audition et d'olfaction ainsi qu'un défaut de concentration urinaire (41). Enfin, il semblerait que des auto-anticorps dirigés contre l'AQP4 soient impliqués dans une pathologie auto-immune, la neuromyéélite optique, notamment en médiant l'infiltration inflammatoire périvasculaire et en induisant une démyélination des astrocytes (79).

- AQP5

Initialement isolée dans la glande sous-mandibulaire de rat, l'AQP5 a également été détectée dans les glandes parotides, sous-mandibulaires et sublingual de rats et de souris (80)(81). Au-delà des glandes salivaires, l'expression de l'AQP5 a été mise en évidence dans les glandes

lacrymales et dans les tissus respiratoires, lieux de production de salive, de larmes et de sécrétions pulmonaires (80). Des études ont d'ailleurs permis de faire un lien entre la distribution de l'AQP5 et le syndrome de Sjögren dans la glande salivaire sous-mandibulaire. Ainsi, une distribution altérée de l'AQP5 serait concomitante à la présence d'infiltrats inflammatoires et à la destruction d'acini dans cette glande (82). De plus, des études sur le poumon ont montré que l'AQP5 est exprimée dans les pneumocytes de type I, créant un passage majoritaire pour l'eau au travers de l'épithélium alvéolaire (83). L'expression de cette protéine a également été observée dans les glandes de Brunner présentes au niveau du duodénum (84), dans l'œil au niveau de la cornée et du cristallin (85) ainsi que dans le tube collecteur du rein (86). Enfin, plusieurs études ont mis en exergue l'implication de l'AQP5 dans l'évolution tumorale. Il a ainsi été montré que la surexpression de cette protéine augmente la capacité des cellules cancéreuses à migrer et à proliférer, notamment dans les cas de, cancer du poumon (87)(88), cancer du sein (89), leucémie myéloïde chronique (90) et carcinome colorectal (91).

○ AQP6

D'abord isolée dans le rein de rat (92), puis dans le rein humain (93), l'AQP6 est une aquaporine particulière puisqu'elle permet le passage de l'eau mais également des nitrates (94). Son expression dans le rein se limite au canal collecteur, sous la forme de vésicules intracellulaires. L'expression de cette aquaporine a, en outre, été décrite dans d'autres organes tels que : le cerveau (au niveau du cerebellum et des vésicules synaptiques) (95), la rétine (96), le tractus gastro-intestinal (97), les acini de la glande parotide (98) et l'oreille interne (99).

○ AQP7

Clonée pour la première fois en 1997, l'AQP7 a été isolée, indépendamment, à partir de testicule de rat et de tissu adipeux humain (100)(101). Ainsi, l'expression de l'AQP7 a été décrite dans le flagelle des spermatides et des spermatozoïdes dans le testicule, et sur toute la longueur du spermatozoïde éjaculé (102)(103). Toutefois, le rôle de cette aquaporine reste inconnu puisque les souris AQP7^{-/-} sont fertiles et ont un sperme normal et fonctionnel (104). Il pourrait cependant exister un phénomène compensatoire : il a été observé que les souris invalidées pour le gène de l'AQP7 présentent une surexpression de l'AQP8 dans les spermatides (105). En outre, trois pseudogènes ont été décrits dans le génome humain (106), pouvant très hypothétiquement participer à ce phénomène de compensation. D'autre part, les souris AQP7^{-/-} développent plus d'adipocytes et de tissus graisseux, notamment au niveau intra-abdominal, que les souris sauvages. Ce phénomène pourrait être dû à une accumulation de glycérol dans ces cellules, favorisant l'accumulation de graisses et la synthèse d'acides gras (107)(108). De plus, l'AQP7 a été décrite comme exprimée dans les membranes des cellules du tubule proximal du rein (67). Ainsi, les souris invalidées pour le gène de l'AQP7 ont une perte de glycérol dans les urines. Toutefois, ceci ne semble pas avoir d'impact négatif sur le métabolisme du glycérol et du glucose (109).

○ AQP8

L'AQP8 a été mise en évidence la première fois par deux groupes, de manière indépendante. D'une part elle fut isolée dans le testicule de rat (110), et d'autre part, elle fut clonée à partir de foie et de pancréas de rat (111). Dans le testicule, cette protéine est exprimée à tous les stades de la spermatogénèse, du spermatocyte au spermatide dans le canal séminifère (110). Dans le pancréas, l'AQP8 est exprimée au niveau des lobules glandulaires, et dans le foie, elle est exprimée au niveau des cellules parenchymales (111). De plus, en 2005, une étude a mis

en évidence l'expression et la fonctionnalité de l'AQP8 dans les mitochondries des hépatocytes (112). Toutefois, un an plus tard, une seconde étude a démontré qu'il n'y avait aucune activité de passage d'eau dans ces structures (113). Enfin, en 2010, il a été démontré que cette aquaporine permet le transport de l'ammoniaque au travers des membranes mitochondriales (114). Par ailleurs, la présence de l'AQP8 a également été révélée dans les glandes salivaires, les cellules épithéliales coliques, les mitochondries des cellules du tubule proximal du rein, le cerveau, les membranes amniotiques et les lignées cellulaires dérivant de l'épithélium amniotique (cellules WISH) (111)(115)(116)(117)(118).

○ AQP9

Dans un premier temps, l'AQP9 a été clonée à partir de leucocytes humains. Elle fut également identifiée dans le foie, le poumon et la rate (119). Dans un second temps, l'AQP9 fut isolée à partir du foie de rat et fut alors identifiée comme un transporteur d'urée. Cette protéine a également été mise en exergue dans l'épididyme et la peau. La fonctionnalité de cette protéine a été étudiée chez des souris AQP9^{-/-}. On constate, chez ces animaux, une augmentation de la concentration en glycérol et en triglycérides plasmatiques en comparaison à celles observées chez les souris sauvages. Il existe donc un défaut du métabolisme du glycérol en l'absence d'AQP9. Ceci pourrait en partie être causé par l'absence de l'AQP9 hépatique ne permettant plus le passage du glycérol au travers de la membrane plasmique des hépatocytes (120). De plus, la réponse à une drogue anti-cancéreuse, l'arsenic trioxyde, efficace dans le traitement de la leucémie promyélocitaire aigüe semble corrélée aux niveaux d'expression de l'AQP9 (121). Enfin, l'AQP9 a également été décrite comme exprimée, au cours de la grossesse, dans les membranes fœtales (122).

○ AQP10

Le premier article décrivant l'isolation de l'AQP10 dans le jéjunum et le duodénum humain décrivait cette protéine comme faiblement perméable à l'eau et imperméable à l'urée et au glycérol (123). Ceci était probablement dû au fait que la séquence clonée correspondait en fait à un variant d'épissage ne possédant pas le sixième domaine transmembranaire. Le transcrit complet fut isolé un an plus tard, et la protéine fut décrite comme une aquaglycéroporine, perméable au glycérol et à l'urée (124). Il s'est avéré que, chez la souris, le gène codant l'AQP10 est en réalité un pseudogène. On observe d'ailleurs une différence du profil d'expression de cette aquaporine en inter-espèce (125). Ainsi, tandis que l'expression de l'AQP10 dans le duodénum et le jéjunum est élevée chez l'Homme, elle est absente chez la souris. De plus, une étude a montré que l'AQP10 est également exprimée dans un muscle orofacial (le muscle masséter), les gencives, et, au cours du développement, dans les dents fœtales (126).

○ AQP11

Lors de sa découverte, l'AQP11 fut initialement nommée AQPX1 du fait de son éloignement structural des autres aquaporines mammifères (41). Des études ont mis en évidence l'expression de l'AQP11 dans le testicule, le thymus, le rein, l'intestin, le foie et les neurones. La localisation intracellulaire de cette aquaporine a été révélée en observant son expression dans le rein, au niveau du réticulum endoplasmique des cellules du tubule proximal (127). Cette localisation fut confirmée dans les neurones (128). Par ailleurs, l'AQP11 semble jouer un rôle essentiel dans le rein. En effet, les souris invalidées pour le gène codant l'AQP11 développent de nombreux kystes rénaux et meurent prématurément, avant le sevrage (127).

	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9	AQP10	AQP11	AQP12
Caractéristiques (AQPs humaines)													
Transport d'eau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Transport de glycérol	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	ND
Inhibition par le mercure	+	+	+	+	-	+	induction	-	+	+	+	ND	ND
Gènes (AQPs humaines)													
Nombre d'exons	4	4	4	6	4	4	4	6	6	6	6	3	3
Locus sur le chromosome	12q13	7p14	12q13	9p13	18q22	12q13	12q13	9p13	16p12	15q22	1q21	11q13	2q37
Distribution (AQPs diverses espèces mammifères)													
Dans la cellule	MP	MP	vésicules	MP	MP	vésicules	MIC	MP	MP	MP	MP	MIC	MIC
Dans l'organisme	Œil	Ubiquitaire	Rein, oreille interne, testicules	Ubiquitaire	Cerveau, œil, glandes salivaires, trachée, cœur, intestin, rein, muscles	Œil, glandes salivaires, trachée, poumon, intestin, rein, ovaires	Cerveau, œil, rein, intestin, oreille interne, parotide	Trachée, poumon, intestin, testicules, ovaires, rein, tissu adipeux	Glandes salivaires, trachée, foie, pancréas, intestin, testicules, ovaires	Foie, rate, poumon, testicules, ovaires, leucocyte, peau	Intestins, masséter, gencives	Ubiquitaire	Pancréas
Au niveau des membranes fœtales	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	ND	ND

Tableau 1 : Caractéristiques des aquaporines humaines et distribution des aquaporines chez les mammifères. Pour la distribution, des résultats issus d'études réalisées chez plusieurs espèces (humains, souris, rats, chiens) sont combinés.

AQP(s) : Aquaporine(s), MP : Membrane Plasmique, MIC : Membranes Intra Cellulaires, ND : Non documenté

- AQP12

De même que pour l'AQP11, l'AQP12 fut initialement nommée AQPX2 du fait du peu d'homologie de séquence avec les autres aquaporines (41). L'expression de l'AQP12 a été décrite dans le pancréas, et plus particulièrement dans les cellules des acini (129). La localisation intracellulaire de cette protéine fut mise en évidence lors d'expériences de fonctionnalité dans des oocytes de Xénope : l'AQP12 était absente de la membrane plasmique. Il en est de même dans des cellules en culture, après transfection l'AQP12 est exprimée en intracellulaire (129).

c- Au sein des membranes fœtales :

Les AQPs 1, 3 , 8 (118), 9 (122) s'expriment au niveau de l'amnion et du chorion (détection d'ARN et de protéines) et jouent un rôle dans la régulation aqueuse intra-membranaire du liquide amniotique. Une ontogenèse au cours de la grossesse n'avait jamais été réalisée.

Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques ainsi que la distribution des AQPs.

4. Régulation

Les mécanismes de régulation des différentes AQPs sont complexes et restent peu connus. Toutefois, les études actuelles de manipulations génétiques sur les rongeurs et d'identification chez l'homme nous donnent quelques éléments de réponse.

Au niveau rénal, la translocation de l'AQP2 vers la membrane apicale des cellules du tube collecteur du rein est induite par la vasopressine (130) et est potentialisée par l'insuline. Cette

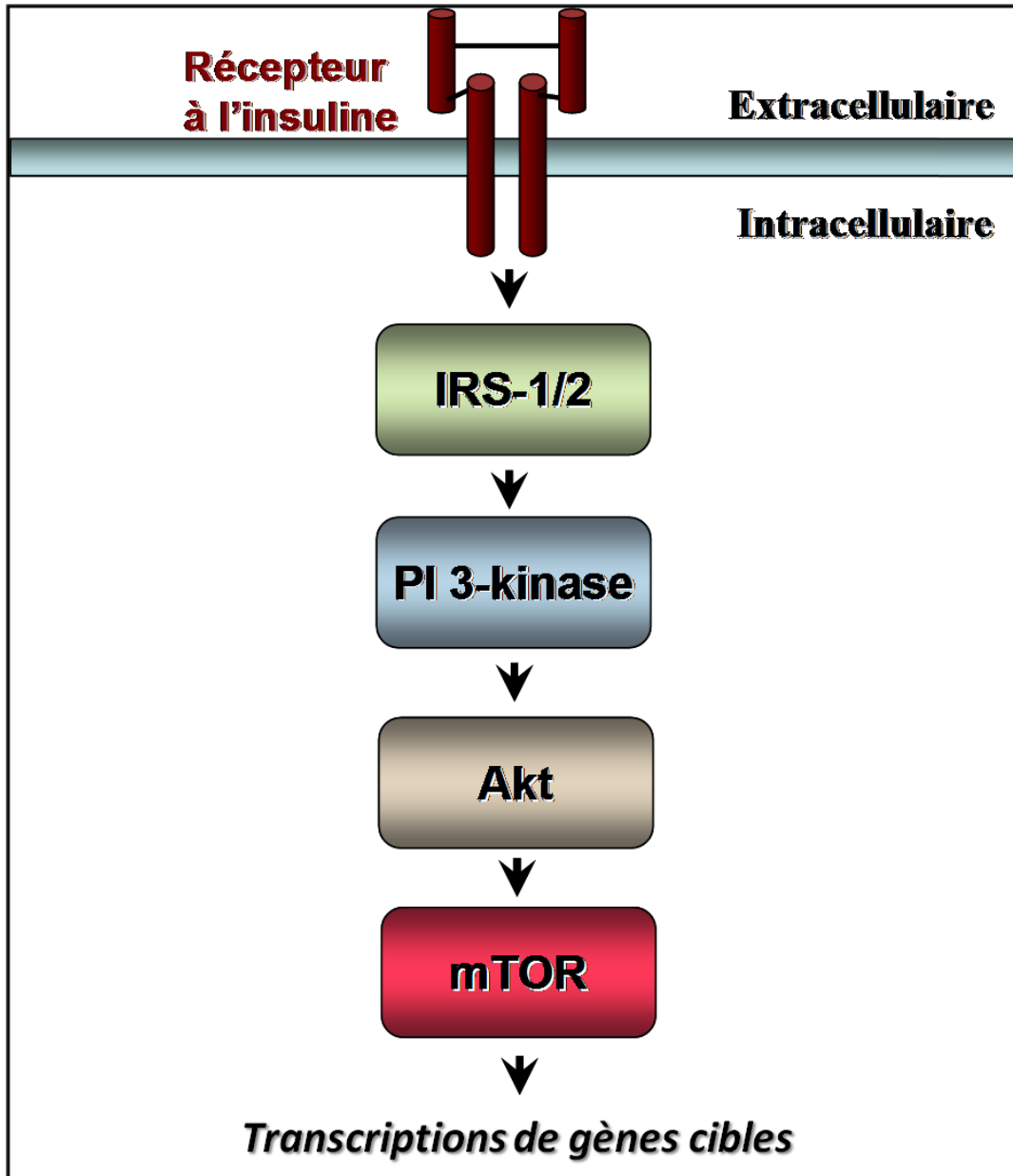


Figure 7 : Vue simplifiée de la voie d'activation PI3K / Akt / mTOR (IRS-1/2: Insulin Receptor Substrate 1/2; PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase; mTOR: mammalian Target of Rapamycin)

action participerait au rôle supposé de l'insuline dans la réabsorption d'eau au niveau rénal (131). L'aldostérone semble induire l'expression de l'AQP3 au niveau rénal chez le rat (132).

Les glucocorticoïdes stimulent l'expression de l'AQP1 au niveau des vaisseaux sanguins péritonéaux du rat (133). L'élément de réponses aux corticostéroïdes a été identifié dans le promoteur d'AQP1 au niveau d'une lignée érythroleucémique de souris (134). Les glucocorticoïdes ont également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes des AQPs 3 et 5 au niveau de l'appareil respiratoire (135).

Une des voies de régulation de l'expression de certaines aquaglycéroporines (3, 7 et 9) se fait par des hormones lipogéniques comme l'insuline, et lipolytiques (leptine et catécholamines). L'insuline en contrôlant l'expression de ces AQPs sur différents tissus (adipeux, hépatique, et intestinal), contrôle ainsi les entrées et sorties du glycérol et une partie des métabolismes lipidiques et glucidiques (47)(136). Par exemple, en réprimant l'expression de l'AQP3 dans les cellules intestinales, l'insuline va diminuer l'absorption intestinal de glycérol et aura un rôle hypoglycémiant supplémentaire (46)(137). Les effecteurs de ces voies d'activation sont nombreux et en cours d'identification. On peut ainsi citer l'ion Magnésium et le peptide vasoactif intestinal qui, à l'instar de l'insuline, jouent également sur l'expression du gène de l'AQP3 au niveau intestinal (138). Les voies d'activation sont également à l'étude. Au niveau des hépatocytes et adipocytes, l'action de l'insuline sur l'expression des aquaglycéroporines se fait par la voie du phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) / Akt / mTOR (139) (Figure 7). Cette voie est connue pour l'expression d'un transporteur majeur de glucose (GLUT4), et pour la synthèse protéique et de glycogène. De plus des IREs (*Insulin Response Elements*), qui existent dans de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose, ont également été décrits dans certains promoteurs d'AQPs (140)(141). Au sein des

membranes chorio-amniotiques, les voies de signalisation de l'insuline régulant l'expression des AQP n'étaient pas décrites.

Le rôle des rétinoïdes, impliqués dans la régulation de l'expression de gènes au sein des membranes fœtales (142), n'était pas connu sur l'expression des AQP au sein des membranes. En revanche, il a été démontré qu'ils stimulaient la transcription du gène d'AQP3 au niveau de la peau (143) et du gène d'AQP1 au niveau de cellules d'erythroleucémie (144).

Au niveau des membranes fœtales, les effecteurs sont encore moins connus ; seules les stimulations de transcription des gènes des AQP 1, 3, 8 et 9 par l'AMPC de manière protéine kinase A indépendante (145)(146) et du gène de l'AQP8 par un stress hypotonique (147) ont été identifiées.

5. Physiopathologie

Le premier exemple de l'importance clinique d'une AQP déficiente altérant la perméabilité aqueuse d'un organe, a été apporté dans le cadre du diabète insipide néphrogénique, une pathologie rare qui résulte en l'émission de larges volumes d'urines diluées. Des mutations ont été identifiées sur le gène de l'AQP2 dans des formes héréditaires. Une diminution d'expression d'AQP2 lors de formes acquises a également été décrite (44). Une altération de la coordination entre les AQP des tissus adipeux et hépatiques chez l'homme obèse et le diabétique de type 2 a également été bien étudiée (47). De plus, pour certains auteurs, la polyurie du diabète sucré ne peut être expliquée uniquement par la diurèse osmotique, et elle serait due également au manque d'insuline jouant un rôle au niveau rénal dans la réabsorption d'eau en partie par le biais des AQP (131). Le rôle de l'AQP7, qui en contrôlant le contenu pancréatique intracellulaire en glycérol participerait à la régulation de la sécrétion d'insuline,

est également à l'étude dans le développement du DT2 (47). D'autres pistes sont explorées : altération de l'expression de l'AQP9 dans le tissu synovial de patients avec arthrite rhumatoïde, des AQPs 1 et 5 dans le syndrome de Gougerot-Sjögren (syndrome sec) des glandes lacrymales et salivaires (82).

Certaines études se sont intéressées au rôle des AQPs dans l'hydramnios, mais uniquement dans un cadre idiopathique. Il en ressort une augmentation de l'expression des AQPs que l'on retrouve habituellement à terme sur ces membranes. Les AQPs 1 (62)(148), 3, et 9 (149) augmentent au niveau de l'amnion et du chorion, et l'AQP8 n'augmente que dans l'amnion (150)(151). Pour Mann et collaborateurs, l'augmentation d'expression d'AQP1 est vue comme un mécanisme visant à compenser l'augmentation de volume de liquide amniotique et non comme sa cause (148). De façon parallèle, Zhu et collaborateurs ont montré une diminution compensatrice de certaines AQPs dans le cadre de l'oligohydramnios. L'expression diminuée de l'AQP1 dans l'amnion, et de l'AQP3 dans l'amnion et le chorion permet ainsi d'éviter l'absorption intra-membranaire et de maintenir une homéostasie (152). Une étude récente, incluant une petite cohorte de femmes atteintes de diabète gestationnel (n = 13), a introduit l'implication des AQPs au sein des membranes fœtales (153).

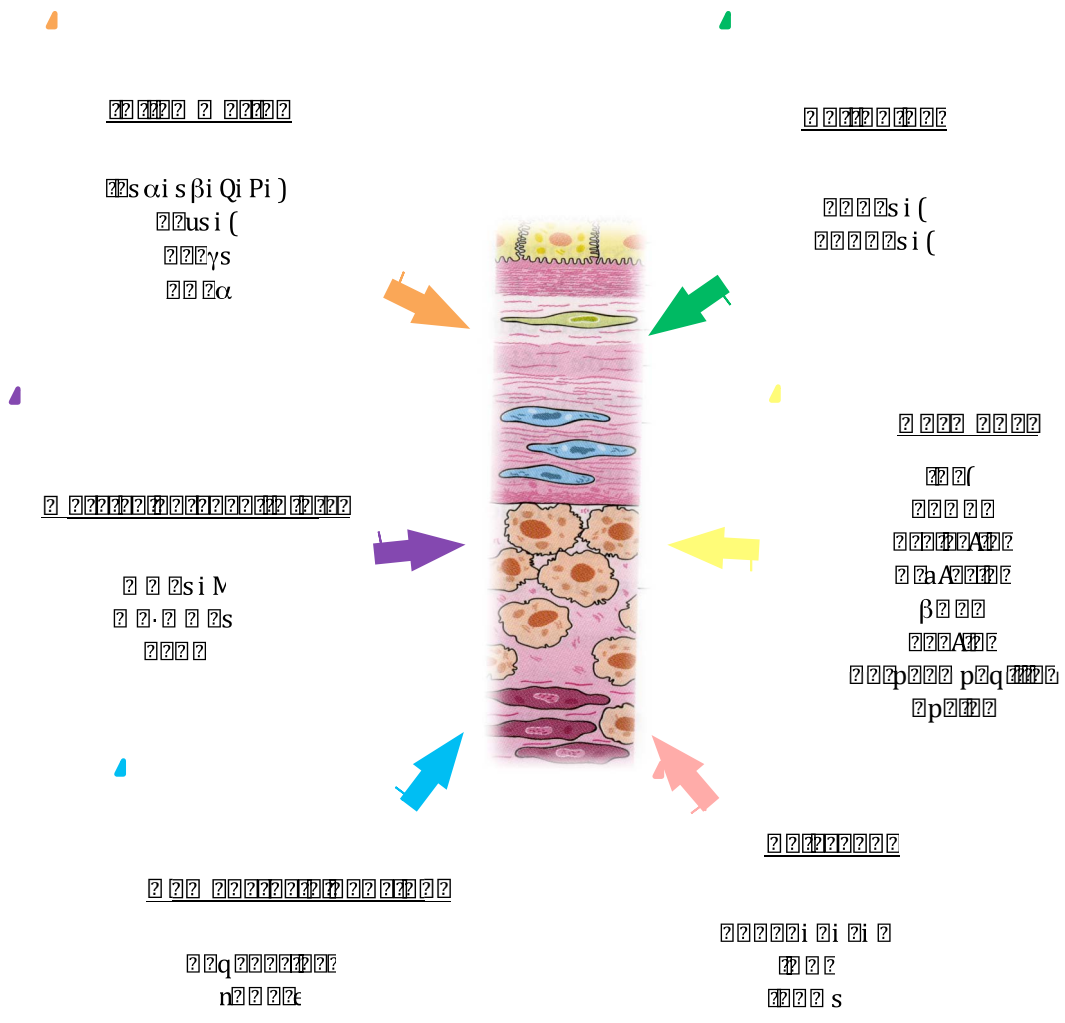


Figure 8 : Crible *in silico* Bibliosphère/Génomatix®. Gènes cibles potentiels des rétinoïdes dans les membranes fœtales humaines. (D'après Marceau G., non publié)

V. Objectifs

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle des aquaporines au sein des membranes fœtales dans la physiologie et la pathologie de l'homéostasie du liquide amniotique.

Dans une première partie, axée sur la physiologie, il a été défini l'ontogenèse des aquaporines dans les membranes fœtales humaines au cours de la grossesse (Publication n°1) et déterminé l'implication des rétinoïdes dans la régulation de l'AQP3 (Publication n°2). Cette première partie, ayant fait l'objet de la thèse du Dr. Cécile Prat, s'inscrit dans la thématique de l'équipe R2D2 (Retinoids, Reproduction, Developmental Diseases) du Pr Sapin. Cette dernière, après avoir démontré que la voie des rétinoïdes était fonctionnelle dans les membranes fœtales (154), a initié une recherche *in silico* de gènes cibles de ces rétinoïdes dans ce tissu extra-embryonnaire. Cette analyse bioinformatique a permis de mettre en évidence une liste de gènes dont la trans-activation serait potentiellement sous l'influence des rétinoïdes (Figure 8).

Dans une deuxième partie, axée sur la physiopathologie et représentant le sujet principal de cette thèse, il a été précisé le rôle des AQPs au sein des membranes chorio-amniotiques chez des parturientes diabétiques (Publication n°3). Le polyhydramnios est une pathologie fréquemment associée au diabète. Les mécanismes physiopathologiques de cette complication sont peu connus. Dans ce contexte, ils sont le plus souvent reliés à la polyurie fœtale consécutive à l'hyperglycémie, et le rôle des membranes fœtales, pourtant essentiel dans les mécanismes de régulation du volume de liquide amniotique, n'a été que peu étudié. Les seules études réalisées l'ont été dans un cadre idiopathique. Elles ont par ailleurs démontré des niveaux d'expression différents des AQPs dans les membranes fœtales, entre les grossesses

ayant un volume de liquide amniotique normal ou non. Les voies d'activation n'ont pas non plus été étudiées. Notre travail s'est effectué en plusieurs étapes :

1. Tout d'abord, établir et comparer le profil d'expression transcriptionnel qualitatif et quantitatifs des AQPs au sein de 129 membranes fœtales issues de 4 populations de parturientes : non diabétique, diabétique de type 1 (DT1), diabétique de type 2 (DT2) et diabète gestationnel (DG).
2. Ensuite, en cas de profils transcriptionnels différents, une étude à l'échelle protéique des AQPs a été faite sur ces mêmes membranes.
3. Enfin, en cas de différences d'expression, nous avons analysé l'effet de l'insuline sur l'expression des aquaporines identifiées au sein du chorion et de l'amnion.

RESULTATS

Publication n°1

« Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes »

**C. Prat, L. Blanchon, V. Borel, D. Gallot, A. Herbet, D. Bouvier,
G. Marceau, V. Sapin**

Biology of Reproduction, 2011, 86(2):48, 1-8.

Tout au long de la grossesse, le volume de liquide amniotique (LA) doit être finement régulé afin d'assurer le développement harmonieux du fœtus. En effet, des dérégulations du volume de liquide amniotique peuvent conduire à des pathologies obstétricales. Ainsi, un excès de LA correspond à un polyhydramnios tandis qu'un manque de LA correspond à un oligohydramnios. Le volume de LA est variable au cours de la grossesse et dépendant de nombreux facteurs établissant un équilibre production/résorption. Les pathologies obstétricales engendrées par un volume de LA inapproprié interviennent donc lorsque cet équilibre n'est plus respecté : soit par une production excessive de LA, soit par un défaut de résorption de celui-ci.

La résorption du LA fait intervenir deux voies essentielles : le flux placentaire et le flux intra-membranaire. Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes tout particulièrement intéressé à la régulation du flux intra-membranaire, c'est-à-dire au travers des membranes fœtales. De nombreux acteurs moléculaires peuvent être impliqués dans cette régulation. Les AQPs sont des canaux transmembranaires, qui permettent le passage facilité d'eau et de petits solutés au travers des membranes cellulaires. De nombreuses données de la littérature étayent l'hypothèse selon laquelle ces glycoprotéines seraient impliquées dans la régulation du flux intra-membranaire. L'un des exemples les plus probants est la démonstration par Mann *et al.* en 2005 que les souris AQP1^{-/-} développent un polyhydramnios au cours de leur gestation (62). L'AQP1, comme d'autres aquaporines, participerait donc fortement à la régulation de la résorption du volume de LA au travers des membranes fœtales.

La publication présentée ci-après fait donc état de l'expression spatio-temporelle des aquaporines dans les membranes fœtales humaines. Des expériences de RT-PCR et d'immunohistochimie nous ont permis, dans un premier temps, de démontrer l'expression des AQPs 1, 3, 8, 9 et, pour la première fois, de l'AQP 11 à terme dans les membranes fœtales humaines (amnion et chorion). Nous avons ensuite réalisé des expériences de qRT-PCR sur les transcrits extraits à partir d'amnion, de chorion et de chorion + amnion, issus de membranes fœtales à différents stades gestationnels (10, 11, 12, 18, 21, 26, 32, 38 semaines d'aménorrhée) représentant respectivement

les 1^{er}, 2nd et 3^{ème} trimestre de grossesse. Ces expériences ont montré des différences d'expression des transcrits codant pour les AQPs 1, 3, 8, 9 et 11 en fonction de la semaine de grossesse ainsi que du feuillet considéré (amnion ou chorion). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de Western-blot sur les protéines cellulaires totales (membranaires et cytosoliques) issues des mêmes membranes sur amnion + chorion.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence des AQPs 1, 3, 8, 9 et, pour la première fois, de l'AQP 11 à terme et tout au long de la grossesse, à des niveaux d'expression spatio-temporels variables : selon le stade gestationnel et le feuillet membranaire considéré. Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'implication des AQPs dans la modulation du flux intramembranaire nécessite probablement une régulation transcriptionnelle fine permettant de maintenir un équilibre physiologique entre la production et la résorption de liquide amniotique. Le maintien de cette homéostasie pourrait donc passer par une modulation de l'expression des gènes des aquaporines par les rétinoïdes au cours de la grossesse, volet étudié dans la publication n°2. Une perturbation de cette homéostasie dans une pathologie pourvoyeuse de polyhydramnios comme le diabète, pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques de cet excès de LA, volet étudié dans la publication n°3.

Ontogeny of Aquaporins in Human Fetal Membranes¹

Cécile Prat,³ Loïc Blanchon,³ Valérie Borel,³ Denis Gallot,^{3,4} Alain Herbet,³ Damien Bouvier,³
Geoffroy Marceau,³ and Vincent Sapin^{2,3}

³Laboratoire de Biochimie Médicale, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Université Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 931, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

⁴Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Clermont-Ferrand, CHU Estaing, Pôle Gynéco-Obstétrique-Reproduction Humaine, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

It has been proposed that four members of the aquaporin family (AQPs 1, 3, 8, and 9) are involved in the control of amniotic fluid (AF) homeostasis, as illustrated by their differential expression patterns in normal and pathological human term fetal membranes. However, there are no data available to date on their ontogeny throughout pregnancy. Our objective was to determine spatiotemporal expression profiles of the mRNA and proteins of all 13 members of this transmembrane channel family. For this purpose, we used healthy fetal membranes from the first, second, and third trimesters of pregnancy. Total mRNA and proteins were extracted from total membranes and from separated amnion and chorion. Quantitative PCR, Western blot, and immunohistochemistry experiments were carried out to determine the presence of AQPs and to quantify their spatiotemporal expression patterns throughout pregnancy. The WISH cell line was tested to propose a cellular model for the role of AQPs in the amnion compartment. AQP11 expression was established in amniotic membranes at term. Aquaporins 1, 3, 8, 9, and 11 mRNA and proteins were present in amnion and chorion throughout human gestation. Each AQP has a time-specific expression pattern, with AQP1 presenting the highest variation in terms of mRNA and protein levels. The WISH cell line also expressed the same five AQPs. Taken together, these results indicate that AQPs are expressed and potentially involved in the regulation of AF homeostasis throughout pregnancy. This also clearly supports the hypothesis that abnormal expression could occur at any time during pregnancy, ultimately leading to obstetrical pathologies such as polyhydramnios or oligohydramnios.

aquaporin, fetal membranes, gene expression, human reproduction, placenta, placental transport

INTRODUCTION

In human pregnancy, the fetus is enclosed in the amniotic cavity defined by the placenta and the chorioamniotic/fetal membranes. The fetal membranes are composed of the inner

amnion lining the amniotic cavity and the outer chorion underlying the maternal decidua. The amnion is composed of an epithelial cell monolayer and connective stromal tissue, whereas the chorion is composed of a trophoblastic cell multilayer and reticular fibers. These extraembryonic tissues are well-established transitional structures critical to normal gestation in mammals [1]. One of their many important biological functions is to regulate the volume of amniotic fluid (AF) produced by the fetus. Amniotic fluid composition and quantity vary throughout pregnancy in response to fetal development and growth [2]. Dynamic control of AF volume is critical for appropriate fetal growth and symmetrical development. Reduced (oligohydramnios) or excessive (polyhydramnios) amounts of AF are clearly linked to pathologies that can lead to fetal abnormalities or significant perinatal morbidity and mortality [3]. Because the amniotic cavity is a fetal water compartment, water transfer across fetal membranes in contact with the decidua (called transmembranous flow) or in contact with the placenta (called intramembranous flow) could be a critical modulator of AF volume [4]. The fine regulation of this transmembranous flow is poorly understood, but strong evidence suggests that membrane water channels are involved, with aquaporins (AQPs) being the leading candidates.

Aquaporins are a family of transmembrane water channel glycoproteins with the following three subgroups: classic AQPs, aquaglyceroporins, and super-AQPs. To date, 13 AQPs, named AQPs 0 to 12, have been described in mammals. To be functional, AQPs have to adopt a homotetrameric organization in the plasma membrane, with each monomer working independently as a hydrophilic pore [5–7]. This structure enables all AQPs to ensure rapid water flow across biological membranes but also allows the traffic of other small molecules such as glycerol and urea by AQPs 3, 7, and 9 (called aquaglyceroporins) or nitrate by AQP6 [8–12]. Studies have so far established that four AQPs (AQPs 1, 3, 8, and 9) are expressed in human fetal membranes, although only at the end of pregnancy [13]. Their expression levels are also linked to normal (model mouse) or pathological (oligohydramnios or polyhydramnios) AF volume [13]. Aquaporin expression can also be down-regulated in the extraembryonic environment throughout pregnancy [13].

Taken together, these results suggest modification in AQP expression in fetal membranes over the course of pregnancy. Based on this hypothesis, we aimed to determine the mRNA and protein expression patterns of the AQP family in the fetal membrane zone (layer determination) and during the different trimesters of pregnancy (timing determination).

¹Supported by INSERM (“Hospital Interface Contract”) grants to D.G. and V.S. C.P. was supported by a Ph.D. thesis grant from the “Conseil Régional d’Auvergne.”

²Correspondence: Vincent Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Université d’Auvergne, F-63001 Clermont-Ferrand CEDEX, France. E-mail: vincent.sapin@u-clermont1.fr

Received: 8 August 2011.

First decision: 25 August 2011.

Accepted: 21 October 2011.

© 2012 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

TABLE 1. Sequences of synthetic oligonucleotides used for RT-PCR and RT-qPCR analysis of the 13 human *AQPs* and *RPLP0*.

Human gene	Sequence (5'–3')		Product size (bp)	Accession no.
	Forward	Reverse		
Aquaporin 0 (<i>AQP0</i>)	GAGGAAACCTAGCACTCAA	TAATACATCCCAAAGAGGTG	196	NM_012064.3
Aquaporin 1 (<i>AQP1</i>)	ATCACCTCCTCCCTGACT	CAGCCAGTGTAGTCAATAGC	224	NM_198098.2
Aquaporin 2 (<i>AQP2</i>)	CTCTCTCCATAGGCTTCTCT	ACAGCACGTAGTTGTAGAGG	189	NM_000486.5
Aquaporin 3 (<i>AQP3</i>)	GAATAGT'TTTTGGGCTGTAT	CCTATGAAC'TGGTCAAAGAA	151	NM_004925.3
Aquaporin 4 (<i>AQP4</i>)	GGAATCCTCTATCTGGTCAC	CTAAAGCTATTGAGCCAGTG	184	NM_001650.4
Aquaporin 5 (<i>AQP5</i>)	ACCTTGTCGGAATCTACTTC	AGAGCAGGTAGAAGTAAAGGA	159	NM_001651.2
Aquaporin 6 (<i>AQP6</i>)	TAGGCTCCACATCTCTC	CCAGTTGAGACACTGTTC	154	NM_001652.3
Aquaporin 7 (<i>AQP7</i>)	ATAGCAAAGATCCAGGAAAT	ACAGTTAGCAAAGGTCACAG	243	NM_001169.2
Aquaporin 8 (<i>AQP8</i>)	GGTGCATCAATGAGAAGAC	GTCTTCCCATCTCCAATGAA	238	NM_001169.2
Aquaporin 9 (<i>AQP9</i>)	CGTCTTTGCCATCTTTGACT	CCACTACAGGAATCCACCAG	223	NM_020980.3
Aquaporin 10 (<i>AQP10</i>)	AGTTTCTGGGTGTGTTTGTA	ACTGCACCAAGATGTAAATG	243	NM_080429.2
Aquaporin 11 (<i>AQP11</i>)	CATCACCTTTTGGTCTATG	GAAAAAGCTGAACATCAAAA	175	NM_173039.1
Aquaporin 12 (<i>AQP12</i>)	CTTTTGTTCATCTGACC	CGTACTCCAGTAAAGGTGTGT	185	NM_198998.1
Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (<i>RPLP0</i>)	GACCTGGAAGTCCAATACT	GTGATATCAAGCACTTCAGG	600	M17885

MATERIALS AND METHODS

Tissue Collections

Healthy fetal membranes (mean age of included women, 31.5 ± 4.9 yr) were collected after informed consent as previously described [14]. The research protocol was approved by the institutional regional ethics committee (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se pretant la Recherche Biomedicale Auvergne). First-trimester membranes ($n = 3$ per isolated gestational stage) were obtained and isolated by aspiration after voluntary termination of pregnancy. Midtrimester membranes (18, 21, and 26 wk of gestation [WG]) were harvested after termination of pregnancy ($n = 3$ per isolated gestational stage). Eligible cases corresponded to lethal fetal anomalies with no change in AF volume (i.e., severe cardiac anomalies and classic brain damage). Third-trimester membranes ($n = 5$ per isolated gestational stage) were collected from pregnancies after cesarean births (at Centre Hospitalier Universitaire Estaing, Clermont-Ferrand, France). Each collected membrane had an appropriate volume of AF for the gestational age. For all third-trimester collections, AFs contained no meconium, and the placentas were macroscopically and microscopically normal. Histological examination (performed on all included fetal membranes) demonstrated no cases of chorioamnionitis leading to pathological modification of AQP expression levels [15]. The amniotic membranes were immediately collected and stored at -80°C before performing frozen sections or quantitative RT-PCR and protein assays. All membranes except those collected during the first trimester of gestation were separated into the following three groups: amnion alone, chorion alone, and amnion plus chorion.

Cell Culture

A human amnion-derived Wistar Institute Susan Hayflick (WISH; ATCC) epithelial cell line (contaminated with HELA cells) was cultured according to ATCC guidelines under standard conditions (5% CO_2 , 95% humidified air, 37°C) in modified Eagle medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 mg/ml streptomycin, and 50 IU/ml penicillin (Sigma-Aldrich).

Reverse Transcriptase PCR

Total RNA was extracted from human WISH cells, amnion, and/or chorion using TRIzol reagent (Invitrogen). The RNA quantity was determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm (ratio with proteins). The RNA quality was studied by gel electrophoresis (2% agarose) to test for the presence of intact 28S and 18S RNA bands. The cDNA was synthesized from 3 μg of RNA using a Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). The primer sequences used for classic and quantitative RT-PCR were originally generated using the Web program Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center) based on the published full-length human mRNA sequences of the 13 *AQP* genes and designed to avoid genomic DNA amplification (Table 1). All primers were first checked for their ability to specifically amplify defined mRNA regions using *AQP*-expressing human tissues (positive controls). Classic RT-PCR assays were performed as previously described [16] but with annealing carried out at 59°C for 45 sec. A negative control for amplicon contamination

was set up using a complete PCR mix without cDNA. Quantitative RT-PCR reactions were performed using Power SYBR Green PCR Master Mix on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Quantification of housekeeping gene acidic ribosomal phosphoprotein P0, *RPLP0* (also known as *36B4*), transcripts was performed for all samples as an internal control of the amount and quality of cDNA as previously described [17]. The results are given as the ratio between each *AQP* and *RPLP0* transcript (consistently expressed over the pregnancy) relative to gestational age. All experiments were performed in duplicate. All PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and sequenced on both strands to confirm the specificity of the reaction.

Western Blots

Total protein was extracted from total amnion and chorion with a Plasma Membrane Protein Extraction Kit (BioVision) after tissue dispersion in a T10 basic Homogenizer Workcenter (IKA). Samples were denatured in a loading buffer (β -mercaptoethanol) at 100°C for 10 min and resolved on 10% SDS-polyacrylamide gel (70 μg of total protein per well). Separated proteins were electrotransferred onto Immobilon-P membranes (Millipore). Nonspecific sites were blocked for 1 h with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk (blocking solution). The membranes were then incubated overnight with rabbit anti-AQP1 (H-55, sc-20810), goat anti-AQP3 (C-18, sc-9885), and goat anti-AQP9 (F-17, sc-14988) (all from Santa Cruz Biotechnology); goat anti-AQP11 (AQP115-A; Alpha Diagnostic International); and mouse anti-AQP8 (ab77198) and mouse anti-beta-actin (ab-6276) (both from Abcam) antibodies diluted 1/100 in blocking solution. The membranes were washed in distilled water (three times for 5 min each) and TBS-Tween 0.1% (for 15 min) and then incubated with peroxidase-conjugated secondary anti-IgG antibodies (Abcam) diluted 1/5000 in blocking solution. After rewashing in TBS-Tween 0.1% (four times for 5 min each) and distilled water (for 10 min), membrane peroxidase activity was tested by enhanced chemiluminescence (ECL Plus kit; Amersham). Band quantification was performed using Quantity One software (BioRad). All experiments were performed in triplicate. Results were presented as ratio between the quantities of the protein of interest (AQPs) and the housekeeping protein beta-actin (consistently expressed over the pregnancy) on the same blot relative to gestational age.

Immunohistochemistry and Immunocytochemistry Experiments

Immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments were performed as previously described for cryosections (8 μm) and cells [17]. Slides of cells and tissues were fixed in paraformaldehyde (4% in PBS) and incubated overnight with rabbit anti-AQP1 (H-55, sc-20810) and anti-AQP11 (1101-AP; FabGennix Inc.), goat anti-AQP3 (C-18, sc-9885) and anti-AQP9 (F-17, sc-14988), and mouse anti-AQP8 (ab77198) antibodies (diluted 1/200 in TBS). The samples were examined after 4',6-diamidino-2-phenylindole nuclear staining under a Zeiss Axiophot microscope. For negative controls, sections were incubated with normal rabbit IgG.

TABLE 2. RT-PCR expression profiles of aquaporins 0 to 12 (AQP0–AQP12) in human term fetal membranes.^a

Membrane/cell	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9	AQP10	AQP11	AQP12
Amnion	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	–
Chorion	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	–
Amnion + chorion	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	–
WISH	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	–

^aExpression indicated by +, no expression indicated by –.

Statistical Analysis

Results expressed as means ± SDs are an average of duplicates of three independent experiments. Comparison of means was performed by parametric ANOVA using GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc.). For all studies, values were considered significantly different at *P* < 0.05.

RESULTS

AQP11 Was Also Expressed in Human Term Fetal Membranes and WISH Cells

The RNA was successfully isolated from all analyzed samples with a constant high quality. All specimens expressed the housekeeping gene *RPLP0* transcript. The RT-PCR screening for the 13 *AQP* genes (Table 2) detected *AQP11* in human term amnion and chorion, in addition to the *AQPs* 1, 3, 8, and 9 already described. Immunohistochemistry confirmed that these five proteins were expressed in the fetal membranes with an intracellular AQP11 localization (Fig. 1 and data not shown). No expression was detected for *AQPs* 0, 2, 4, 5, 6, 7, 10, and 12. As a well-established amniotic epithelial cell model, WISH was analyzed for AQP transcript and protein expression. Whereas AQP8 had been the only AQP previously described in this cell line, we also detected *AQPs* 1, 3, 9, and 11 (Table 2 and Fig. 1).

AQPs 1, 3, 8, 9, and 11 Were Also Expressed During Every Trimester of Pregnancy

To propose a longitudinal ontogenesis of *AQPs* throughout gestation, fetal membranes sampled were collected for all three

trimesters (i.e., at 10, 11, and 12 WG for the first trimester; at 18, 21, and 26 WG for the second trimester; and at 32 and 38 WG for the third trimester). Whatever the stage analyzed, *AQPs* 0, 2, 4, 5, 6, 7, 10, and 12 were never found, whereas *AQPs* 1, 3, 8, 9, and 11 were expressed throughout pregnancy (Fig. 2).

AQPs 1, 3, 8, 9, and 11 Transcripts and Proteins Showed Differential Expression Patterns During Human Pregnancy

AQP1 presented the highest levels of expression during the first trimester and globally tended to decrease after 11 WG. Indeed, both 11 and 21 WG marked significant (*P* < 0.001) increases in *AQP1* mRNA quantity in terms of total membranes (Fig. 3A), and amnion and chorion taken in isolation followed a similar pattern (Fig. 3, B and C). Protein expression also peaked at 11 WG (*P* < 0.001), with a second peak at 26 WG (*P* < 0.05) instead of at 21 WG (Fig. 3D). Furthermore, quantitative RT-PCR revealed that *AQP3* mRNA is principally present at 12 WG (*P* < 0.01) and at 26 WG (*P* < 0.001) in healthy human fetal membranes (Fig. 4A), whereas the protein pattern of AQP3 showed a single peak at 18 WG (*P* < 0.05) (Fig. 4B). Despite these differences between mRNA and protein expression patterns, the results globally showed a sharp increase in AQP3 from 12 to 26 WG (i.e., spanning the first and second trimesters) and weak AQP3 expression during the third trimester of pregnancy. In addition, high *AQP8* mRNA expression was detected as early as 10 WG (*P* < 0.01), and AQP8 protein expression peaked at 11 and 12 WG (*P* < 0.01). A second high peak of *AQP8* was detected at 18 WG at

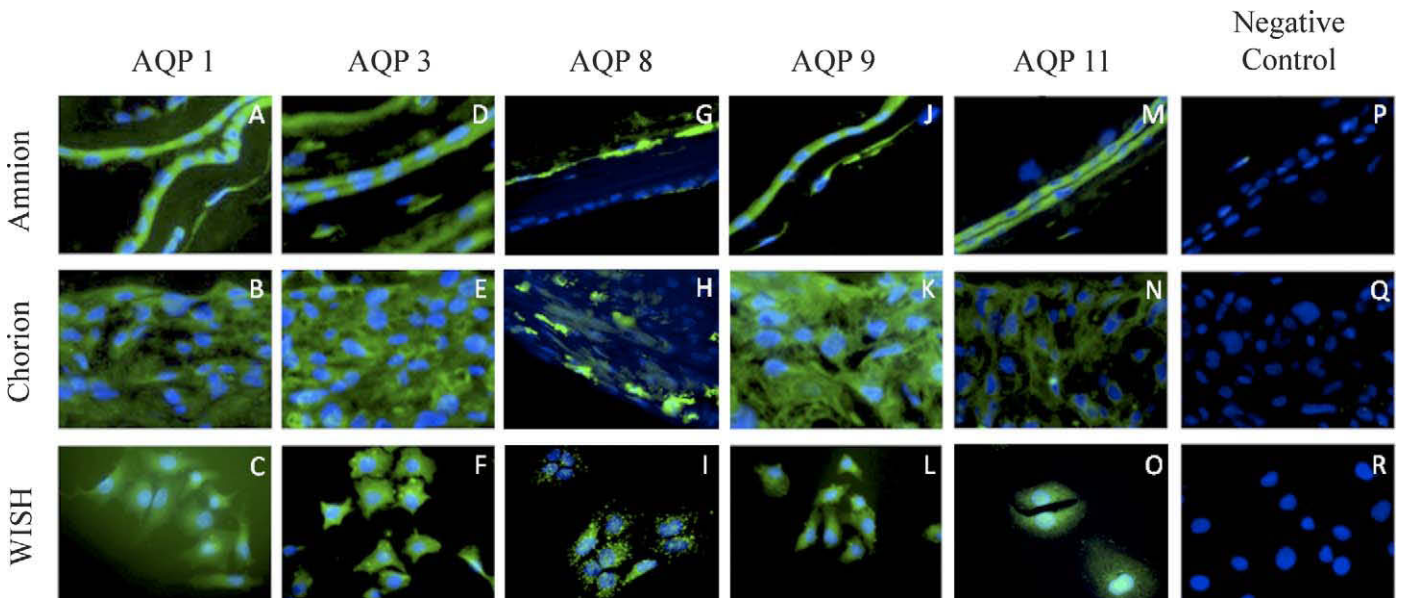


FIG. 1. Aquaporin protein expression in human term fetal membranes and the WISH cell line: AQP1 (A–C), AQP3 (D–F), AQP8 (G–I), AQP9 (J–L), and AQP11 (M–O) immunohistochemistry and immunocytochemistry (green labeling) was performed on human term amnion (A, D, G, J, M, and P), human term chorion (B, E, H, K, N, and Q), and the WISH cell line (C, F, I, L, O, and R). Cell nuclei were visualized by Hoescht (blue) staining. Primary antibody-free incubations (P, Q, and R) are presented as negative controls. Original magnification ×400.

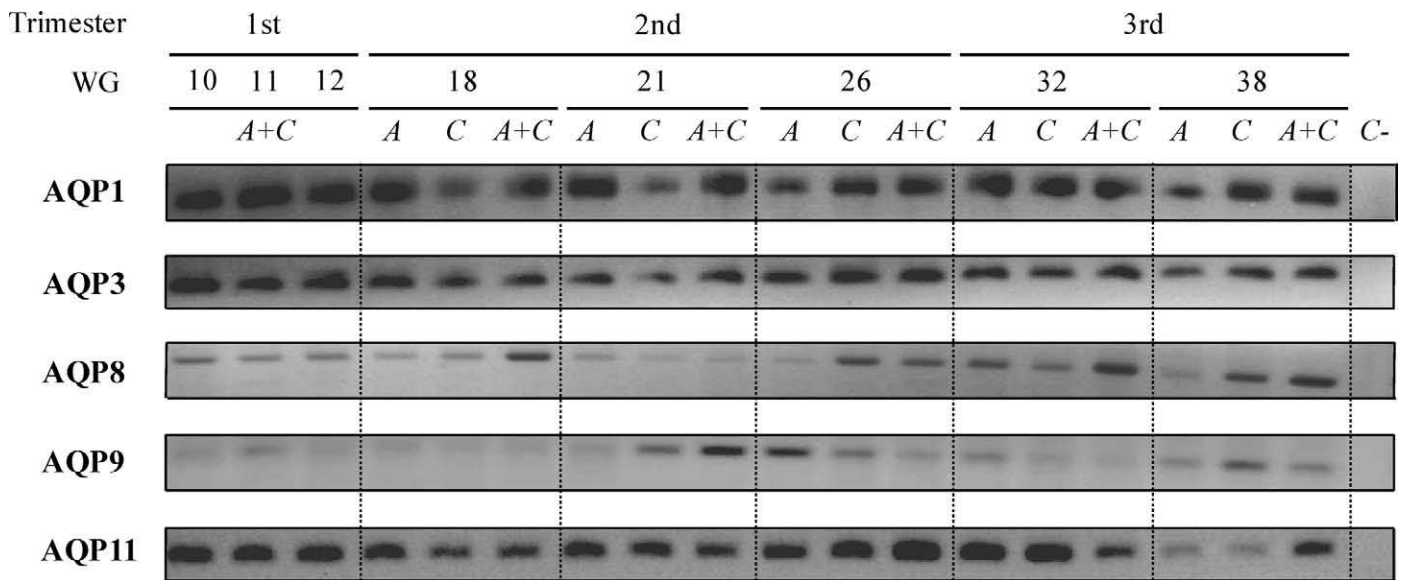


FIG. 2. Temporal AQP mRNA expression patterns in human fetal membranes at different trimesters of pregnancy. The RT-PCRs were performed on total mRNA extracted from fetal membranes at 10, 11, 12, 18, 21, 26, 32, and 38 WG. Negative controls (C-) were performed in the absence of cDNA matrix. A, isolated amnion; C, isolated chorion; A+C, amnion and chorion; C-, negative control.

transcript level but not at protein level (Fig. 4, C and D). AQP9 protein expression levels showed no significant pattern change during gestation, whereas *AQP9* mRNA expression peaked at 21 WG ($P < 0.001$) (Fig. 4, E and F). Finally, the 18–21 WG period marked the highest level of *AQP11* mRNA expression (Fig. 5A), while AQP11 protein showed an accumulation at term (Fig. 5, B and C).

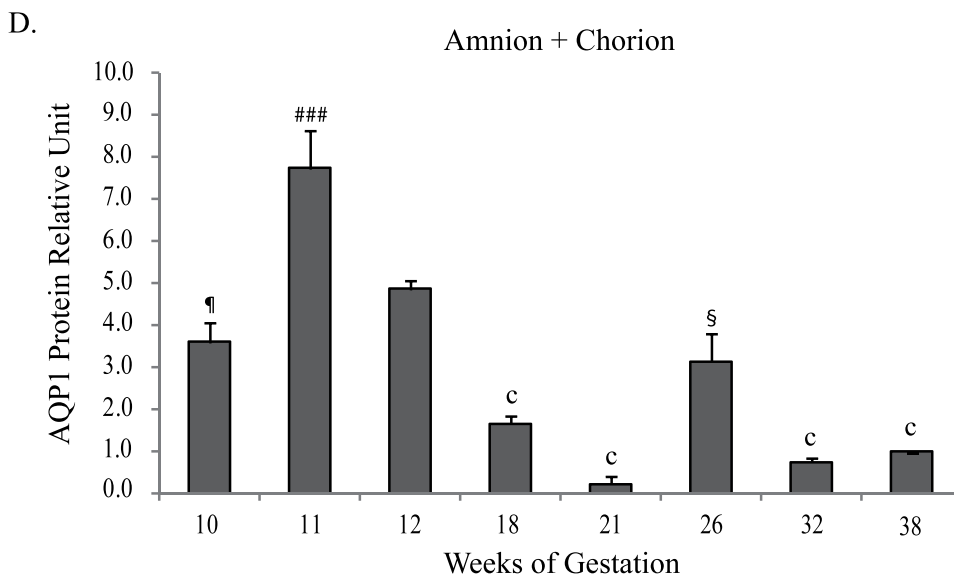
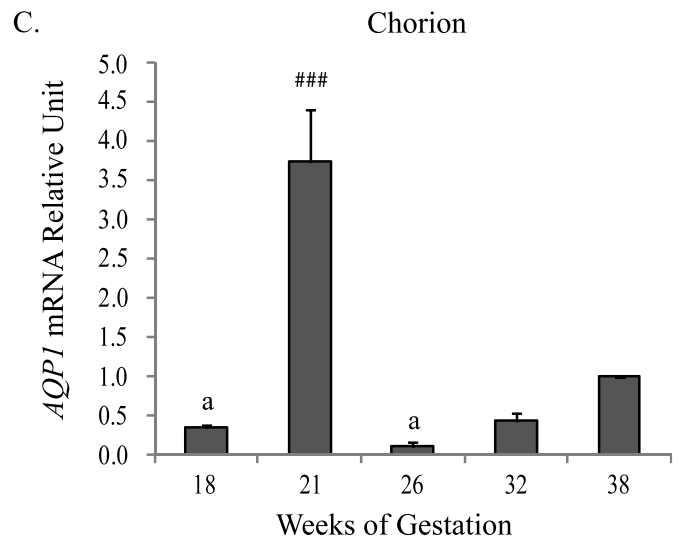
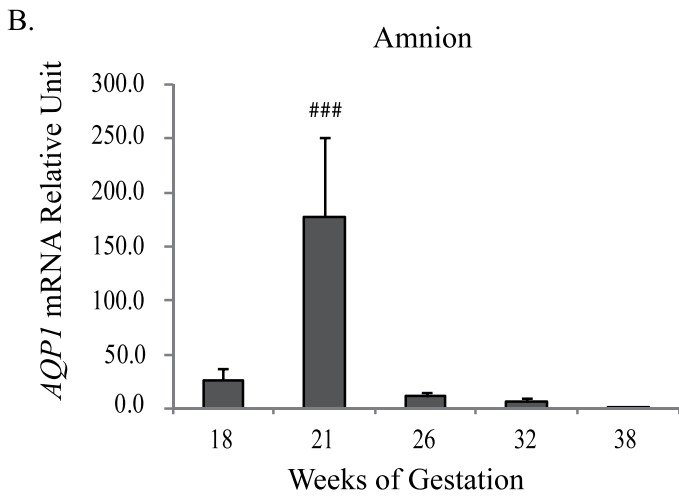
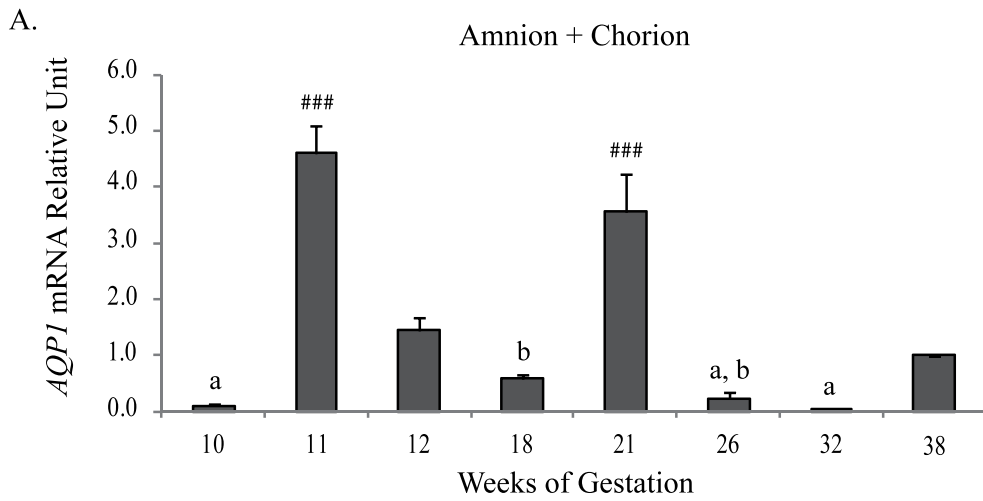
DISCUSSION

In the context of previous findings on AQPs and human amniotic membranes [13], the present study establishes the following two major new findings: 1) the presence of an additional AQP11 in the fetal membrane environment and 2) the presence of AQPs 1, 3, 8, 9 (to date only described at term), and 11 expression throughout pregnancy. These findings were reproduced in different pregnant women, thus ensuring the consistency of our conclusions. Aquaporins 1, 3, 8, and 9 are found in humans and sheep and mice species with anatomically and histologically different placentas. This conserved combination of AQPs is likely to be widely present in mammalian fetal membranes, supporting the hypothesis that these AQP water channels may be fundamental to the regulation of fetal water flow. At all stages analyzed, all three subgroups of the AQP family are expressed in the amniotic membranes: the classic AQPs with AQP1 and AQP8, the aquaglyceroporins with AQP3 and AQP9, and the super-AQPs with AQP11 [18]. This global expression pattern suggests an interesting cytoplasmic (AQP11) and transmembranous (AQPs 1, 3, 8, and 9) network enabling water transport for all expressed AQPs, as well as for other molecules (urea, glycerol, ammonia, anion as nitrate, and neutral solutes such as monocarboxylates, polyols, carbamides, purine, and pyrimidine) for the aquaglyceroporins [19]. Amniotic transmembranous water flux could occur most

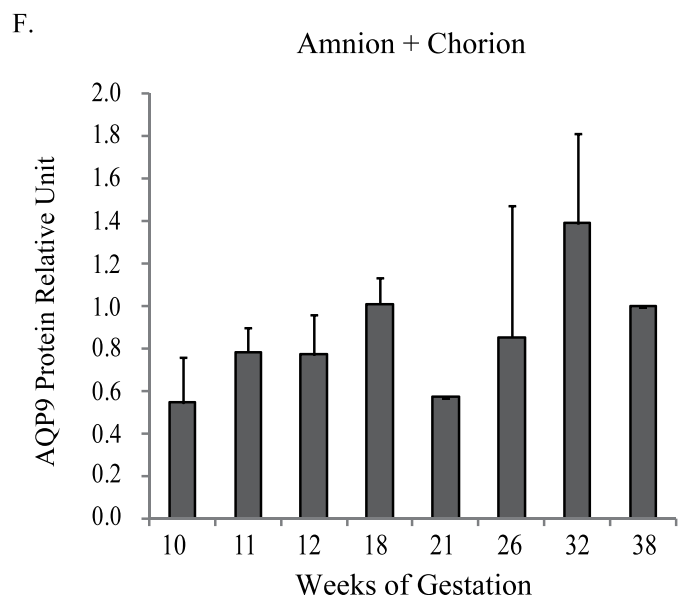
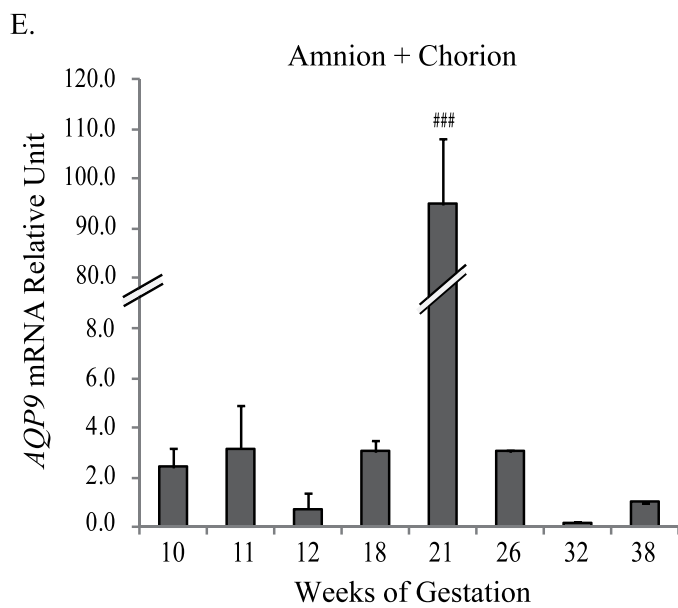
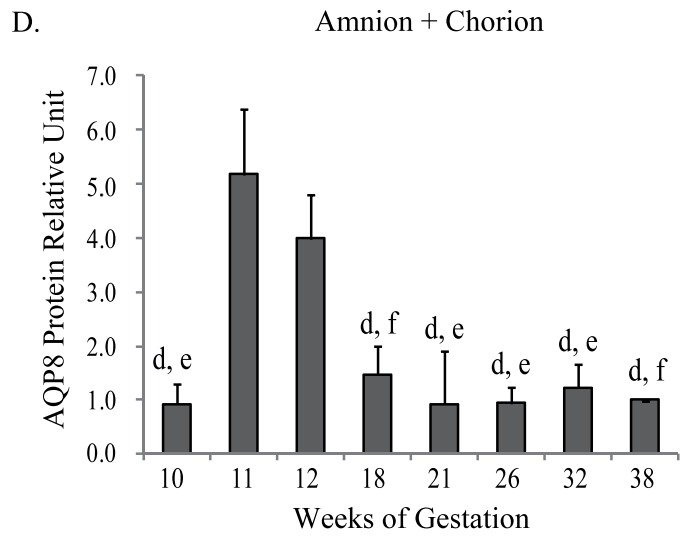
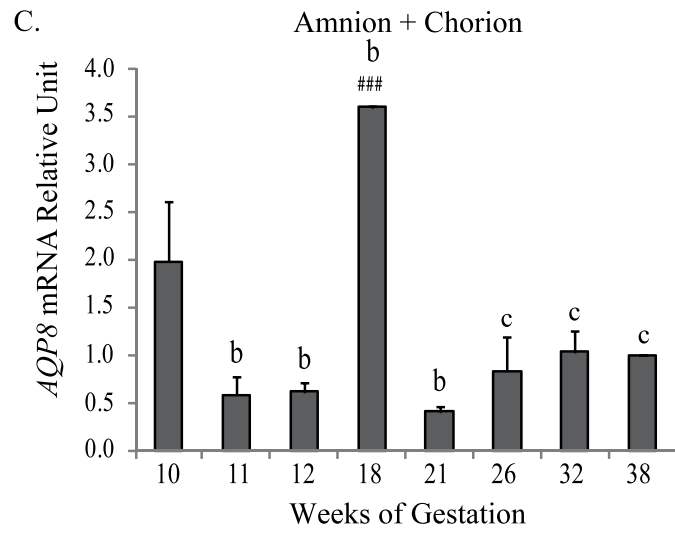
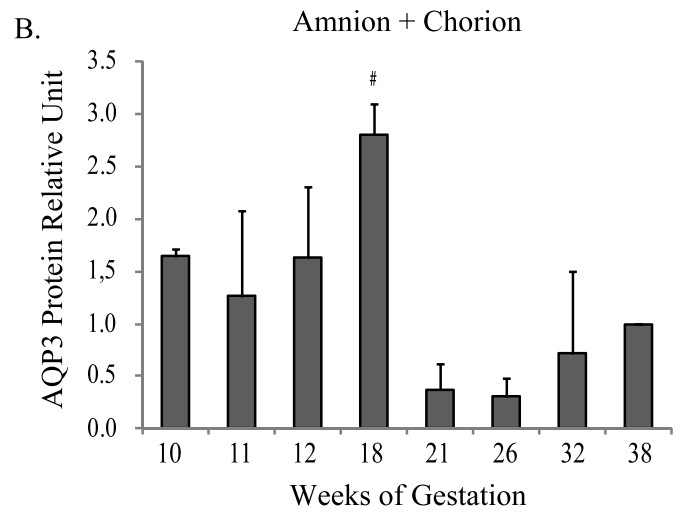
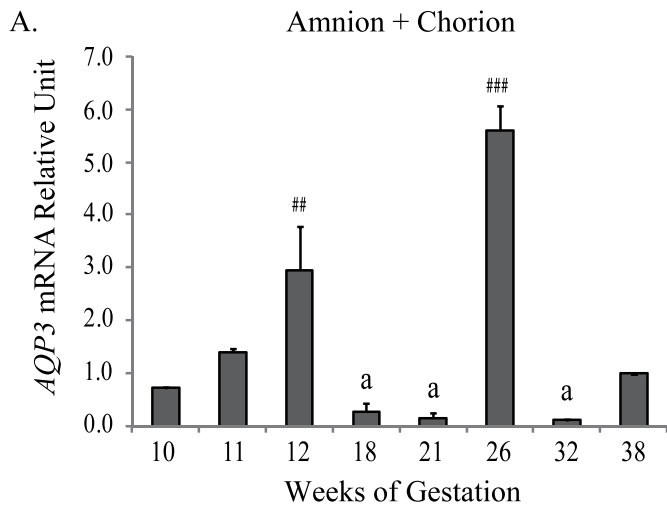
rapidly in the presence of AQPs because these channels reportedly increase cell plasma membrane water permeability 5-fold to 50-fold compared with membranes in which water moves primarily through the lipid bilayer. Note that the five AQPs were always expressed in both fetal structures (amnion and chorion) at all analyzed stages, suggesting a similarity of amniotic and chorionic fluid permeabilities. Thus, a constant mechanism can be proposed that operates throughout pregnancy (and at term) to support the transport of water and solutes across the amniotic membranes (avascular structures with no significant vascularity between amnion and chorion) and therefore acts as a major contributor to AF volume and homeostasis [20]. In addition, an alternative role could be proposed for AQP1 and AQP3 throughout pregnancy based on the fact that these two AQPs have been implicated in a cell migration process that is fundamental to the development of the fetal membranes. Indeed, in the context of other mammalian tissues, an accumulation of these AQPs in the front end of migrating cells allows a rapid water flow. Aquaporins also facilitate rapid changes of cell volume to migrate easily into the extracellular matrix [21].

As described previously for ovine and mice amniotic membranes [22, 23], we demonstrated that human membranes also have a dynamic temporal expression pattern. This phenomenon must be linked to the variability in human AF composition and volume [24]. The average AF volume increases progressively from 20 ml at 10 WG to 630 ml at 22 WG and 770 ml at 28 WG, with little subsequent change between 29 and 37 WG [25]. In addition, AQPs 1, 3, and 8 could be considered the first-trimester AQPs and AQP9 and AQP11 as the second-trimester AQPs. This could be linked to some fetal changes occurring around midgestation (development of urinary concentration abilities or skin keratinization)

FIG. 3. *AQP1* transcript and protein expression levels in amnion and/or chorion throughout pregnancy. Quantitative RT-PCR was performed on total mRNA extracted from complete fetal membranes (amnion and chorion) (A and D), amnion (B), and chorion (C) at different stages of pregnancy. Protein was quantified after Western blot assay in total (membranous and cytosolic) protein extractions of amnion and chorion at the different weeks of pregnancy.



Expression levels of AQP1 transcripts and proteins were normalized with an *RPLP0* and a beta-actin ratio, respectively, defined as 1 for end of gestation (38 WG). Data shown are representative of duplicate experiments on three (first and second trimesters) and five (third trimester) independent tissues per gestational step. Bars give means \pm SD. $^{###}P < 0.001$ with all samples; $^{\ddagger}P < 0.05$ with all samples except 26 WG; $^{\S}P < 0.05$ with all samples except 10 WG; $^{\text{a}}P < 0.05$ with 38 WG; $^{\text{b}}P < 0.01$ with 12 WG; $^{\text{c}}P < 0.001$ with 12 WG.



that are also able to influence AF volume. The similar AQP patterns identified between mice and humans are likely related to their similarity in terms of hemochorial placentation [1]. There was a temporal shift between transcript and protein patterns during pregnancy for most of the AQPs studied. This difference could be explained by differential mechanisms occurring during the transcriptional and posttranslational steps in the lives of the AQPs [26]. By the additional identification of AQPs 1, 3, 9, and 11 in the WISH cell line, we have completed their definition in terms of water channel expression because only AQP8 expression has been reported to date [27]. The same AQPs (AQPs 1, 3, 8, 9, and 11) were detected in amnion at all studied stages of gestation and in this WISH cell line originally established from human amnion epithelial cells of normal-term pregnancy [28]. Therefore, WISH cells are a valuable resource for in vitro study of water channel regulation and the role of water channels in the transmembranous pathways of amniotic volume regulation throughout gestation.

Focusing on the five AQPs expressed in amniotic membranes, AQP1 presents the highest variation between the lowest and highest levels in terms of mRNA (92-fold) and protein (34-fold) expression. Human fetal membranes show the same spatiotemporal expression pattern as murine fetal membranes, with amniotic volume being inversely associated with AQP1 expression [4, 22]. Taken together, these arguments further support the important role of AQP1 in human amniotic membrane pathophysiology, even if other hypotheses based on kidney etiology could not be excluded. Indeed, AQP1 is the only AQP with a mouse knockout phenotype related to abnormal AF homeostasis. AQP1-null fetuses accumulate a greater volume of diluted AF than wild-type or heterozygous fetuses, without any compensatory expression of the other classic AQPs [29, 30]. For the first time, AQP11 is described herein as a member of the water channel family expressed in amniotic membranes throughout human gestation. AQP11 and AQP12 form the third AQP subgroup, named super-AQP [31], as AQP11 is reported to have low homology with AQPs 0 to 10 and an unusual sequence of the N-terminal Asn-Pro-Ala (NPA) motif. Indeed, instead of the NPA consensus sequence, AQP11 has an Asn-Pro-Cys sequence [32]. Its expression in amniotic membranes is the first developmental expression of AQP11. To date, AQP11 has been found in adult testis, kidney, liver, heart, muscle, and brain [32]. Little is known about intracellular AQP11, but its biological functions are thought to be related to endoplasmic reticulum [33]. Moreover, experiments by Yakata et al. [34, 35] assessed the variable water permeability of murine AQP11. AQP11-knockout mice developed polycystic kidney disease and died prematurely [36], and they may have intravesicular defects leading to the accumulation of several substances. Taken together, these observations suggest an important role for AQP11 in intravesicular homeostasis [31] and open up new perspectives on the role of AQP11 in fetal membranes during human gestation.

Expression levels of AQPs 1, 3, 8, and 9 were clearly modified in term amniotic membranes from patients with pathological AF volume and composition. These AQPs are increased in polyhydramnios [13], whereas their mRNA levels

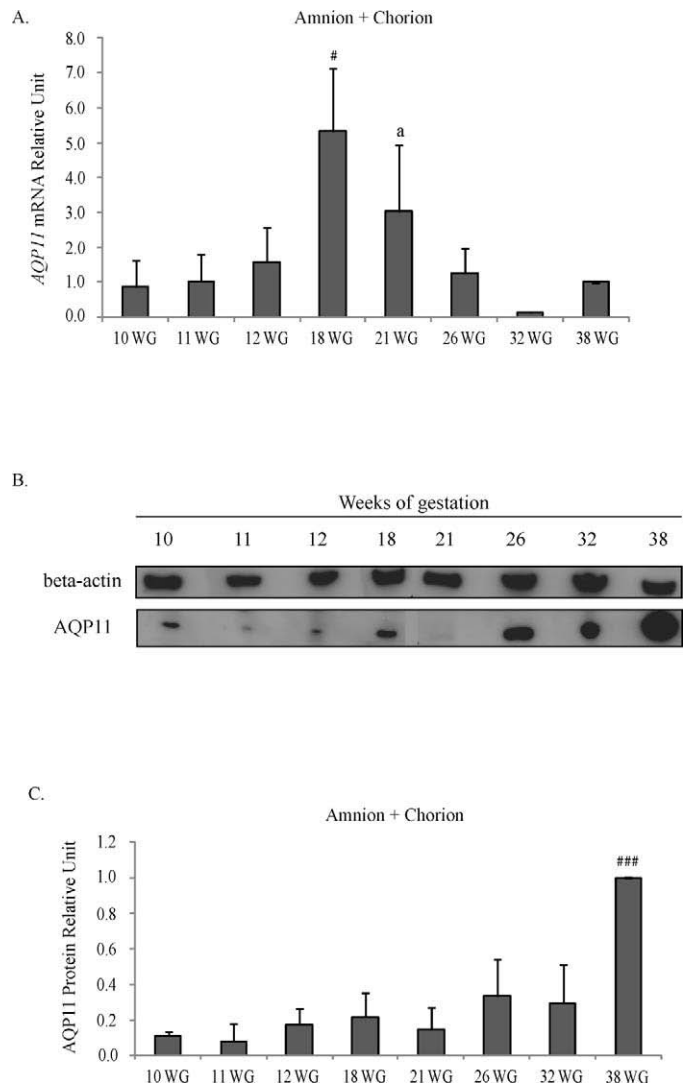


FIG. 5. AQP11 transcript and protein expression levels in human amniotic membranes throughout pregnancy. Quantitative RT-PCR was performed on total mRNA extracted from complete fetal membranes (amnion and chorion) at different stages of pregnancy. Protein was quantified after Western blot assay in total (membranous and cytosolic) protein extractions of amnion and chorion at the different weeks of pregnancy. Expression levels of AQP11 transcripts (A) and proteins (B and C) were normalized with an *RPLP0* and a beta-actin ratio, respectively, defined as 1 for end of gestation (38 WG). Data shown are representative of duplicate experiments on three (first and second trimesters) and five (third trimester) independent tissues per gestational step. Bars give means \pm SDs. ### P < 0.001 with all samples; # P < 0.05 with all samples; aP < 0.05 with 32 WG.

are decreased in oligohydramnios [37, 38]. By establishing the presence of these AQPs (plus AQP11) throughout human normal gestation, our study findings strongly suggest that obstetrical disorders based on these molecules could occur at

FIG. 4. Transcript and protein expression levels of AQPs 3, 8, and 9 in human amniotic membranes throughout pregnancy. Quantitative RT-PCR was performed on total mRNA from complete fetal membranes (amnion and chorion) at different stages of pregnancy. Protein was quantified after Western blot assay in total (membranous and cytosolic) protein extractions of amnion and chorion at the different weeks of pregnancy. Expression levels of transcripts (A, C, and E) and proteins (B, D, and F) of AQPs 3, 8, and 9 were normalized with an *RPLP0* and a beta-actin ratio, respectively, defined as 1 for end of gestation (38 WG). Data shown are representative of duplicate experiments on three (first and second trimesters) and five (third trimester) independent tissues per gestational step. Bars give means \pm SD. ### P < 0.001 with all samples; ** P < 0.01 with all samples; # P < 0.05 with all samples; aP < 0.05 with 11 WG; bP < 0.001 with 10 WG; cP < 0.01 with 10 WG; dP < 0.001 with 11 WG; eP < 0.01 with 12 WG; fP < 0.001 with 12 WG.

earlier stages of pregnancy than when an ultrasonography diagnosis may be made, thus highlighting their importance for diagnosis and subsequent therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Auvergne Traduction Technique (ATT) Society for proofreading the manuscript for English language.

REFERENCES

- Sapin V, Blanchon L, Serre AF, Lemery D, Dastugue B, Ward SJ. Use of transgenic mice model for understanding the placentation: towards clinical applications in human obstetrical pathologies? *Transgenic Res* 2001; 10:377–398.
- Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40:280–289.
- Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol* 2008; 32:288–294.
- Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG. Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta* 2007; 28:824–832.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: the hourglass model. *J Biol Chem* 1994; 269:14648–14654.
- Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, Engel A. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 1997; 387:624–627.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; 407:599–605.
- Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 2002; 82:205–244.
- Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells: requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* 2002; 277:39873–39879.
- Preston GM, 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; 88:11110–11114.
- King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:687–698.
- Verkman AS. Physiological importance of aquaporin water channels. *Ann Med* 2002; 34:192–200.
- Damiano AE. Review: water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2011; 32(suppl 2):S207–S211.
- Borel V, Marceau G, Gallot D, Blanchon L, Sapin V. Retinoids regulate human amniotic tissue-type plasminogen activator gene by a two-step mechanism. *J Cell Mol Med* 2010; 14(6B):1793–1805.
- Mittal P, Romero R, Mazaki-Tovi S, Tromp G, Tarca AL, Kim YM, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Erez O, Than NG, Hassan SS. Fetal membranes as an interface between inflammation and metabolism: increased aquaporin 9 expression in the presence of spontaneous labor at term and chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22:1167–1175.
- Blanchon L, Nores R, Gallot D, Marceau G, Borel V, Yang VW, Bocco JL, Lemery D, Panzetta-Dutari G, Sapin V. Activation of the human pregnancy-specific glycoprotein PSG-5 promoter by KLF4 and Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343:745–753.
- Marceau G, Gallot D, Borel V, Lemery D, Dastugue B, Dechelotte P, Sapin V. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:1207–1216.
- Liu H, Zheng Z, Wintour EM. Aquaporins and fetal fluid balance. *Placenta* 2008; 29:840–847.
- Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita Y. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300:R566–R576.
- Gilbert WM, Brace RA. The missing link in amniotic fluid volume regulation: intramembranous absorption. *Obstet Gynecol* 1989; 74:748–754.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 2008; 456:693–700.
- Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta* 2007; 28:421–428.
- Johnston H, Koukoulas I, Jeyaseelan K, Armugam A, Earnest L, Baird R, Dawson N, Ferraro T, Wintour EM. Ontogeny of aquaporins 1 and 3 in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 2000; 21:88–99.
- Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40:289–282.
- Wang S, Chen J, Beall M, Zhou W, Ross MG. Expression of aquaporin 9 in human chorioamniotic membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:2160–2167.
- Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P, Kienle MG. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics* 2006; 6:5637–5649.
- Wang S, Chen J, Au KT, Ross MG. Expression of aquaporin 8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:997–1001.
- Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp Cell Res* 1961; 23:14–20.
- Mann SE, Ricke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:2041–2046.
- Verkman AS. Role of aquaporin water channels in kidney and lung. *Am J Med Sci* 1998; 316:310–320.
- Ishibashi K. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:989–993.
- Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* 2006; 7:
- Ikeda M, Andoo A, Shimono M, Takamatsu N, Taki A, Muta K, Matsushita W, Uechi T, Matsuzaki T, Kenmochi N, Takata K, Sasaki S, et al. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J Biol Chem* 2011; 286:3342–3350.
- Yakata K, Hiroaki Y, Ishibashi K, Sohara E, Sasaki S, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:688–693.
- Yakata K, Tani K, Fujiyoshi Y. Water permeability and characterization of aquaporin-11. *J Struct Biol* 2011; 174:315–320.
- Okada S, Misaka T, Tanaka Y, Matsumoto I, Ishibashi K, Sasaki S, Abe K. Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *FASEB J* 2008; 22:3672–3684.
- Hao RZ, Liu HS, Xiong ZF. Expression of aquaporin-1 in human oligohydramnios placenta and fetal membranes [in Chinese]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009; 29:1130–1132.
- Shioji M, Fukuda H, Kanzaki T, Wasada K, Kanagawa T, Shimoya K, Mu J, Sugimoto Y, Murata Y. Reduction of aquaporin-8 on fetal membranes under oligohydramnios in mice lacking prostaglandin F2 alpha receptor. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32:373–378.

Publication n°2

« All-trans-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment »

C. Prat, D. Bouvier, A. Comptour, G. Marceau, C. Belville, G. Clairefond, P. Blanc, D. Gallot, L. Blanchon, V. Sapin

Placenta, 2015, 36(8), 881-7.

La régulation du volume de liquide amniotique au cours de la grossesse est basée sur un équilibre entre la production et la résorption de ce fluide. Une majeure partie des activités de production et de résorption du LA sont assurées par le fœtus, toutefois, deux voies essentielles de résorption sont assurées par le placenta et les membranes fœtales. Dans ce travail, notre attention s'est tout particulièrement orientée vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation du flux intra-membranaire (au travers des membranes fœtales). Ce mécanisme nécessite la présence d'acteurs macromoléculaires tels que les aquaporines, protéines canaux transmembranaires favorisant le passage d'eau par diffusion facilitée au travers des membranes cellulaires. Nous avons vu dans la publication présentée précédemment que les AQP3, 8, 9 et 11 sont exprimées dans les membranes fœtales tout au long de la grossesse à des niveaux variables dépendant du stade gestationnel et du feuillet membranaire considérés.

Ces résultats suggèrent la nécessité d'une régulation fine des aquaporines au cours de la grossesse, dans le but de maintenir l'équilibre physiologique production/résorption de LA. Comme décrit par l'équipe de recherche (142), la transcription des gènes codant les aquaporines est potentiellement régulée par les rétinoïdes dans les membranes fœtales humaines. Nous nous sommes donc intéressé, dans ce travail, à l'implication des rétinoïdes dans la transcription du gène de l'AQP3, seule aquaporine, dont l'expression est retrouvée modulée lors d'un traitement des amniocytes par l'acide rétinoïque lors d'un crible réalisé sur les 5 AQP3 exprimées au sein des membranes fœtales.

Nous avons démontré dans la publication n°1 que l'AQP3 était exprimée dans les membranes fœtales à terme. Ici, nous avons basé notre étude sur un modèle cellulaire de l'épithélium amniotique, les cellules FL (155). Nous avons donc établi que des transcrits du gène codant l'AQP3 étaient présents *in vivo* dans l'amnion, *ex vivo* dans des cellules primaires d'amniocytes (cellules épithéliales amniotiques) et *in vitro* dans notre modèle cellulaire, les

cellules FL. Dans un second temps, nous avons étudié la régulation de la transcription du gène de l'AQP3 en présence de rétinoïdes. Il a donc été nécessaire d'utiliser, lors de cette expérience, un dérivé métabolique des rétinoïdes ciblant uniquement RAR comme partenaire d'hétérodimérisation de RXR : l'acide rétinoïque *tout-trans* (ARtt). Des expériences de qRT-PCR nous ont permis de démontrer que l'expression du gène codant l'AQP3 était régulée par l'ARtt dans les amniocytes primaires et dans les cellules FL en culture. Par ailleurs, les récepteurs nucléaires RARs présentent trois isoformes : RAR α , β , γ . L'utilisation d'un agoniste sélectif de RAR α , l'Am580, nous a permis de montrer que la transactivation du gène de l'AQP3 dans les cellules amniotiques humaines fait intervenir le récepteur RAR α . Des expériences de transfection transitoires ont ensuite mis en évidence les séquences promotrices impliquées dans la transactivation de l'AQP3 par l'ARtt. Enfin, des expériences d'immunohistochimie et de western blot ont démontré que cette transactivation modulait la quantité de protéines accumulées dans les cellules épithéliales amniotiques. Nous avons donc vérifié que cette augmentation était corrélée à une hausse de leur activité fonctionnelle. L'AQP3 étant une aquaglycéroporine, des tests de transfert de glycérol tritié ont été réalisés *in vitro* sur des cellules FL en culture et *ex vivo* sur des explants d'amnion humain.

En conclusion, ces données nous permettent de montrer que l'expression du gène de l'AQP3 est régulée positivement dans les cellules épithéliales amniotiques en présence d'ARtt par l'intermédiaire du récepteur nucléaire RAR α et d'éléments de réponse aux rétinoïdes de type DR5. Une modulation de l'expression de l'AQP3 par l'ARtt dans l'amnion pourrait donc potentiellement être impliquée dans le maintien de l'homéostasie du liquide amniotique et la régulation fine de son volume au cours de la grossesse.



Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

All-*trans*-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment

C. Prat^a, D. Bouvier^{a, b}, A. Comptour^a, G. Marceau^{a, b}, C. Belville^{a, c}, G. Clairefond^a, P. Blanc^{a, b}, D. Gallot^{a, d}, L. Blanchon^a, V. Sapin^{a, b, *}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 – Retinoids, Reproduction Developmental Diseases, School of Medicine, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c Clermont Université, Université d'Auvergne, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^d CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 May 2015

Keywords:

Fetal membranes
Aquaporins
Amniotic fluid
Retinoic acid

ABSTRACT

Introduction: The aquaporins (AQP1, 3, 8, 9 and 11) are known to be expressed, and involved in the transport of water and small molecules through fetal membranes. To exert these crucial functions, these AQPs have to be finely regulated. All-*trans*-retinoic acid (atRA) was previously found to regulate some genes in this environment, raising the question of whether these AQPs were regulated by atRA.

Methods: Explants, and primary and established amniotic cells were cultured to determine which AQP were transcriptionally modified by atRA, using the qRT-PCR strategy. Immunohistochemistry and glycerol uptake tests were used to determine the impact of atRA on AQP protein expression and function. Specific agonists of retinoic acid receptors were used to identify the molecular mechanisms of AQP promoter activation. A classical gene AQP promoter study was also used to identify DR5 retinoic acid receptor elements (RAREs).

Results: Beyond these AQPs, only one specific atRA-dependent increase in AQP3 transcripts and proteins level was established in amnion (not in chorion) and in related primary and established cells. We found three DR5-RAREs essential for inducing this transcriptional AQP3 through RAR α . This transactivation of the AQP3 coding gene was functionally related to an increase of AQP3 permeability tests by a glycerol uptake assay.

Discussion: Our data support an atRA regulatory model of AQP3 expression leading to an increased cellular permeability in the epithelial amniotic environment. We cast new light on AF regulation in healthy pregnancy, and advance new hypotheses for obstetrical complications linked to impairment of the retinoic signaling pathway.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During pregnancy, the amniotic cavity containing amniotic fluid (AF) is bounded by extra-embryonic structures (placenta and fetal membranes). Fetal membranes are well-established structures composed of the inner amnion lining the amniotic cavity and the outer chorion underlying the maternal decidua. The amnion

comprises a single layer of epithelial cells surrounded by connective tissue stroma. These membranes exert numerous functions, and their integrity is fundamental for normal gestation in mammals. According to its development and growth, the fetus produces a varying volume of amniotic fluid throughout pregnancy [1]. The regulation of AF homeostasis is essential for harmonious embryonic and fetal development. At the end of pregnancy, up to 400 ml/day are transferred from the amniotic cavity into fetal circulation. Abnormal transfer of AF may result in oligohydramnios (too little AF) or polyhydramnios (too much AF). These obstetrical pathologies are known to be associated with fetal abnormalities or significantly increased perinatal mortality and morbidity [2]. Previous work clearly suggests that the fetal membranes, through their

* Corresponding author. Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 Place Henri-Dunant, BP38, F-63001 Clermont-Ferrand Cedex, France. Tel.: +33 47 317 8174; fax: +33 47 327 6132.

E-mail address: vincent.sapin@udamail.fr (V. Sapin).

localization around the amniotic cavity, are involved in the regulation of AF volume and transfer [3]. This transmembrane flow requires the presence and regulation of macromolecular actors, e.g. aquaporins, previously identified as good candidates for participation in the modulation of AF volume [4,5]. The aquaporins are a family of 13 transmembrane water channel glycoproteins facilitating water flux across cellular membranes [6]. AQP3s increase cell plasma membrane water permeability 5- to 50-fold compared with membranes in which water is moving primarily through the lipid bilayer. A specific subgroup of AQP3s (AQP3, 7, 9 and 10), named aquaglyceroporins, is also permeable to other entities, such as urea and glycerol. Among the 13 AQP3s described to date in mammals (AQP0 to AQP12), only the mRNAs and proteins of AQP1, 3, 8, 9 and 11 were present in amnion and chorion throughout human gestation. Each of these 5 AQP3s has a time-specific expression pattern, suggesting their coordinated expressions and functions [7]. To act as a precise modulator of the transmembrane resorption flow, these 5 aquaporins have to be finely regulated in terms of expression and/or functions. Several factors are thought to modulate aquaporin expression in placental and fetal membranes [8], e.g. some members of the nuclear receptor (transcription factor) superfamily. One of these nuclear signaling pathways, the retinoic acid, has already been reported to regulate AQP1, 3, 5 and 9 in other cellular and tissue environments, but never in the fetal membranes [9–11]. All-*trans*-retinoic acid (an active vitamin A derivative) is a key morphogen during embryonic development, as demonstrated by the fetal malformation induced by vitamin A deficiency and the teratogenic effects of an excess of vitamin A [12,13]. Harmonious placental and amniotic membrane development and functions are also dependent on vitamin A [14–16]. All-*trans*-retinoic acid (atRA) plays an important role in the regulation of target genes by binding one family of nuclear receptors, named retinoic acid receptors (RAR α , β , γ) heterodimerized with the retinoid X receptor (RXR α , β , γ), connecting DNA retinoic acid response elements (RAREs) located on promoters of target genes [17,18]. In human amniotic membranes, this atRA signaling pathway has already been shown to be present and functional by regulating some target genes [15]. All these points raise the question of whether aquaporin is regulated by atRA in the fetal membrane environment. To address this question, human amnion explants, primary epithelial amniotic cells and FL cell line were used to study the transcriptional, translational and functional regulation of AQP3s by atRA.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All-*trans*-retinoic acid, trypsin, dimethyl sulfoxide (DMSO), cycloheximide, and HgCl₂ were purchased from Sigma–Aldrich (Lyon, France). Am580 RAR α selective agonist and CD437 RAR γ selective agonist were obtained from Tocris Bioscience (R&D, Lille, France). Culture medium and additives (streptomycin and penicillin) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Dextran-coated charcoal-stripped fetal calf serum (FCS) and the transfection reagent nanofectin were obtained from PAA (Velizy-Villacoublay, France). Radiolabeled glycerol [2-³H] was purchased from American Radiolabeled Chemicals Inc. (Saint Louis, MO, USA). BAC of chromosome 9 (RP11-311H10) containing AQP3 gene was acquired from Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, NY, USA).

2.2. Tissue collections

At-term healthy fetal membranes (n = 13) were collected after informed consent was given. The research protocol was approved by the regional institutional ethics committee. Membranes were collected from pregnancies after cesarean births (Obstetrics Department, Estaing University Hospital, Clermont-Ferrand, France). Each collected membrane was obtained from a pregnancy occurring with appropriate amniotic fluid (AF) volume. For all the collected fetal membranes, AFs contained no meconium, and the placentas were macroscopically and microscopically normal. Histological examination (performed on all the fetal membranes included in the study) demonstrated no cases of chorio-amnionitis, previously reported to induce pathological modifications of AQP expression levels [19]. Before cell and

tissue cultures, the fetal membranes were washed with sterile phosphate buffer saline (PBS) to remove contaminating blood.

2.3. Cell and tissue cultures

Explants of total fetal membranes, isolated amnion and chorion were prepared by cutting several 1 cm² pieces from human term fetal membranes just before incubation. Primary amniotic cell isolation was conducted as previously described. The primary culture cells were identified as amniotic epithelial cells by both morphology and antibody staining of cytological markers [14,20]. Isolated primary amniocytes, chorion and amnion explants were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% dextran-coated charcoal-stripped FCS, 50 mg/ml streptomycin, and 50 IU/ml penicillin. A human amnion-derived FL epithelial cell line [21] (ATCC) (LGC, Molsheim, France) was cultured using ATCC recommendations in modified Eagle medium (MEM) with Earl's salts supplemented with dextran-charcoal stripped FCS, 50 mg/ml streptomycin, and 50 IU/ml penicillin. FL cell line, primary amniotic cell, chorion and amnion explant cultures were all conducted under standard conditions (5% CO₂, 95% humidified air, 37 °C). Cells and explants were treated with all-*trans* retinoic acid (10⁻⁶ M, the classically concentration used in literature to study its molecular action), specific agonist of RAR α and RAR γ (Am580 and CD437, respectively; 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M) or vehicle (DMSO) in equal quantity for 6, 12, 24 and/or 48 h.

2.4. Quantitative RT-PCR experiments

Total RNA was extracted from human total amnion and cell cultures using an RNeasyMini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). RNA was quantified by spectrometry at 260 nm and 280 nm (ratio with proteins). The cDNA was synthesized from 3 μ g of RNA using a SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Fisher Scientific, Illkirch, France). The primer sequences used were generated using the Web program Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center) based on the published full-length human mRNA sequences and designed to avoid genomic DNA amplification, as previously described and used [7,14]. Quantitative RT-PCR reactions were performed using Power SYBR Green Master Mix on a Light Cycler 480 (Roche, Meylan, France). Transcripts were quantified independently three times on three independent experiments, using the geometric mean of three housekeeping genes (RPLP0, 18S rRNA and β -actin). All the steps followed the MIQE guidelines [22].

2.5. AQP3 Western blotting

Total proteins were extracted with a plasma membrane protein extraction kit (BioVision, Clinisciences, Nanterre) on harvested cells or after tissue dispersion in a T10 basic homogenizer workcenter (IKA, Staufen, Germany). Western blot assays were performed as previously described [7]. Briefly, after migration of denatured proteins in SDS-PAGE and electrotransfer, membranes were saturated for 1 h in a blocking solution, and then incubated overnight with goat anti-AQP3 antibody (C-18, sc-9885, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1/100 in blocking solution. Peroxidase-conjugated secondary IgG antibodies were hybridized and visualized using an ECL Plus kit (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). All the experiments were performed in triplicate. The results are presented as the ratio of the quantities of the protein of interest (AQP3) to that of the housekeeping protein β -actin on the same blot relative to vehicle (DMSO).

2.6. AQP3 immunohistochemistry experiments

Immunohistochemistry experiments were performed on cryosections (8 μ m) as previously described [14]. Tissue slides were fixed in paraformaldehyde (4% in PBS) and incubated overnight with goat anti-AQP3 diluted 1/200 in TBS. Secondary antibody donkey anti-goat coupled with cyanine 3 was incubated for 2 h on slides. The samples were examined after Hoechst nuclear staining under a Zeiss confocal microscope. For negative controls, sections were incubated without primary antibody.

2.7. Plasmid constructions

For AQP3 promoter analysis, the different constructs (2.2d5-6-pAQP3-pGL3e, 1.5d5-pAQP3-pGL3e, 2.9d4-pAQP3-pGL3e and 2d1-2-3-pAQP3-pGL3e) were obtained using PCR amplifications from BAC RP11-311H10 (containing chromosome 9) cloned into the pGL3 enhancer vector (pGL3e; Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The mutagenesis of DR5 sites into 2d1-2-3-pAQP3-pGL3e constructs was carried out by PCR (Table 1). All the constructions were verified by DNA sequencing (GATC, Konstanz, Germany). Co-transfection of the pCH110 vector containing the β -galactosidase gene allowed the normalization of the transfection efficiency.

2.8. Transfection of FL cells

Amnion-derived FL epithelial cells were placed in 6-well plates after trypsinization for 24 h before transfection. A total of 3.10⁵ cells were transiently transfected using nanofectin reagent (PAA, Velizy-Villacoublay, France) with 1.45 μ g of different AQP3-reporter plasmid constructs and 0.25 μ g of pCH110 β -galactosidase vector. After overnight incubation, cells were treated for 6, 12, 24 or 48 h with atRA (10⁻⁵,

Table 1
Sequences of synthetic oligonucleotides used for AQP3 promoter analysis and directed mutagenesis.

Human gene	Sequence (5'–3')	Product size (pb)
AQP0-S	GAGGAAACCTAGCACTCAA	196
AQP0-AS	TAATACATCCCAAGAGGTTG	
AQP1-S	ATCACCTCCTCCCTGACT	224
AQP1-AS	CAGCCAGTGTAGTCAATAGC	
AQP2-S	CTCTCCATAGGCTTCTCT	189
AQP2-AS	ACAGCACGTACTTGTAGAGG	
AQP3-S	GAATAGTTTTGGGCTGTATT	151
AQP3-AS	CCTATGAACCTGGTCAAAGAA	
AQP4-S	GGAATCCTCTATCTGGTCA	184
AQP4-AS	CTAAAGCTATTGAGCCAGTG	
AQP5-S	ACCTTGTCCGAATCTACTTC	159
AQP5-AS	AGAGCAGGTAGAAGTAAAGGA	
AQP6-S	TAGGCTCCCATCTCTC	154
AQP6-AS	CCAGTTGAGACACTGTTCC	
AQP7-S	ATAGCAAAGATCCAGGAAAT	243
AQP7-AS	ACAGTTAGCAAAGGTCACAG	
AQP8-S	GGTGCCATCAATGAGAAGAC	238
AQP8-AS	GTCTTCCATCTCCAATGAA	
AQP9-S	CGTCTTGCCATCTTTGACT	223
AQP9-AS	CCACTACAGGAATCCACCAG	
AQP10-S	AGTTTCTGGGTGTTTGTGA	243
AQP10-AS	ACTGCACCAAGATGTAATG	
AQP11-S	CATCACCTTTTGGTCTATG	175
AQP11-AS	GAAAAAGCTGAACATCAAAA	
AQP12-S	CTTTTGTTCATCTGACC	185
AQP12-AS	CGTACTCCAGTAAGGTGTGT	

Prat et al., 2015.

10^{-6} or 10^{-7} M), Am580 (RAR α specific agonist) (10^{-5} , 10^{-6} or 10^{-7} M) or with vehicle (DMSO) in equivalent quantity. At each different treatment time, cells were harvested and lyzed before performing luciferase (Roche, Meylan, France) and β -galactosidase assays (Agilent, Massy, France) according to the manufacturer's protocols.

2.9. Glycerol uptake

FL cells and amnion explants were cultured as previously described with atRA (10^{-6} M) or vehicle (DMSO) for 48 h and 72 h. When the treatment time had elapsed, supernatant medium was recovered to quantify lactic acid dehydrogenase (LDH) as a control of cell viability. FL cells and amnion explants were then washed with fresh PBS (three times for 5 min each) and exposed for 5 min with/without 0.3 mM HgCl₂ (to block AQPs). Cells and explants were washed with PBS (three times for 5 min each), incubated with 1 μ Ci [²⁻³H]-glycerol or 1.5 μ M glycerol for 5 min and washed again with PBS (three times for 5 min each). FL cells were lyzed by 1 h incubation in 0.3 N NaOH. Amnion explants were lyzed overnight in 0.3 N NaOH [9]. Radioactivity was revealed by adding 5 mL of scintillation product (Filtron-X, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) and counted on a scintillation counter. In parallel, proteins of control samples (without radioactivity) were quantified (Vista Siemens, according to the manufacturer's protocol) to verify that there was the same proportion of proteins in each well. Results are expressed as the ratio [²⁻³H]-glycerol (DPM)/grams of proteins, related to the vehicle in the corresponding condition.

2.10. Statistical analysis

Results were analyzed using the GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data expressed as median and interquartile range are average of independent experiments since they showed abnormal distribution by Shapiro–Wilk test. Comparisons between different conditions were performed by Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis tests. Values were considered significantly different at $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$ throughout.

3. Results

3.1. AQP3 is the only AQP modulated by atRA in fetal membranes

After 24 h and 48 h of 10^{-6} M atRA treatment of total fetal membranes, a first global transcript screen established only one AQP3 presenting a transcriptional increase, unlike AQP1, 8, 9 and 11, also expressed basically in fetal membranes [7] (data not shown). The other AQPs (AQP0, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 12), not found in fetal membranes before incubation, were still absent after this atRA

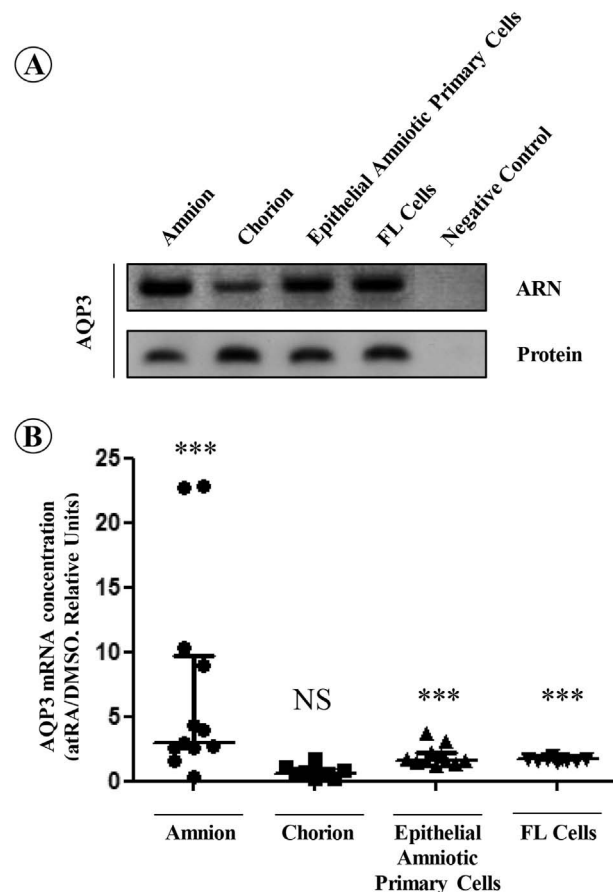


Fig. 1. AQP3 mRNA expression and transactivation by atRA in human amnion, and epithelial amniotic cultured cells at term. **A.** Upper panel: First-strand cDNA prepared from amnion, chorion, epithelial amniotic primary cells and FL cells were used to amplify AQP3 mRNA. The observed RT-PCR product matched the expected size (151 bp) and presented the expected sequence. The PCR-negative control lane was performed without cDNA. Lower panel: Total (membranous and cytosolic) proteins extracted from amnion, chorion, epithelial amniotic primary cells and FL cells were separated by Western blot assays, and AQP3 was found at the expected size (36 kDa) using anti-AQP3 antibody. **B.** Human amnion and chorion explants, primary epithelial amniotic cells and FL cells were exposed to 10^{-6} M of atRA or vehicle (DMSO) for 24 h. RNA was extracted and retro-transcribed into cDNA, and then subjected to q-RT-PCR for AQP3 transcript quantification. Results of AQP3 mRNA level were normalized with the geometric mean of three housekeeping genes (RPLP0, 18S rRNA and β -actin), and expressed as relative units of induction compared with vehicle (DMSO). Data reported are representative of four independent experiments (four different membranes), each performed in triplicate. *** $p < 0.001$; NS: not significant. Prat et al., PL-15-00027-R1.

treatment, demonstrating a specific induction of AQP3 by atRA in human fetal membranes. To focus the study on the atRA transcription of AQP3 in human fetal membranes, we first precisely analyzed its expression pattern in this amniotic environment. RT-PCR and Western blot assays demonstrated the expression of AQP3 mRNA (at the expected size of 151 pb; upper panel) and protein (at the expected size of 36 kDa; lower panel) in human amnion, chorion, primary epithelial amniotic cells and FL cell line (Fig. 1A).

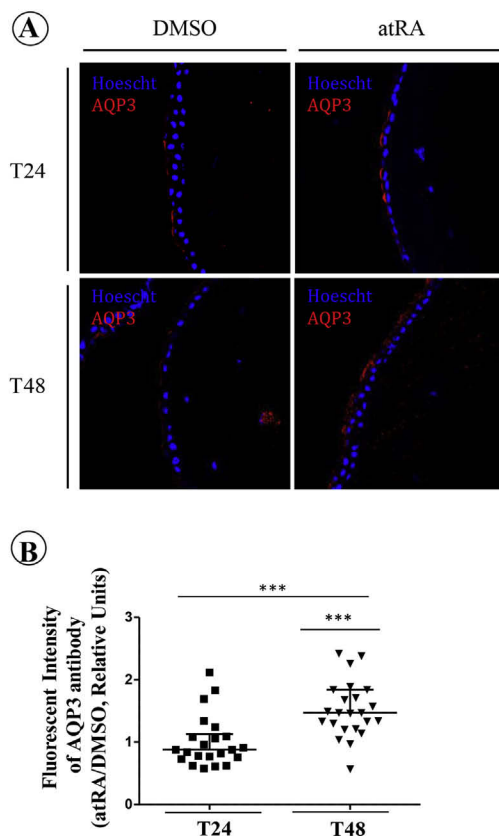
3.2. AQP3 is transactivated by atRA in human amnion, primary amniotic cells and FL cells

To determine the implication of all-trans-retinoic acid on the regulation of AQP3 expression, human amnion, chorion, primary epithelial amniotic and FL cells were exposed to 10^{-6} M atRA for

24 h. These experiments revealed a significant up-regulation of AQP3 in the presence of atRA at 24 h in human amnion, but not in human chorion. In this way, the same exposure to 10^{-6} M atRA for 24 h led to a transactivation of the AQP3 coding gene in amniotic cells (primary amniotic epithelial cells and established FL cells) (Fig. 1B). Co-treatment with atRA and cycloheximide (protein synthesis blocker) did not lead to any difference from atRA treatment, indicating a direct transcription regulation of AQP3 by all-*trans* retinoic acid. Indeed, fold inductions were 1.91 and 1.89 ($p = 0.57$) in primary amniocytes, and 1.95 and 1.87 ($p = 0.63$) in FL cells for atRA and atRA plus cycloheximide respectively.

3.3. Induction of AQP3 transcript and protein expression by atRA increases glycerol uptake in amnion and amniotic cells

To determine whether AQP3 transactivation led to an accumulation of the corresponding protein, immunohistochemistry experiments were performed on cryosections of human amnion explants previously incubated with 10^{-6} M atRA or vehicle (DMSO, equivalent quantity) for 24 h and 48 h (Fig. 2A). The quantification of AQP3 fluorescent intensity revealed an accumulation of this protein that became significant after 48 h of treatment (Fig. 2B).



To check whether the increase in AQP3 production was associated with an increase in cellular and membrane transfer, we conducted AQP3 functional assays. As AQP3 belongs to the subgroup of glycerol-permeable channels, we investigated the effect of atRA on glycerol uptake. For this purpose, FL cells and human amnion explants were treated with 10^{-6} M atRA for 48 h and then exposed to HgCl_2 (permease blocker) and $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$. Results against unexposed controls showed a significant uptake of glycerol after 48 h of atRA incubation for both FL cells (Fig. 2C) and human amnion explants (Fig. 2D).

3.4. Effect of atRA on AQP3 coding gene expression specifically involves $\text{RAR}\alpha$

As a first step in elucidating the molecular mechanisms of AQP3 transactivation by atRA, we analyzed its expression level at different times of atRA induction using amniotic FL cell line, established as a good amniotic cellular model by our data obtained upstream. FL cells were exposed to 10^{-6} M of atRA for 6, 12, 24, 48 h and collected at each incubation time before RNA extraction. These experiments revealed a significant, early up-regulation of the AQP3 transcript coding gene in the presence of atRA in comparison with vehicle from 6 h to 48 h (Fig. 3A).

Fig. 2. Up-regulation of AQP3 protein expression in amnion and of glycerol uptake in human amnion explants and FL cells by atRA. *Left panel:* (A) AQP3 immunohistochemistry (red staining) was performed on human amnion explants treated with atRA or vehicle (DMSO) for 24 h and 48 h. Cell nuclei were visualized by Hoescht (blue) staining. Original magnification was $\times 400$. (B) AQP3 protein accumulation was quantified immunohistochemically by measuring AQP3 fluorescent intensity. Results were expressed as fold induction relative to vehicle (DMSO). Data reported are representative of six independent experiments (six different membranes), each performed in quadruplet. $***p < 0.001$. *Right panel:* FL cells (C) and human amnion explants (D) were exposed to 10^{-6} M of atRA or vehicle (DMSO) for 48 h. Cultures were then treated or untreated with 0.3 mM HgCl_2 and then exposed to 1 μCi of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$ or 1.5 μM glycerol for 5 min. Lysates of radioactive samples were counted with a scintillation counter, and cold protein lysate samples were quantified. ^3H -Glycerol quantification levels were normalized with corresponding total protein quantifications. Results were expressed as fold induction relative to vehicle (DMSO). Data reported are representative of three independent experiments (three different membranes and three independent cultures), each performed in duplicate. $**p < 0.01$. Prat et al., PL-15-00027-R1.

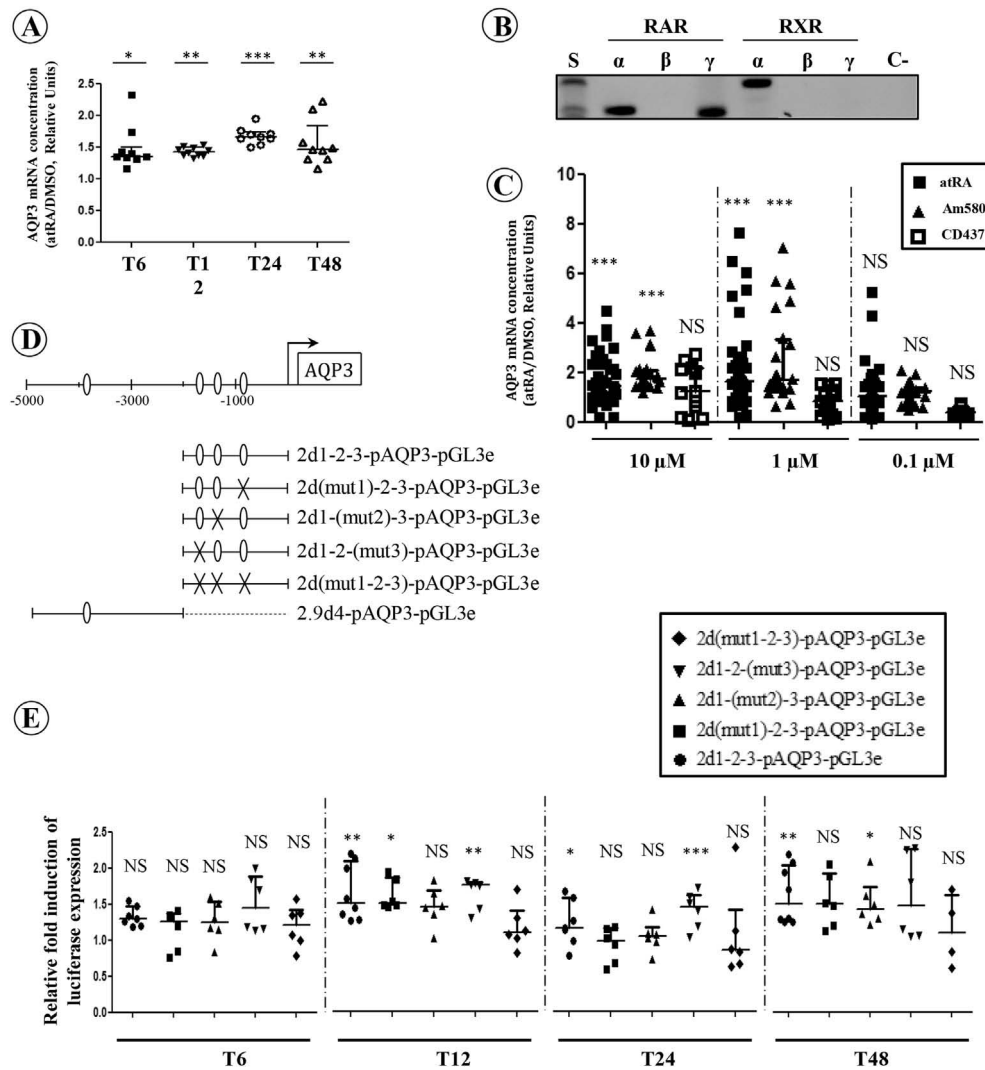


Fig. 3. Involvement of RAR α and requirement of three DR5 response elements for up-regulation of AQP3 mRNA. A. FL cells were treated with 10^{-6} M atRA or vehicle (DMSO) for 6, 12, 24 and 48 h. RNA was extracted and retro-transcribed into cDNA, and then subjected to q-RT-PCR for AQP3 transcript quantification. Results of AQP3 mRNA level were normalized with the geometric mean of three housekeeping genes (RPLP0, 18S rRNA and β -actin) and expressed as relative units of induction compared with vehicle (DMSO). Data reported are representative of three independent experiments, each performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B. RAR α , β , γ and RXR α , β , γ mRNA were amplified from first-strand cDNA prepared from FL cells. The observed RT-PCR products matched the expected size, and their nucleotide sequence was verified (RAR α : 225 bp, RAR γ : 212 bp, RXR α : 286 bp). S, molecular weight scale; C-, negative control. The PCR-negative control lane was performed without cDNA. C. FL cells were exposed to 10^{-7} M, 10^{-6} M or 10^{-5} M atRA, Am580 (RAR α specific agonist), CD437 (RAR γ specific agonist) or vehicle (DMSO) for 24 h. cDNA resulting from retro-transcription of extracted RNA were subjected to q-RT-PCR for AQP3. Results of AQP3 mRNA level were normalized with the geometric mean of three housekeeping genes (RPLP0, 18S rRNA and β -actin), and expressed as relative units of induction compared with vehicle (DMSO). Data reported are representative of six independent experiments, each performed in triplicate. *** $p < 0.001$; NS: not significant. D. Schematic representation of different constructs of the AQP3 gene promoter containing DR5 response elements (open circles). The precise locations of the 4 DR5 RAREs are: -812/-829 bp, -1349/-1366 bp, -1630/-1647 and -3815/-3832 bp. E. FL cells were transiently transfected with wild-type and mutant constructs of AQP3 gene promoter [2d1-2-3-pAQP3-pGL3e, 2d(mut1)-2-3-pAQP3-pGL3e, 2d1-(mut2)-3-pAQP3-pGL3e, 2d1-2-(mut3)-pAQP3-pGL3e] and then exposed to 10^{-6} M atRA for 6, 12, 24 and 48 h. Results are expressed as fold induction relative to the control (DMSO) treatment sample. Data reported are representative of three independent experiments, each performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS: not significant. Prat et al., PL-15-00027-R1.

To determine which retinoid receptors could be involved in this transactivation of AQP3 by atRA, we first checked the expression pattern of RAR and RXR isoforms in FL cells using RT-PCR. Results show that only RAR α , RAR γ and RXR α were expressed in FL cells (Fig. 3B), as previously described in human amnion [14]. FL cells were then treated with 10^{-7} M, 10^{-6} M or 10^{-5} M of atRA, RAR α specific agonist (Am580) or RAR γ specific agonist (CD437) for 24 h. All these experiments show that AQP3 transcripts followed the same pattern of expression when atRA and Am580 stimulations were compared. The concentrations of these up-regulated transcripts were significantly different from the vehicle when 10^{-6} M and 10^{-5} M of atRA or Am580 were applied (Fig. 3C). By contrast,

treatment of FL cells with CD437 did not lead to transactivation of the AQP3 coding gene, resulting in no significant difference with the vehicle (DMSO) (Fig. 3C).

3.5. Effect of atRA on AQP3 coding gene expression involves RAREs of the AQP3 promoter

To identify the regulator sequences involved in the transactivation of the AQP3 coding gene by atRA, we performed an *in silico* screen of the RARE sequences present in the promoter of our target gene. This screen was done with Genomatix[®] software and highlighted four potential DR5 RAREs located between -5000

and +1 base pairs of the AQP3 promoter: –812/–829 bp, –1349/–1366 bp, –1630/–1647 bp and –3815/–3832 bp (Fig. 3D). To analyze their involvement in the AQP3 promoter activity, transient transfection assays were carried out using the different plasmid constructs. Transfection experiments with the 2.9d4-pAQP3-pGL3e construct containing a single DR5 RARE (–3815/–3832 bp) showed no effect on luciferase expression, evidence that this sequence is not involved in the atRA-dependent regulation of AQP3 expression (data not shown). By contrast, transient transfections of the 2d1-2-3-pAQP3-pGL3e construct drove significant induction of reporter gene expression at 12, 24 and 48 h of incubation in response to atRA (Fig. 3E). To determine which one of the three DR5 RAREs was involved in this transactivation, directed mutagenesis was performed on 2d1-2-3-pAQP3-pGL3e construct (Fig. 3D). Transient transfections of single mutant constructs [2d(mut1)-2-3-pAQP3-pGL3e, 2d1-(mut2)-3-pAQP3-pGL3e and 2d1-2-(mut3)-pAQP3-pGL3] revealed time-specific induction of luciferase expression at 12, 24 and 48 h of incubation in response to atRA, whereas the combination of the three mutations [2d(mut1-2-3)-pAQP3-pGL3e] abolished the effect on reporter gene expression at each tested time (Fig. 3E). All these data confirm an involvement of each DR5 located between –2000 bp and +1 bp on AQP3 promoter.

4. Discussion

Throughout pregnancy, the regulation of AF volume relies on a balance between the production and resorption of this fluid. It has already been shown that fetal membranes and aquaporins take part in this regulation [3–6]. In this study, we investigated the regulation of these glycoprotein water channels by all-*trans*-retinoic acid in human fetal membranes. We demonstrate that the specific atRA transactivation of a single aquaporin, AQP3, involves, in the amniotic environment, the RAR α nuclear receptor and three DR5 DNA response elements located between –2000 bp and +1 bp on the AQP3 promoter. This accumulation of AQP3 transcripts results in an increase in AQP3 protein and an uptake of glycerol, suggesting an increased in AQP3 function.

We established, in the amniotic environment, a new regulation pathway of AQP3 already known to be controlled by other members of the nuclear receptor family (in human keratinocytes), such as peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma [23]. We demonstrated that the AQP3 coding gene was regulated by all-*trans*-retinoic acid in human amnion and epithelial amniotic cells, and previous findings identified this glycoprotein water channel family as retinoic acid-induced in other tissues: atRA stimulation was found to lead to a transactivation of the AQP1 coding gene in human erythroleukemia (HEL) cells [24], to an accumulation of AQP3 mRNA in human keratinocytes [25,26], to an up-regulation of AQP9 in the myeloid leukemia HL-60 cell line [10] and to a stimulation of AQP5 expression in lung epithelial cells [11]. Although AQP1 and 9 are expressed in human fetal membranes, we did not find any atRA increase of either AQP, illustrating the tissue and cellular specificity of transcriptional regulation by this pleiotropic morphogen. We note that this fineness also occurs at tissue level in the fetal membranes, because AQP3 expression was not induced in the chorion part.

Although this atRA regulation system was partially studied in the case of AQP1 and AQP5, promoter analysis of the AQP3 coding gene had never been attempted. Our work thus demonstrates for the first time the involvement of three DR5 DNA response elements located on –2000/+1 pb in the transactivation of the AQP3 coding gene in response to atRA in human amniotic cells. The atRA-dependent transactivation of the AQP3 coding gene required the involvement of transcription factors to transduce the signal to response elements located on the promoter of the target genes.

There is firm evidence that retinoic acid receptors (RARs) exert this function in mammals with both their retinoic-inducible capacity and their ability to bind retinoic acid response elements (RAREs) [18,27]. In this study, we sought to determine which of these receptors were responsible for the retinoic-induced AQP3 expression. We found, consistent with a previous study on fetal membranes [14], that only RAR α and RAR γ were expressed in epithelial amniotic cells, and that RAR α , but not RAR γ , was able to transduce atRA signaling on the AQP3 coding gene. Previously, Bellemère et al. had found the opposite, with RAR γ but not RAR α as an intermediate to transactivate AQP3 coding gene expression in response to atRA in human keratinocytes [9]. However, unlike human amniocytes expressing both RAR α and RAR γ at similar levels, human keratinocytes showed mostly RAR γ rather than RAR α (respectively, 90% and 10%), which could explain an acute role of the γ isoform in this context [28]. Also, the RAR α nuclear receptor was already found to be involved in the regulation of the t-PA coding gene in response to retinoic acid in human amniotic epithelial cells [29]. In this case, RAR α (expressed alone in epithelial amniotic cells) induced t-PA and RAR β coding gene expressions up to 12 h of atRA incubation. After this first period, RAR β nuclear receptors replaced the α isoform in stimulating t-PA gene expression in human epithelial amniotic cells, establishing a two-step mechanism of regulation. All these results illustrate transcriptional plasticity linked to the ability of retinoic acid receptors to regulate gene transcription by direct or indirect mechanisms, in a similar cell environment.

In our work, we show that transactivation of the AQP3 coding gene in response to atRA results in an increase in AQP3 protein expression and function. It is well established that AQP3 is a glycoprotein facilitating water flow across cell membranes [30]. All these data suggest that an up-regulation of AQP3 by atRA could participate in maintaining AF homeostasis across human fetal membranes. Thus by regulating the expression of aquaporins, retinoic acid appears to be an indirect regulator of AF volume. A deregulation of this AF volume leads to obstetrical pathologies, oligo- and poly-hydramnios. Retinoic acid could thus have both a protective action against AF volume pathologies and a role in fetal development. AQP3 expression is reported to decrease in at-term human fetal membranes with oligohydramnios compared with normal pregnancy [5]. Underlining the importance of AQP3 protein in the regulation of AF volume, these data suggest the need for a fine regulation of its expression during gestation, as we show here with atRA. Moreover, the amniotic fluid is known to be a morphogenetic actor applying controlled pressure influencing fetal development. In this case, by specifically regulating AQP3, retinoic acid could have an indirect morphogenetic action through fetal membranes as previously observed through placenta by controlling the expression of signals involved in fetal growth [31–33]. AQP3 is an aquaglyceroporin able to transport not only water, but also glycerol through bilayer cellular membranes [6]. As glycerol is used for gluconeogenesis, its transport will also modulate fetal glucose metabolism and contribute to energy metabolism [34]. Thus the regulation by atRA of AQP3-dependent glycerol transport through fetal membranes could contribute to the control of fetal fat accumulation, glucose homeostasis and cardiac energy production. In addition, AQP3 is involved in cell migration and proliferation, both accelerating cellular wound healing [35]. As vitamin A is well established as an epithelial wound-healing entity, its active derivative all-*trans*-retinoic acid, through AQP3, may play a part in the fetal membrane environment and more particularly in the pathological premature rupture of membranes.

To conclude, our work highlights the involvement of a vitamin A derivative, retinoic acid, in the function of human fetal membranes. Effects of hypo- or hyper-vitaminosis A on fetal development have been abundantly described [36,37], but little is known about

retinoid input deregulation directly on fetal membranes. In this study, we propose a regulation system with a macromolecular actor, AQP3, directly involved in the trans-membrane flow of amniotic fluid. Knowing the involvement of this protein in AF volume regulation and its morphogenetic role on fetal development, we can suggest that a deregulation of the retinoic signal in fetal membranes during pregnancy could potentially be involved in pathophysiological obstetrical situations.

Authors' contributions

C.P., D.B., A.C., C.B., P.B. and G.C. designed experiments, performed research and interpreted data. Experiments involving glycerol uptake were done by C.P. and G.M.

D.G., L.B. and V.S. designed experiments, interpreted data, directed the study and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors do not report any conflict of interest.

Acknowledgments

C.P. was supported by the “Conseil Régional Auvergne – Dispositif FEDER”. A.C. was supported by a “THEA laboratory grant”. G.C. was supported by the “Dispositif Nouveau Chercheur du Conseil régional d’Auvergne”.

English language editing was done by Auvergne Traduction Technique.

References

- [1] Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:280–9.
- [2] Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol* 2008;32:288–94.
- [3] Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG. Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta* 2007;28:824–32.
- [4] Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta* 2007;28:421–8.
- [5] Hua Y, Jiang W, Zhang W, Shen Q, Chen M, Zhu X. Expression and significance of aquaporins during pregnancy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:1373–83.
- [6] Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, et al. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(5):1492–506.
- [7] Prat C, Blanchon L, Borel V, Gallot D, Herbet A, Bouvier D, et al. Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biol Reprod* 2012;86(2):48.
- [8] Zhang Y, Ding S, Shen Q, Wu J, Zhu X. The expression and regulation of aquaporins in placenta and fetal membranes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:2371–82.
- [9] Bellemere G, Von Stetten O, Oddos T. Retinoic acid increases aquaporin 3 expression in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2008;128:542–8.
- [10] Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL, Tse EW. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* 2007;109(2):740–6.
- [11] Gao RW, Kong XY, Zhu XX, Zhu GQ, Ma JS, Liu XX. Retinoic acid promotes primary fetal alveolar epithelial type II cell proliferation and differentiation to alveolar epithelial type I cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015;51:479–87.
- [12] Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. *Development* 2012;139(5):843–58.
- [13] Samarut E, Rochette-Egly C. Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol* 2012;348(2):348–60.
- [14] Marceau G, Gallot D, Borel V, Lemery D, Dastugue B, Dechelotte P, et al. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:1207–16.
- [15] Blanchon L, Marceau G, Borel V, Prat C, Herbet A, Bouvier D, et al. Implications of retinoid pathway in human fetal membranes: study of target genes. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39(6):370–2.
- [16] Marceau G, Gallot D, Lemery D, Sapin V. Metabolism of retinol during mammalian placental and embryonic development. *Vitam Horm* 2007;75:97–115.
- [17] Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:712–25.
- [18] Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res* 2013;54(7):1761–75.
- [19] Mittal P, Romero R, Mazaki-Tovi S, Tromp G, Tarca AL, Kim YM, et al. Fetal membranes as an interface between inflammation and metabolism: increased aquaporin 9 expression in the presence of spontaneous labor at term and chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:1167–75.
- [20] Neepser ID, Patton DL, Kuo CC. Cinematographic observations of growth cycles of *Chlamydia trachomatis* in primary cultures of human amniotic cells. *Infect Immun* 1990;58:2042–7.
- [21] Fogh J, Lund RO. Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:532–7.
- [22] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- [23] Jiang YJ, Kim P, Lu YF, Feingold KR. PPARgamma activators stimulate aquaporin 3 expression in keratinocytes/epidermis. *Exp Dermatol* 2011;20(7):595–9.
- [24] Umenishi F, Schrier RW. Induction of human aquaporin-1 gene by retinoic acid in human erythroleukemia HEL cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:913–7.
- [25] Song X, Xu A, Pan W, Wallin B, Kivlin R, Lu S, et al. Nicotinamide attenuates aquaporin 3 overexpression induced by retinoic acid through inhibition of EGFR/ERK in cultured human skin keratinocytes. *Int J Mol Med* 2008;22:229–36.
- [26] Cao C, Wan S, Jiang Q, Amaral A, Lu S, Hu G, et al. All-trans retinoic acid attenuates ultraviolet radiation-induced down-regulation of aquaporin-3 and water permeability in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2008;215:506–16.
- [27] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940–54.
- [28] Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J* 1996;10:1002–13.
- [29] Borel V, Marceau G, Gallot D, Blanchon L, Sapin V. Retinoids regulate human amniotic tissue-type plasminogen activator gene by a two-step mechanism. *J Cell Mol Med* 2009;14(6B):1793–805.
- [30] Liu H, Wintour EM. Aquaporins in development – a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:18.
- [31] Wellik DM, DeLuca HF. Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A-deficient rats. *Biol Reprod* 1995;53:1392–7.
- [32] Sapin V, Dolle P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P. Defects of the chorio-allantoic placenta in mouse RXRalpha null fetuses. *Dev Biol* 1997;191:29–41.
- [33] Thompson JN, Howell JM, Pitt GA. Vitamin a and reproduction in rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1964;159:510–35.
- [34] Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle* 2011; 15;10(10):1548–56.
- [35] Hara-Chikuma M, Verkman AS. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2008;128(9):2145–51.
- [36] Geelen JA. Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 1979;6:351–75.
- [37] Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble a vitamin. *J Exp Med* 1925;42:753–77.

Publication n°3

« Aquaporins and fetal membranes from diabetic parturient women: expression abnormalities and regulation by insulin »

D. Bouvier, M. Rouzaire, G. Marceau, C. Prat, B. Pereira, R. Lemarié, P. Deruelle, I. Fajardy, D. Gallot, L. Blanchon, A. Vambergue, V. Sapin

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2015, XXX.

Le diabète sucré est une des maladies chroniques les plus répandues à travers le monde. Les femmes enceintes sont concernées par deux types de diabète : le diabète gestationnel qui se déclare pendant la grossesse et le diabète pré-gestationnel (diabète de type 1 ou de type 2) qui préexiste avant la grossesse. Le polyhydramnios, défini par un excès de liquide amniotique, est une complication de la parturiente diabétique. En effet, le diabète représenterait 25% des causes d'hydramnios. Cette complication survient plus fréquemment dans un contexte de mauvais contrôle glycémique et plusieurs mécanismes physiopathologiques sont proposés. Parmi eux, l'hypothèse d'une hyperglycémie fœtale responsable d'une polyurie par effet osmotique est la plus communément admise. Les enfants diabétiques atteints de macrosomie ont également un débit cardiaque et un volume plasmatique augmentés qui accroît le débit de filtration glomérulaire et donc la production urinaire. Un autre mécanisme envisageable serait une concentration de glucose augmentée dans le liquide amniotique qui entraînerait l'arrivée d'eau par gradient de concentration. Les membranes fœtales, jouent également dans la physiologie du liquide amniotique. A l'échelle cellulaire et moléculaire, l'eau passe à travers les membranes via différents systèmes de transport perméatif passif comme la diffusion facilitée grâce aux aquaporines (AQPs). Au sein des membranes fœtales, les AQPs 1, 3, 8, 9 et 11 s'expriment, tout au long de la grossesse, au niveau de l'amnion et du chorion et jouent un rôle dans la régulation aqueuse intra-membranaire du liquide amniotique (cf. publication n°1). La majorité des études s'étant intéressées au rôle des AQPs dans le polyhydramnios, ne l'ont fait que dans un cadre idiopathique. Il en ressort une augmentation de l'expression des AQPs retrouvée habituellement à terme sur ces membranes. Aucune étude n'a pour l'instant étudié l'implication des AQPs au sein des membranes fœtales dans un contexte diabétique. Il est pourtant démontré dans d'autres tissus, notamment adipeux et hépatique, que l'insuline régule l'expression des aquaglycéroporines et que cette dernière est dérégulée dans

l'insulinorésistance. Dans ce contexte, notre étude a pour objectif de préciser le rôle des AQP_s au sein des membranes fœtales chez des parturientes diabétiques.

A partir des 129 membranes fœtales, réparties selon 4 populations (36 témoins, 35 diabètes de type 1 (DT1), 17 diabètes de type 2 (DT2) et 41 diabètes gestationnels (DG)), nous avons établi un profil d'expression qualitatif et quantitatif des gènes des AQP_s. Dans un second temps, des membranes fœtales issues de grossesses non pathologiques, séparées en ses 2 feuillets (amnion et chorion), ont été utilisées pour étudier la régulation de l'expression des gènes des AQP_s 3 et 9 par l'insuline au sein de l'amnion et du chorion ainsi que la voie de signalisation de l'insuline au sein de l'amnion. Des fragments de ces membranes ont été mis en culture en présence ou non d'insuline (à 10 ou 100 nM) et d'un inhibiteur de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). L'expression ARN et protéique des AQP_s au sein de nos différents fragments de membranes fœtales (totales, amnion, chorion) a été étudiée par PCR quantitative et ELISA.

Les profils d'expression quantitatifs des gènes sont identiques dans les 4 groupes (expression des AQP_s 1, 3, 8, 9 et 11). Quantitativement, l'expression des gènes des AQP_s 3 et 9 est significativement plus faible dans les groupes DT2 et DG. La culture d'explants d'amnion a démontré une répression significative par l'insuline de l'expression ARN et protéique des gènes AQP_s 3 et 9. Un inhibiteur de la phosphatidylinositol 3-kinase inhibe cette répression. La voie de signalisation de l'insuline est fonctionnelle au sein de l'amnion.

Nous confirmons ainsi l'hypothèse que cette répression génique des AQP_s 3 et 9 observée *in vivo*, est permise par l'hyperinsulinisme connu des patientes atteintes de DT2 ou de DG. Ceci pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques du polyhydramnios en diminuant la diffusion facilitée de l'eau au sein des membranes fœtales.

Aquaporins and fetal membranes from diabetic parturient women: expression abnormalities and regulation by insulin

Damien Bouvier^{1,2}, Marion Rouzaire¹, Geoffroy Marceau^{1,2}, Cécile Prat¹, Bruno Pereira³, Romain Lemarié², Philippe Deruelle⁴, Isabelle Fajardy⁴, Denis Gallot¹, Loïc Blanchon¹, Anne Vambergue^{5,†}, Vincent Sapin^{1,2,†}

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 - Retinoids, Reproduction Developmental Diseases, School of Medicine, F-63000 Clermont-Ferrand, France. ² CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France. ³ CHU Clermont-Ferrand, Biostatistics unit (DRCI) Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France. ⁴ UPRES EA 4489, School of Medicine Henri-Warembourg, Université Lille 2, PRES Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. ⁵ CNRS UMR 8199, Integrative Genomics and Modelization of Metabolic Diseases, EGID, School of Medicine Henri-Warembourg, Université Lille 2, PRES Lille Nord de France, F-59000 Lille, France.

Context: During pregnancy, aquaporins (AQPs) expressed in fetal membranes are essential for controlling the homeostasis of the amniotic volume, but their regulation by insulin was never explored in diabetic women.

Objective: The aim of our study was to investigate the involvement of AQP 1, 3, 8, and 9 expressed in fetal membranes in diabetic parturient women, and the control of their expression by insulin.

Design and participants: From 129 fetal membranes in four populations, (controls, type 1 (T1D), type 2 (T2D) and gestational diabetes (GD)), we established an expression AQPs profile. In a second step, the amnion was used to study the control of the expression and functions of AQPs 3 and 9 by insulin.

Main outcome and measures: The expression of transcripts and proteins of AQPs was studied by qRT-PCR and ELISA. We analyzed the regulation by insulin of the expression of AQPs 3 and 9 in the amnion. A tritiated glycerol test enabled us to measure the impact of insulin on the functional characteristics. Using an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) we analyzed the insulin intracellular signaling pathway.

Results: The expression of AQP3 protein was significantly weaker in groups T2D and GD. In non-diabetic fetal membranes, we showed for the amnion (but not for the chorion) a significant repression by insulin of the transcriptional expression of AQPs 3 and 9, which was blocked by a PI3K inhibitor.

Conclusion: In fetal membranes, the repression of AQP3 protein expression and functions observed *in vivo* is allowed by the hyperinsulinism described in pregnant women with T2D or GD.

D iabetes mellitus is one of the world's most widespread chronic illnesses. The World Health Organization (WHO) estimated that the total number of cases of adult diabetes is expected to keep on rising to reach 439 million adults in 2030, ie, 7.7% of the world's population (1).

Pregnant women are concerned by two types of diabetes: gestational diabetes, which occurs during pregnancy, and pregestational diabetes (types 1 or 2 diabetes) present before pregnancy (2). type 1 diabetes (T1D) arises from the specific destruction of the beta cells of the pancreatic islets

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in USA
Copyright © 2015 by the Endocrine Society
Received April 23, 2015. Accepted July 21, 2015.

Abbreviations:

of Langerhans, and is responsible for an absolute deficiency in insulin secretion and a strict insulin dependency (3). type 2 diabetes (T2D) and gestational diabetes (GD) both arise from insulin resistance associated with abnormal insulin secretion (4). Polyhydramnios, defined by an excess of amniotic fluid, is a complication in diabetic parturient women. Diabetes is the cause of 25% of hydramnios cases. This complication occurs more frequently when blood glucose is badly controlled, and several physiopathological mechanisms have been proposed. Among these, fetal hyperglycemia responsible for polyuria through an osmotic effect is the one most commonly hypothesized. Diabetic children with macrosomia (defined by a weight > to 4000g at term gestation or > 95th for the gestational age BMI) also have increased heart rate and plasma volume, which increases glomerular filtration rate (GFR) and thereby urine production (5, 6).

The fetal membranes, composed of the amnion lining the amniotic cavity and the chorion facing the maternal decidua, are also involved in the physiology of the amniotic fluid (7). At the cellular and molecular levels, water flows through the membranes via different passive permeation transport systems such as diffusion facilitated by aquaporins (AQPs) (8). The AQPs are small membrane proteins (24–30 kDa) whose name comes from their ability to increase the water permeability of the membrane lipid bilayers. At present the AQP family is known to have 13 members (AQP0–12) (9). In fetal membranes, AQPs 1, 3, 8, 9 and 11 are expressed throughout pregnancy in both amnion and chorion, and play a role in the intramembranal aqueous regulation of the amniotic fluid (10). AQPs 1 and 8 are pure aquaporins, ie, water-specific. AQPs 3 and 9 are aquaglyceroporins, being permeable to both water and glycerol (9). AQP11 belongs to a third group, the superaquaporins, for which no real transmembrane role is established (11). Most studies that have focused on the role of AQPs in polyhydramnios have done so in an idiopathic context. They have reported an increase in the expression of the AQPs usually found on these membranes at full term. The expression of AQPs 1 (12), 3 and 9 (13) increases in both amnion and chorion, and that of AQP8 increases only in the amnion (14). For Mann and coworkers, the increased expression of AQP1 is seen as a mechanism designed to compensate for the increase in volume of the amniotic fluid, rather than causing it (12). Thus mice KO for the AQP1 gene present polyhydramnios (15). A recent study including a small number of diabetic pregnant women ($n = 13$) launched work on the involvement of AQPs in fetal membranes (16), but nothing is known about regulation by insulin in these tissues. We know, however, that in other tissues, in particular adipose and hepatic tissues, insulin regulates the expression of aqua-

glyceroporins, and that this is deregulated under conditions of insulin resistance (17).

In this context, our study set out to delineate the involvement of AQPs in fetal membranes in diabetic parturient women, and to study the role of insulin in the expression profiles observed.

Materials and Methods

Collection of fetal membranes

We recruited 129 pregnant women in the maternity wards of the Lille and Clermont-Ferrand hospitals to collect their fetal membranes at full term. The study was approved by the appropriate institutional review boards of both hospitals (PHRC DIAMANT A00534–49). The women included agreed to the use of the collected membranes. The recruitment was organized in four preset groups: a control group consisting of nondiabetic women ($n = 36$), a T1D group ($n = 35$), a T2D group ($n = 17$) and a GD group ($n = 41$). For all the 129 women, the clinical and biological data were prospectively collected by manual chart review on obligatory items. T1D and T2D patients were already identified before pregnancy by using the criteria proposed by the World Health Organization and the American Diabetes Association. All the GD patients were included during the first trimester following the guidelines of the French Obstetrics and Gynaecology Society based on the International Association of Diabetes Pregnancy Study Group. GD was first managed by a diet. Insulin therapy was required when preprandial and postprandial glycemia remained above 0.95 g/L and/or 1.20 g/L respectively. Dose of insulin was adjusted to respect these glycemic targeted levels.

Culture of amnion and chorion explants in the presence of insulin and an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase

Delivery products from nonpathological postcaesarean full term births (37–39 weeks of amenorrhoea) were collected at the Clermont-Ferrand Teaching Hospital. The amnion and chorion were separated by peeling, and the 1cm² fragments (cut with surgical and sterile scalpel) of both tissues were randomly taken to obtain a homogeneity in terms of used tissues (only excluding the cervix side). They were immediately (<30 minutes after delivery) cultured in six-well plates in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific®, Waltham, USA). This culture was carried out in the presence and absence of insulin (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, USA) at a classically used concentration of 10 or 100 nM during 24 or 48 hours. For the assays with an inhibitor of PI3K, the culture was carried out in the presence and absence of insulin at 100 nM and an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), LY294002 (Sigma-Aldrich®) at 100 μmol/L during 48 hours. For each of the 10 membranes, all the induction experiments were conducted in triplicate.

Tritiated glycerol permeability test

Amnion explants from nondiabetic fetal membranes were cultured as previously described with and without insulin (100 nM) for 48 hours and 72 hours. The explants were exposed for 5 minutes with/without 0.3 mM HgCl₂ purchased from Sigma-

Aldrich (to block permeases). Explants were incubated with 1 μ Ci of [2-³H]-glycerol (American Radiolabeled Chemicals) or 1.5 μ M glycerol for 5 minutes. Amnion explants were lysed overnight in 0.3 N NaOH. Radioactivity was visualized by adding 5 mL of scintillation solution (Filtron-X). In parallel, proteins of control samples were quantified (Vista[®] Siemens, according to the manufacturer's protocol). Results were expressed as [2-³H]-glycerol (dpm)/grams of proteins/min for the corresponding vehicle conditions.

Extraction of total RNA, qualitative and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 129 membranes using an RNeasyMini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The primer sequences used (Table 1) were previously described and used (10).

From these 129 membranes, the gene expression profile of the 13 aquaporins, the insulin receptor and the two main substrates IRS1 and IRS2 was determined by classical PCR. For each PCR, the expression of a housekeeping gene (RPLP0) was found. The products of amplification were sequenced to verify the amplification specific to each primer pair.

Quantitative RT-PCR reactions for AQPs 1, 3, 8 and 9 transcripts were quantified independently three times in two independent experiments, using the geometric mean of three house-

keeping genes (RPLP0, 18S rRNA and β -actin). All the steps followed the MIQE guidelines (18).

Extraction of protein, assay of total proteins and ELISA assay of AQPs 3 and 9

Total proteins in fetal membranes, and in amnion and chorion explants were extracted using a Membrane Protein Extraction Kit[®] from BioVision[®] (Lyon, France). The assay of total proteins in our tissue extracts was carried out using a Vista[®] analyzer (Siemens). The level of protein expression of the AQPs 3 and 9 was measured by the ELISA method on extracts of total proteins from the various tissue explants using USCNK[®] kits (Wuhan, China) following the manufacturer's recommendations. The concentrations of the transcripts of the AQPs 3 and 9 of each sample were normalized against total protein concentrations.

Study of the intracellular insulin signaling pathway

The proteins of the amnion explants (obtained from non diabetic fetal membranes) cultured for 1h in the presence and absence of insulin and LY294002 were extracted to make a study of the phosphorylation profile of six proteins of the insulin signaling pathway: the kinase B protein (AKT), the S6 kinase pro-

Table 1. Specific primers used for PCR (quantitative and qualitative). AQP: aquaporin, IR: insulin receptor, IRS: insulin receptor substrate (Bouvier *et al.*, 2015)

Human gene	Sequence (5'-3')	Product size (pb)	Genbank No.
AQP0-S	GAGGAAACCTAGCACTCAA	196	NM 012064.3
AQP0-AS	TAATACATCCCAAAGAGGTG		
AQP1-S	ATCACCTCCTCCCTGACT	224	NM 198098.2
AQP1-AS	CAGCCAGTGTAGTCAATAGC		
AQP2-S	CTCTCTCCATAGGCTTCTCT	189	NM 000486.5
AQP2-AS	ACAGCACGTAGTTGTAGAGG		
AQP3-S	GAATAGTTTTTGGGCTGTATT	151	NM 004925.4
AQP3-AS	CCTATGAACTGGTCAAAGAA		
AQP4-S	GGAATCCTCTATCTGGTCAC	184	NM 001650.4
AQP4-AS	CTAAAGCTATTGAGCCAGTG		
AQP5-S	ACCTTGTCGGAATCTACTTC	159	NM 001651.3
AQP5-AS	AGAGCAGGTAGAAGTAAAGGA		
AQP6-S	TAGGCTCCCACATCTCTC	154	NM 001652.3
AQP6-AS	CCAGTTGAGACACTGTTCC		
AQP7-S	ATAGCAAAGATCCAGGAAAT	243	NM 001170.1
AQP7-AS	ACAGTTAGCAAAGGTCACAG		
AQP8-S	GGTGCCATCAATGAGAAGAC	238	NM 001169.2
AQP8-AS	GTCTTCCCATCTCCAATGAA		
AQP9-S	CGTCTTTGCCATCTTTGACT	223	NM 020980.3
AQP9-AS	CCACTACAGGAATCCACCAG		
AQP10-S	AGTTTCTGGGTGTGTTTGTA	243	NM 080429.2
AQP10-AS	ACTGCACCAAGATGTAAATG		
AQP11-S	CATCACCTTTTTGGTCTATG	175	NM 173039.2
AQP11-AS	GAAAAAGCTGAACATCAAAA		
AQP12-S	CTTTTGTTCATCTGACC	185	NM 198998.2
AQP12-AS	CGTACTCCAGTAAGGTGTGT		
IR-S	AAGACGTTTGAGGATTACCT	222	NM 000208.2
IR-AS	GTTCCACCACCTTCTCAAAA		
IRS1-S	GTAGCTCAACTGGACATCAC	197	NM 005544.2
IRS1-AS	GTTCCAGTCAATGAAATCCTG		
IRS2-S	CAGCATTGACTTCTGTCC	180	NM 003749.2
IRS2-AS	AACACAGTCATTGCTCAGAT		

tein (p70S6K), the glycogen synthase kinases 3 α and β (GSK3 α and GSK3 β), the IGF1 receptor, and the tuberous sclerosis complex protein 2 (TSC2). MILLIPLEX[®] MAP kits (Merck KGaA[®], Darmstadt, Germany), based on the Luminex x MAP[®] technology were designed to target the well-known and published phosphorylation residues of each protein cited above and were used according to the manufacturer's recommendations.

Statistics

Statistical analysis was performed using Stata software, version 13 (StataCorp, College Station, TX, U.S.). The tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Quantitative data were presented as the mean \pm standard deviation or the median [interquartile range] according to the statistic. Comparisons among independent groups were made using the test of Kruskal-Wallis followed by Dunn's test, as criteria for performing ANOVA were not met (normality by the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity using the Bartlett test). A multivariate linear regression model was proposed to consider adjustment on covariables fixed according to univariate results and clinical relevance: BMI and age of mother. Comparisons between independent groups concerning categorical data (% obese, macrosomic babies) were performed using the χ^2 test or Fisher's exact test, followed when appropriate by the Marascuilo procedure. The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare the expression of RNA or proteins (AQPs 3 and 9) in different groups (without insulin vs. with insulin in GD group, BMI (Body Mass Index) < 30 kg/m² vs. BMI > 30). When $P < .05$, subgroup analyses were explored.

Results

Clinical data linked to collection of fetal membranes

The main clinical data are noted in Table 2. All the T2D

patients were treated by insulin. Concerning the GD group, 22 women were treated by insulin and nutritional recommendations and 19 only by nutritional recommendations. The mothers in groups T2D and GD were significantly older than those in the nondiabetic and T1D groups. A significantly higher BMI was found in the T2D group than in the control and T1D groups. Likewise, the proportion of obese mothers (BMI > 30 kg/m²) was significantly greater in group T2D than in the other three groups, and greater in group GD than in the control and T1D groups.

Differential expression of AQPs in fetal membranes of diabetic women (T1D, T2D, GD)

The expression profile of the mRNA for the 13 AQPs in the 129 fetal membranes was established by classical RT-PCR in order to identify any qualitative modification ("on-off effect"). No qualitative modifications in expression were found. Indeed, the AQPs expressed in the membranes were AQPs 1, 3, 8, 9 and 11 irrespective of the group (control, T1D, T2D and GD).

No significant differences were observed between the RNA expression of AQPs1 and 8 in the diabetic groups and that of controls (Figure 1A, B). For AQP3, we observed a 34% decrease in RNA expression in group T1D relative to controls, and statistically significant decreases of 62% for group T2D and 56% for group GD (Figure 1C). For AQP3, we found a 33% decreased protein expression relative to controls in group T1D, and statistically significant decreases of 58% for group DT2D and 60% for group GD (Figure 1D). For AQP9, we observed

Table 2. Clinical data for the collected fetal membranes. Macrosomia is defined by a weight $>$ to 4000g at term gestation or $> 95^{\text{th}}$ for the gestational age BMI: body mass index, GD: gestational diabetes, T1D: type 1 diabetes, T2D: type 2 diabetes, NS: non-significant; *: $P < 0.05$ (Bouvier *et al.*, 2015)

n	Control group 36	T1D group 35	T2D group 17	GD group 41	p /
<i>Clinical data related to pregnancy</i>					
Average term of pregnancy in weeks of amenorrhea (SD)	39.5 (1.1)	37.4 (1.2)	37.6 (0.9)	39.1 (1.2)	NS
Average weight of the baby at birth in grams (SD)	3379 (384)	3580 (534)	3718 (744)	3371 (530)	NS
Percentage of macrosomic babies (number)	8% (3)	23% (8)	29% (5)	12% (5)	NS
<i>Clinical data related to mothers</i>					
Age in years (SD)	28.4 (4.8)	29.3 (5)	33.5 (5.3)	32.6 (4.7)	* T2D vs. control * T2D vs. T1D * GD vs. control * GD vs. T1D
Mean BMI of mother in kg/m ² (SD)	21.9 (3.2)	24.3 (4)	33.7 (6.3)	28.1 (6.5)	* T2D vs. control * T2D vs. T1D
Percentage of obese mothers (number)	3% (1)	9% (3)	82% (14)	37% (15)	* T2D vs. control * T2D vs. T1D * T2D vs. GD * GD vs. control * GD vs. T1D

a 25% decrease in RNA expression for group T1D relative to controls, a decrease of 67% for group DT2 and a statistically significant decrease of 98% for group GD (Figure 1E). No significant difference relative to controls was found for the protein expression of AQP9 (Figure 1F).

In group GD ($n = 41$), we compared the expression of AQPs 3 and 9 in fetal membranes in two subgroups: one in which the mothers were treated solely by diet ($n = 22$) and one in which they were treated by diet plus insulin ($n = 19$). A statistically significant decrease in the expression of

AQPs 3 and 9 was observed in the subgroup “with insulin” for both RNA (Figure 2A, C) and protein (Figure 2B, D). The level of expression of AQPs 3 and 9 was also tested in two other subgroups: one in which the mothers were not obese ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 96$) and one in which they were obese ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 33$). A statistically significant reduction in the expression of AQPs 3 and 9 was also present in the subgroup “ $BMI > 30$ ” for both RNA (Figure 2E, G) and protein (Figure 2F, H).

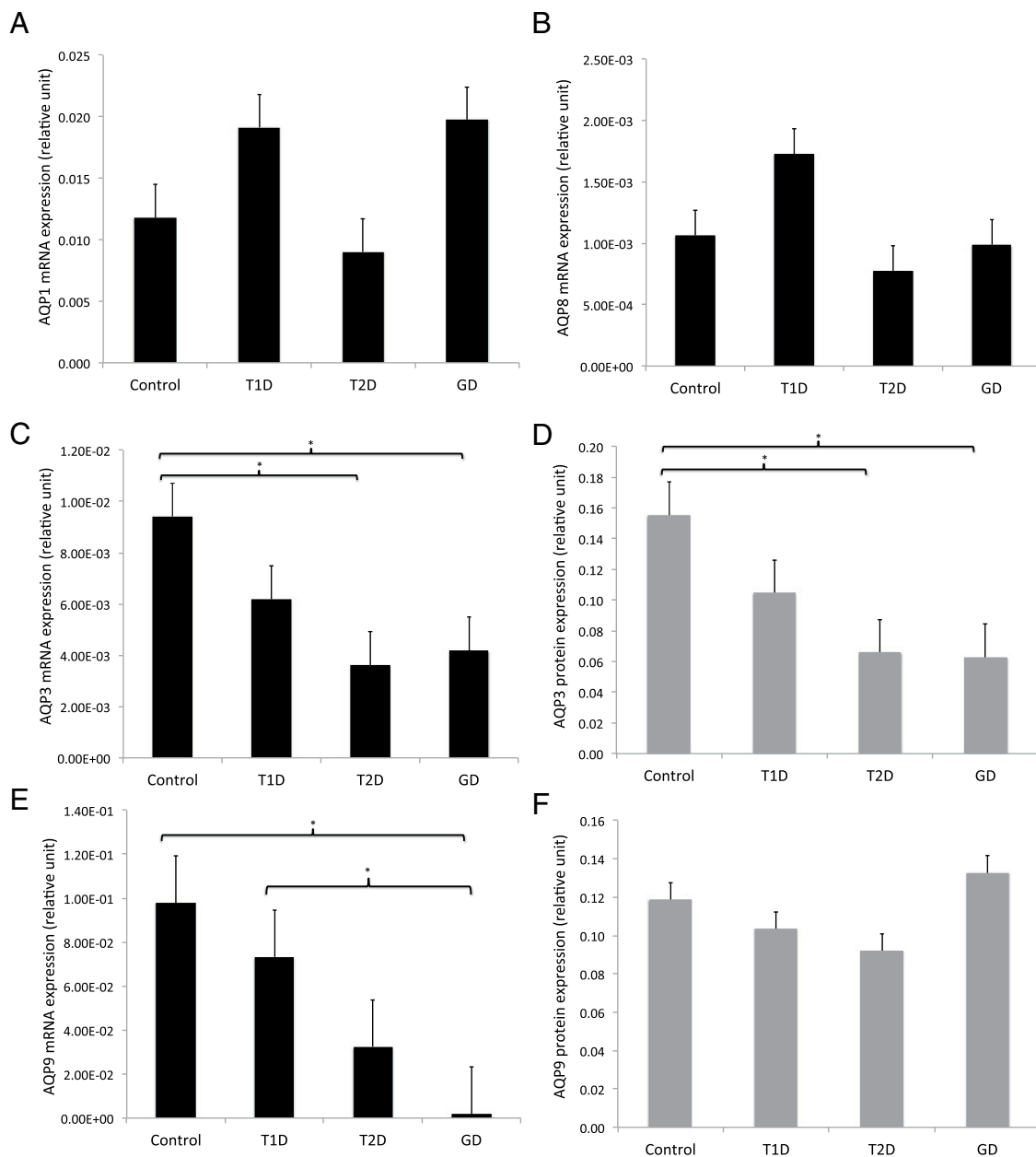


Figure 1. Study of the expression of AQP genes in fetal membranes from diabetic women (T1D, T2D or GD). Expression of transcripts (A, B, C, E) and proteins (D, F) of genes for AQPs 1 (A), 8 (B), 3 (C, D) and 9 (E, F) in fetal membranes according to the set groups: control ($n = 36$), type 1 diabetes (T1D; $n = 35$), type 2 diabetes (T2D; $n = 17$), gestational diabetes (GD; $n = 41$). The RNA extracted from explants of membranes about 1 cm^2 in size were back-transcribed and then quantified three times in duplicate by quantitative RT-PCR. The concentrations obtained were normalized relative to a geometric mean of three housekeeping genes. AQP3 and 9 proteins were quantified by ELISA from total proteins extracted from membrane explants about 1 cm^2 in size. The concentrations obtained were normalized to those of total proteins. * $P < .05$

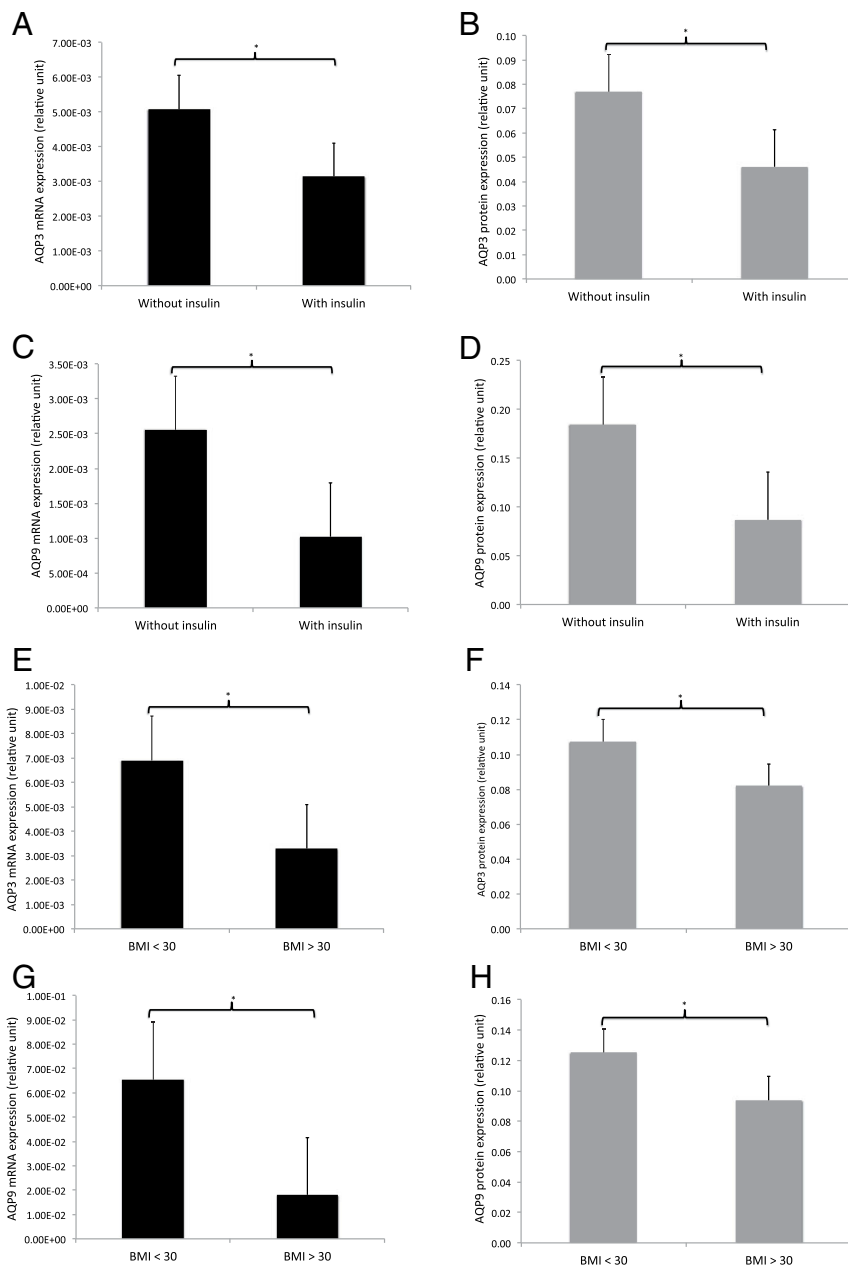


Figure 2. Study of links between the level of expression of AQPs 3 and 9 in fetal membranes of diabetic women and their clinical data. Expression of RNA (A, C, E, G) and protein (B, D, F, H) of genes for AQPs 3 (A, B, E, F) and 9 (C, D, G, H) in fetal membranes according to clinical data: treatment ($n = 19$) or not ($n = 22$) with insulin in group GD (A, B, C, D) or body mass index (BMI) $>$ or $<$ 30 kg/m^2 (E, F, G, H). The French guidelines for gestational guidelines established a switch towards an insulin treatment when the pregnant woman present a morning preprandial blood glucose concentration more than 0.95 g/L and/or a 2h postprandial one more than 1.20 g/L . RNA extracted from membrane explants about 1 cm^2 in size were back-transcribed and then quantified three times in duplicate by quantitative PCR. The concentrations obtained were normalized relative to a geometric mean of three housekeeping genes. Proteins AQP3 and AQP9 were quantified by ELISA from total proteins extracted from membrane explants about 1 cm^2 in size. The concentrations obtained were normalized to those of total proteins. *: $P < .05$; BMI: BMI.

Study of the effect of insulin on the expression and function of the genes for aquaglyceroporins 3 and 9 in nondiabetic fetal membranes

After culturing in the presence and absence of insulin (at 10 or 100 nM) at different times (24 hours and 48 hours),

we observed no effect of insulin in the chorion on the RNA or protein expression of the AQPs 3 and 9 genes, whether concentration-dependent or time-dependent (results not shown). For the amnion, comparing the RNA expression of the AQP3 gene, for each incubation time, between the untreated explants and those treated with insulin, we observed a 25% lower expression at 24 hours and a statistically significant decrease of 54% at 48 hours on treatment with 10 nM insulin. For the explants treated with 100 nM insulin, the differences were significant after 24 hours (51% lower) and 48 hours (48% lower) (Figure 3A). For the protein expression of AQP3, the difference was significant after 48 hours treatment with 100 nM insulin (decrease of 36%) (Figure 3B). For the amnion, comparing the expression of the transcripts of AQP9, for each incubation time, between the untreated explants and those treated with insulin, we observed a 48% lower expression at 48 hours on treatment with 10 nM insulin (Figure 3C). For explants treated with 100 nM insulin, the differences were significant after 24 hours (decrease of 32%) and 48 hours (decrease of 78%) (Figure 3C). For the protein expression of AQP9, the difference was significant after 48 hours of treatment with 100 nM insulin (decrease of 78%) (Figure 3D). After 48 hours and 72 hours of amnion explant culture in the presence and absence of insulin at 100 nM, the transfer of tritiated glycerol (mediated by aquaporins) was statistically lowered (Figure 3E). This effect of insulin was no longer observed in the presence of 0.3 mM HgCl_2 , which inhibits the transmembrane transfer of glycerol in the amnion, in the presence or absence of insulin (Figure 3E).

In the presence of LY294002, an inhibitor of PI3K (involved in the intracellular transmission of the insulin pathway), the decrease in the RNA expression of AQP3 in the

amnion, after 48 hours culture in the presence of 100 nM insulin was no longer found (Figure 3F). In addition, LY294002 led to an insulin-independent, statistically significant 3.4-fold increase in the expression of AQP3 transcripts (Figure 3F). Likewise, in the presence of LY294002, the decrease in the expression of AQP9 RNA after 48 hours culture in the presence of 100 nM insulin was absent (Figure 3G). Similarly, LY294002 brought about an insulin-independent, statistically significant 2.1-fold increase in the expression of AQP9 RNA (Figure 3G).

Study of the insulin signaling pathway in the nondiabetic amnion

The expression of RNA of the insulin receptor and its two main substrates (IRS1 and IRS2) was found in both amnion and chorion by RT-PCR (results not presented).

For AKT, we observed a statistically significant 3.8-fold increase in the phosphorylation of serine 473 in the presence of insulin, not found in the presence of LY294002. In addition, LY294002 brought about an insulin-independent, statistically significant decrease in the phosphorylation of serine 473 of 94% (Figure 4A). For GSK3 β , we found a statistically significant 2-fold increase in the phosphorylation of serine 9 in the presence of insulin, not observed in the presence of LY294002. Also, LY294002 caused an insulin-independent statistically significant decrease in the phosphorylation of serine 9 of 77% (Figure 4B). For GSK3 α , we found a statistically significant 2.3-fold increase in the phosphorylation of serine 21 in the presence of insulin, not observed in the presence of LY294002. Also, LY294002 caused an insulin-independent, statistically significant decrease of 66% in the phosphorylation of serine 21 (Figure 4C). For p70S6K, the phosphorylation of threonine 412 was significantly increased 2.1-fold in the presence of insulin, this effect being inhibited in the presence of LY294002, which also brought about an insulin-independent, statistically significant 56% decrease in the phosphorylation of threonine 412 (Figure 4D). For TSC2, we observed a statistically significant 1.9-fold increase in the phosphorylation of serine 939 in the presence of insulin, not found in the presence of LY294002, which led to a statistically significant decrease in the phosphorylation of serine 939 of 67% (Figure 4E). For the IGF1 receptor, insulin caused a statistically significant 28-fold increase in the phosphorylation of tyrosines 1135 and 1136, independently of LY294002 (Figure 4F).

Discussion

The amniotic fluid plays an essential role during pregnancy, and the normalcy of its volume is a good indicator

of fetal wellbeing. Despite its fine regulation, volume anomalies may occur (oligoamnios or polyhydramnios), closely associated with increased fetal morbidity and mortality (5). The aquaporins are known to play a major role in the regulation of water homeostasis in the body, and to participate also in the regulation of the amniotic volume (19). An expression of AQPs 1, 3, 8 and 9 in chorio-amniotic membranes has already been reported in healthy pregnancy (10), and an increase in their expression has been observed in idiopathic polyhydramnios (12, 13, 14). In addition, polyhydramnios is known to be frequently associated with diabetes (5, 6). On the other hand, the role of the fetal membranes via the aquaporins in the regulation of the amniotic volume in diabetic pregnant women has never been closely investigated, except for one recent study on a small sample, which did not allow for the different types of diabetes encountered during pregnancy, or links with certain clinical or therapeutic data, or molecular and cellular studies of the involvement of insulin in the amnion (16). In our work we have thus for the first time established in parallel an expression profile of the AQP genes in the fetal membranes from pregnant diabetic women (T1D, T2D and GD), and gone on to demonstrate the role of insulin in the expression and function of aquaglyceroporins in these membranes. For this purpose, 129 fetal membranes were collected from mothers in four groups: controls, T1D, T2D and GD. The fact that the mothers were significantly older and more obese in the T2D and GD groups (Table 2) is echoed in the literature (4), which tends to validate our cohort.

The lowered expression of AQPs 3 and 9 genes in the fetal membranes from women with T2D or GD raises the question of insulin involvement. Insulin-resistance and hyperinsulinism are physiopathological characteristics common to T2D and GD (20, 21). The repressive role of insulin on the expression of certain aquaglyceroporins has already been shown in essential tissues with glucidic metabolism (17, 22, 23). This regulation culminates in an inactivation of the Forkhead box a2 (Foxa2) transcription factor, which is bound normally on an insulin response element (IRE) on the promoter of the genes for AQP3 (24) and 9 (25). AQP9 has also been described as being repressed by insulin in the placenta, although its functional capacities do not seem to be impacted (26). In addition to physiopathological and bibliographical arguments in favor of a role of insulin in the decreased expression of AQPs 3 and 9 transcripts in the fetal membranes from women in groups T2D and GD, we have obtained other results from our cohort of 129 membranes that support our hypothesis. In group GD, we found a significantly decreased RNA and protein expression of the genes for AQPs 3 and 9 in the subgroup treated with diet plus insulin, compared with the

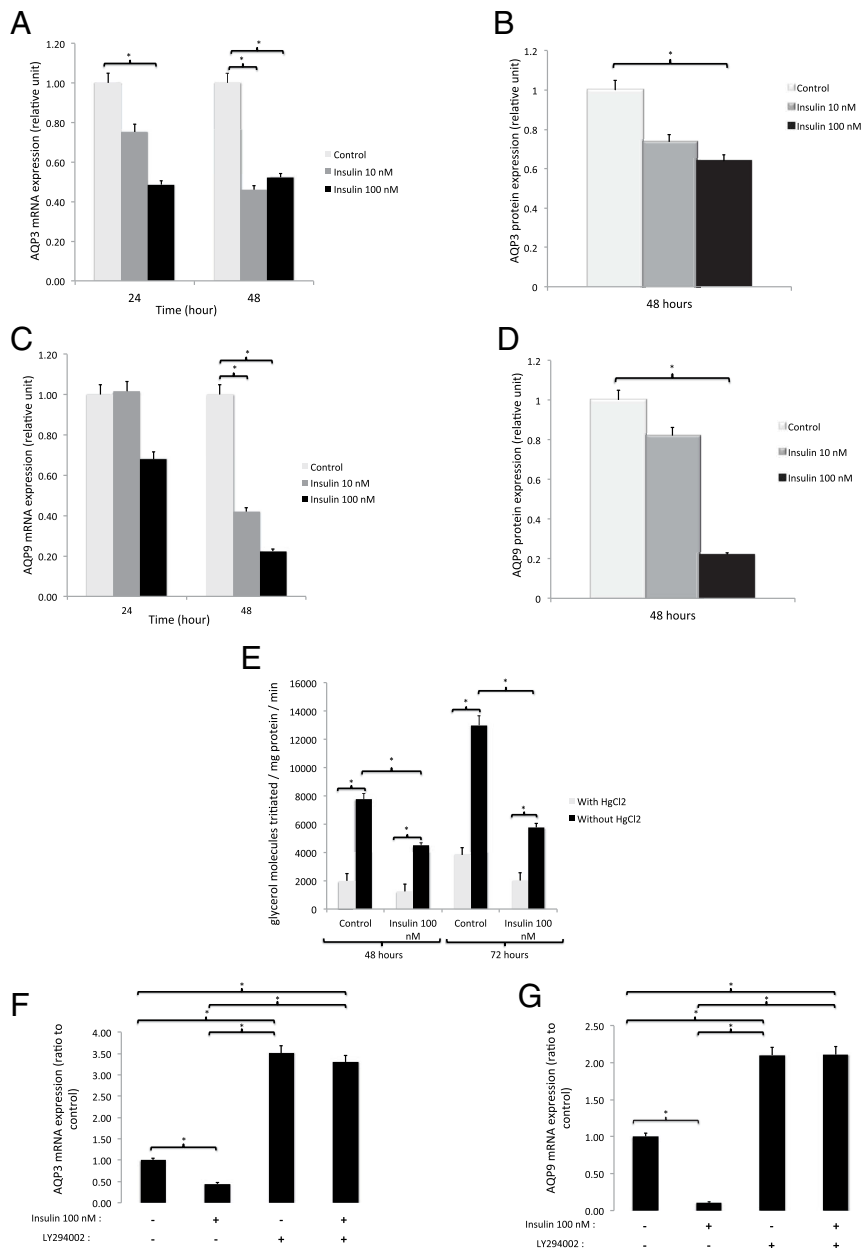


Figure 3. Study of the regulation of the expression of AQP 3 and 9 genes by insulin in the amnion. A, B, C, D: Study of the effect of insulin on the expression of RNA (A, C) or protein (B, D) of AQP3 (A, B) and 9 (C, D) in the amnion. The amnion explants (1 cm²), from five different membranes, were cultured for 24 hours and 48 hours with and without insulin, giving the following groups: control, cultured in the presence of insulin at 10 nM or 100 nM (five explants per condition and per membrane). The extracted RNA was back-transcribed and then quantified three times in duplicate by quantitative PCR. The concentrations obtained were normalized relative to a geometric mean of three housekeeping genes. Each ratio was in turn calculated relative to the ratio obtained from the sample that had not undergone the insulin treatment (control). The control samples thus present, at each time, ratios defined as equal to 1. The AQP3 and 9 proteins were quantified by ELISA from total proteins extracted from membrane explants about 1 cm² in size. The concentrations obtained were normalized to those of total proteins. Each ratio was in turn calculated relative to the ratio obtained from the sample that had not undergone the insulin treatment (control). The control samples thus presented, at each time, ratios defined as equal to 1. E: Study of the penetration of tritiated glycerol in the amnion after 48 hours or 72 hours culture in the presence and absence of insulin at 100 nM. Each condition repeated five times was run with and without 0.3 mM HgCl₂ (to block permease). F, G: Study of the effect of an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (LY294002) at 100 μmol/L on the RNA expression of genes for AQP3 (F) and 9 (G) in the presence and absence of insulin at 100 nM in the amnion. The culture time was 48 hours. The rest of the experimentation was similar to that described above (A–D). *: $P < .05$

one treated with diet alone. In addition, we observed a significantly decreased RNA and protein expression of the genes for AQP3 and 9 in the subgroup of fetal membranes from obese women compared with that of fetal membranes from nonobese women, and it is clearly established that perturbations of insulin pathway occurs in obesity (20). Interestingly, the decrease of AQP9 transcripts for T2D and GD was not found for the AQP9 protein expression in any of the groups. The difference may be due to different post-translational mechanisms between AQP3 and AQP9; and/or the fact that these two AQP3 apparently present inverted ration of “cytoplasm / cell membrane” protein expression, with a most membrane localized AQP3 and a strongly cytosolic AQP9 (unpublished results from Cheung’s group / Portland, Oregon, USA). According to this data and explanation, the decreased activity of AQP-mediated transfer of tritiated glycerol in amnion explants with insulin might be accounted for the repression of AQP3 protein expression only.

Nevertheless, the transcriptional regulation of the expression of AQP3 and 9 by insulin is established by our work on cultures of isolated amnion explants. This a tissue-selective response, because the AQP3 were not transcriptionally regulated in the chorion (the second component of fetal membranes) despite it presented the same molecular actors in terms of insulin pathway. Although Zhang et al (19) hypothesized a repression of AQP3 and 9 by insulin in fetal membranes by the extrapolation of data previously reported for other tissues, we demonstrate it here for the first time for both expression and function. Although the expression of the insulin receptor was shown to be weak in earlier work (25), its ability to activate the mech-

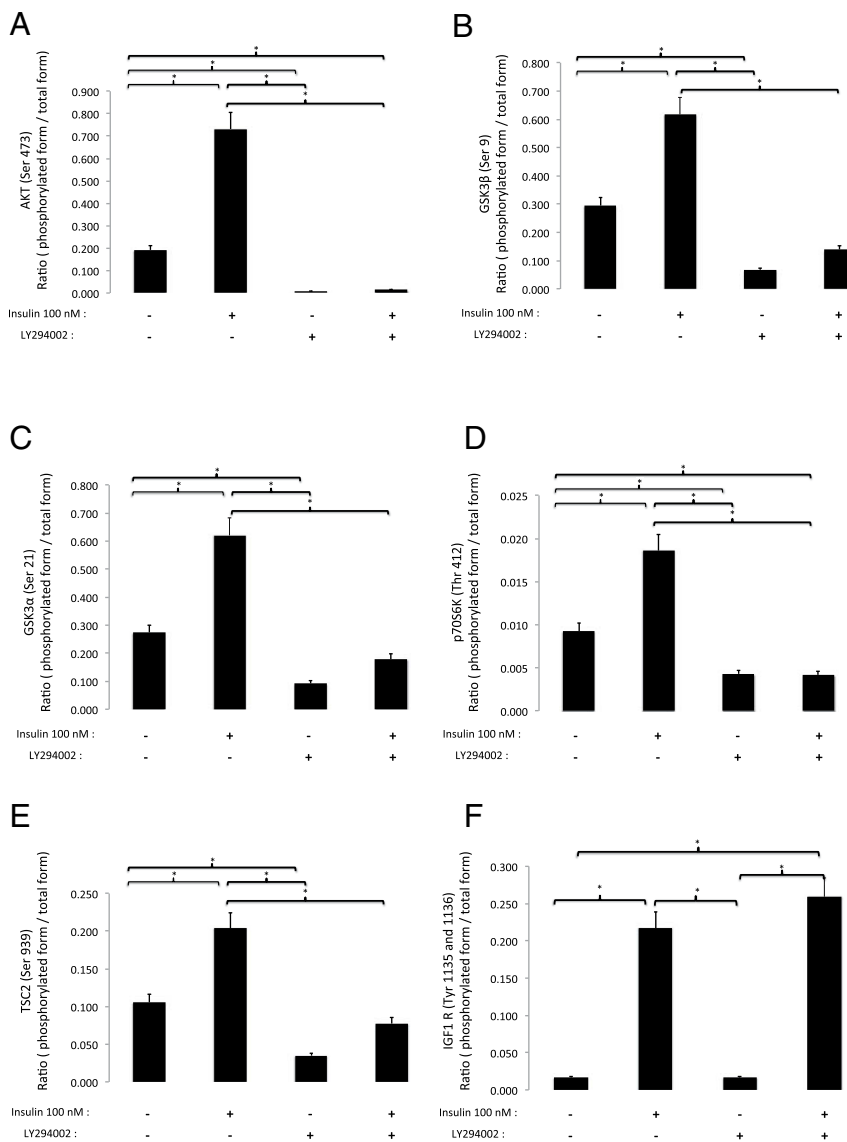


Figure 4. Study of the intracellular insulin signaling pathway in the amnion. The proteins of the amnion explants cultured for 1 hour in the presence and absence of insulin and LY294002 were extracted for the study of the phosphorylation profile of six proteins of the insulin signaling pathway: AKT on serine 473 (A), GSK3 β on serine 9 (B), GSK3 α on serine 21 (C), p70S6K on threonine 412 (D), TSC2 on serine 939 (E) and IGF1 receptor on tyrosines 1135 and 1136 (F). MILLIPLEX[®] MAP kits, based on Luminex x MAP[®] technology, were used according to the manufacturer's recommendations for the extraction of proteins and assay of total and phosphorylated forms. The results are presented as the ratio of phosphorylated to total forms. *: $P < .05$.

anisms of intracellular phosphorylation is present. In the presence of insulin, we found an increase in the phosphorylation of AKT proteins on serine 473, GSK3 β on serine 9, GSK3 α on serine 21, p70S6K on threonine 412, and TSC2 on serine 939. For these five proteins, this insulin effect disappeared in the presence of an inhibitor of PI3K. Current knowledge concerning the signaling pathway of the insulin and IGF1 receptors can explain these results (27). This PI3K/AKT regulation pathway seems important for aquaglyceroporins AQP3, 7 and 9 because it has already been found in adipocytes, cutaneous fibroblasts

and an ovarian cell line, even though it is the culmination of other cascades initiated by other membrane receptors such as EGF for AQP3 (16). An impairment of this intracellular phosphorylation pathway is described in a neighboring tissue, the placenta, to explain a deregulated expression of AQP9 in pre-eclampsia (28).

The results of our in vitro experiments support our hypothesis of a repressed transcriptional expression of AQP3 and 9 by insulin in fetal membranes. This effect is especially visible in a context of T2D or GD associated with hyperinsulinemia. We consider that these membranes from T2D and GD pregnancies are insulin-sensitive, given their hybrid nature, being of both maternal and paternal origin. In addition, in our study, the RNA expression profile of AQP3 and 9 shows their inhibition in this context of hyperinsulinemia, whereas the literature describes an elevation of levels in insulin-resistant tissues (17). These fetal membranes thus appear as collateral victims, sensitive to ambient hyperinsulinism, modulating the expression of target genes for their AQPs. A similar observation was made in the placenta of obese women where overexpression of the AKT/mTOR pathway was found (29). We thus advance the hypothesis that through a strong insulin impregnation, aquaglyceroporins are repressed in the amnion, so contributing to the retention of amniotic fluid. This retention, added to fetal polyurea, may contribute to maintaining polyhydramnios. The AQP-insulin links in the fetal membranes therefore provide a new physiopathological explanation (further to others already described in the fetus, mother and placenta), that may account for the anomalies in the homeostasis of the amniotic fluid during pregnancies in diabetic women.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: *Corresponding author and reprint request:* Professor Vincent Sapin,

Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 place Henri-Dunant, BP38, F-63 001 Clermont-Ferrand Cedex, France, Tel: +33 47 317 8174, Fax: +33 47 327 6132, E-mail: vincent.sapin@udamail.fr.

¶: A.V. and V.S. are considered as colast authors.

Research grant from Fondation Coeur et Artère, F-59 000, Lille, France (www.fondacoer.com)

Disclosure Summary: the authors have nothing to disclose

This work was supported by .

References

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010; 87(1). doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007.
- Management of Diabetes in Pregnancy. *Diabetes Care* 2015; 38(Supplement 1). doi:10.2337/dc15-S015.
- Kawasaki E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin. Pediatr. Endocrinol. Case Rep. Clin. Investig. Off. J. Jpn. Soc. Pediatr. Endocrinol.* 2014;23(4). doi:10.1297/cpe.23.99.
- Peacock AS, Bogossian F, McIntyre HD, Wilkinson S. A review of interventions to prevent Type 2 Diabetes after Gestational Diabetes. *Women Birth J. Aust. Coll. Midwives* 2014;27(4). doi:10.1016/j.wombi.2014.09.002.
- Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin. Perinatol.* 2008; 32(4):288–294. doi:10.1053/j.semperi.2008.04.012.
- Idris N, Wong SF, Thomae M, Gardener G, McIntyre DH. Influence of polyhydramnios on perinatal outcome in pregestational diabetic pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2010;36(3):338–343. doi:10.1002/uog.7676.
- Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998;19(1).
- Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta* 2007;28(5–6): 421–428. doi:10.1016/j.placenta.2006.06.005.
- Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu. Rev. Med.* 2012;63:303–316. doi:10.1146/annurev-med-043010–193843.
- Prat C, Blanchon L, Borel V, Gallot D, Herbert A, Bouvier D, Marceau G, Sapin V. Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biol. Reprod.* 2012;86(2). doi:10.1095/biolreprod.111.095448.
- Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin. Exp. Nephrol.* 2009;13(2):107–117. doi:10.1007/s10157–008–0118–6.
- Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, Taylor RN. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006;194(3):884–887. doi: 10.1016/j.ajog.2005.07.004.
- Zhu X-Q, Jiang S-S, Zou S-W, Hu Y-C, Wang Y-H. [Expression of aquaporin 3 and aquaporin 9 in placenta and fetal membrane with idiopathic polyhydramnios.]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2009; 44(12):920–923.
- Zhu X, Jiang S, Hu Y, Zheng X, Zou S, Wang Y, Zhu X. The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios. *Early Hum. Dev.* 2010;86(10):657–663. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.07.012.
- Mann SE, Rieke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005;192(6):2041–4; discussion 2044–2046. doi:10.1016/j.ajog.2005.02.046.
- Bednar AD, Beardall MK, Brace RA, Cheung CY. Differential expression and regional distribution of aquaporins in amnion of normal and gestational diabetic pregnancies. *Physiol. Rep.* 2015;3(3). doi:10.14814/phy2.12320.
- Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rottellar F, Valenti V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Burrell-MA, Calamita G, Malagon MM, Fruhbeck G. Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(4):E586–597. doi:10.1210/jc.2010–1408.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Zhang Y, Ding S, Shen Q, Wu J, Zhu X. The expression and regulation of aquaporins in placenta and fetal membranes. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 2012;17:2371–2382.
- Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle Georget. Tex* 2014; 13(16):2494–2500. doi:10.4161/15384101.2014.947750.
- Vambergue A, Valat AS, Dufour P, Cazaubiel M, Fontaine P, Puech F. [Pathophysiology of gestational diabetes]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 2002;31(6 Suppl).
- Liu H, Mei Z-C, Xiao X. [Effects of insulin and LY294002 inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi Zhonghua Ganzangbing Zazhi Chin. J. Hepatol.* 2010;18(6):455–458.
- Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Nagaretani H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes.* 2002;51(10):2915–2921.
- Higuchi S, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Kiho T, Hirano K. Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin. *J. Cell. Biochem.* 2007;102(4):1051–1058. doi:10.1002/jcb.21350.
- Yokoyama Y, Iguchi K, Usui S, Hirano K. AMP-activated protein kinase modulates the gene expression of aquaporin 9 via forkhead box a2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;515(1–2):80–88. doi: 10.1016/j.abb.2011.08.002.
- Castro Parodi M, Farina M, Dietrich V, Aban C, Szpilbarg N, Zotta E, Damiano AE. Evidence for insulin-mediated control of AQP9 expression in human placenta. *Placenta* 2011;32(12):1050–1056. doi:10.1016/j.placenta.2011.09.022.
- Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6(1). doi:10.1101/cshperspect.a009191.
- Scioscia M, Gumaa K, Kunjara S, Paine MA, Selvaggi LE, Rodeck CH, Rademacher TW. Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(2):709–717. doi:10.1210/jc.2005–1965.
- Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, Lager S, Jones HN, Roos S, Jansson T, Powell TL. Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(1):105–113. doi:10.1210/jc.2012–2667.

DISCUSSION

Le liquide amniotique joue un rôle essentiel dans le déroulement de la grossesse, et la normalité de son volume est un bon indicateur du bien être fœtal. Malgré une régulation fine, des anomalies de volume peuvent survenir (oligoamnios ou polyhydramnios) et sont fortement associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité fœtale (16). Il est établi que les aquaporines jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie hydrique de l'organisme, et qu'elles participent également à la régulation du volume amniotique (156).

Dans un premier temps, nous avons recherché quelles étaient les aquaporines exprimées dans les membranes fœtales humaines tout au long de la grossesse. Nous avons ainsi mis en évidence l'expression, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, des AQP1, 3, 8, 9, et pour la première fois, 11 tout au long de la grossesse. Ce travail peut être complété par deux axes de réflexion. Afin d'être fonctionnelles, les AQP1 doivent être adressées à la membrane cellulaire. La répartition des fractions cytosoliques et membranaires est donc un autre niveau de régulation fonctionnelle des AQP1, dont il faut tenir compte. Cette hypothèse est actuellement explorée par l'équipe du Dr. Cecilia Cheung (Portland ; Oregon ; USA) avec laquelle nous collaborons. De façon surprenante, à titre d'exemple l'AQP9 présente une expression majoritairement localisée au sein du cytosol des membranes fœtales et donc se pose la question de sa fonctionnalité pour un transfert d'eau trans-cellulaire au niveau des membranes fœtales. Le deuxième axe de réflexion est de mettre en parallèle les résultats obtenus sur les niveaux d'expression protéique des AQP1 au sein des membranes fœtales et ceux au sein du liquide amniotique (travail collaboratif en cours avec le Pr. Guibourdenche, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes). Une corrélation entre le tissu et le compartiment liquidien permettrait d'avoir accès plus aisément (via des prélèvements de LA par amniocentèse) au niveau d'expression physiologique de ces différentes AQP1 à comparer avec celui du LA prélevé lors de pathologies obstétricales. Le fait que plusieurs AQP1 soient

exprimées aux mêmes temps de gestation, pose la question du rôle spécifique de chacune d'entre elles : substrats spécifiques, cinétique de transfert aqueux différents, régulations différentielles ou alors expression basale et/ou inductible. La notion de redondance fonctionnelles se pose également sachant qu'à l'heure actuelle seule l'AQP1 semble non supplée puisque le KO murin présente des dysfonctionnements de régulation du volume amniotique.

Bien qu'exprimées de façon continue, ces aquaporines présentent des niveaux d'expression variables en fonction du stade de gestation. Cette variabilité suggère une régulation transcriptionnelle fine par des acteurs, ou par une combinaison d'acteurs, variant au cours de la grossesse. La suite de ce travail a donc consisté à étudier la régulation de l'expression de l'AQP3 par les rétinoïdes dans les membranes fœtales humaines. Nous avons ainsi démontré que l'expression de cette aquaporine était modulée positivement en présence de $1\mu\text{M}$ d'ARtt, par l'intermédiaire du récepteur nucléaire $\text{RAR}\alpha$. Nous avons ensuite identifié trois RAREs type DR5 impliqués dans la fixation de l'hétérodimère $\text{RAR}\alpha/\text{RXR}\alpha$ et donc dans la modulation de l'expression du gène de l'AQP3. Par cette régulation, l'acide rétinoïque pourrait avoir un rôle morphogénique indirect car modulant les quantités de volume amniotique et donc la pression sur le fœtus, dont le développement est connu comme sensible à ce phénomène physique. Par ce mécanisme d'action particulier, l'acide rétinoïque établirait un deuxième contrôle puisque ce morphogène est d'abord connu pour réguler directement des gènes et des mécanismes impliqués dans le développement fœtal.

Un accroissement de l'expression des AQPs au sein des membranes fœtales dans le polyhydramnios idiopathique a déjà été rapporté (148), (157), (151). Par ailleurs, l'association fréquente du polyhydramnios au diabète est connue (16), (158). Par contre, le rôle des

membranes fœtales via les aquaporines dans la régulation du volume amniotique chez la femme enceinte diabétique n'a jamais été investigué, excepté dans une récente publication sur une petite cohorte de diabète gestationnel (153). Suite à ces observations, nous avons pour la première fois établi un profil d'expression des gènes des AQP au sein des membranes fœtales issues de grossesses de femmes diabétiques (DT1, DT2 et DG), puis mis en évidence le rôle de l'insuline dans l'expression des aquaglycéroporines au sein de ces membranes. Pour cela 129 membranes fœtales ont été collectées issues de mères réparties dans 4 groupes : témoin, DT1, DT2 et DG.

Premièrement, nous avons démontré qu'il n'y avait pas de modification d'expression ARN qualitative des gènes des 13 aquaporines au sein de ces membranes (pas d'effet on-off). En effet les gènes des AQPs 1, 3, 8, 9 et 11 s'expriment toujours et ceux des AQPs 2, 4, 5, 6, 7, 10 et 12 ne s'expriment pas. Les ARNm des gènes des AQPs 1, 3, 8 et 9 (exprimées à la surface des membranes plasmiques des cellules) ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. L'AQP11, protéine présente au niveau intracellulaire (principalement dans le réticulum endoplasmique) (41) n'a pas été étudiée. Il ressort de cette étude un profil ARN quantitatif similaire pour, d'un côté, les aquaporines classiques 1 et 8 (sans différence d'expression significatives entre les 4 groupes), et de l'autre les aquaglycéroporines 3 et 9. L'expression des transcrits des aquaglycéroporines est, en effet, plus faible dans les membranes fœtales issues de grossesses de femmes diabétiques avec une diminution significative dans les groupes DT2 (pour AQP3) et DG (pour AQP3 et 9). Cette baisse significative d'expression se retrouve au niveau protéique pour l'AQP3 mais pas pour l'AQP9. Ceci peut s'expliquer par des répartitions cytosoliques et membranaires différentes entre l'AQP3 et l'AQP9.

Cette baisse d'expression des gènes des AQPs 3 et 9 dans les membranes fœtales issues de femmes atteintes de DT2 ou de DG fait poser la question d'une implication de l'insuline. En effet, l'insulinorésistance et l'hyperinsulinisme sont des caractères physiopathologiques

communs au DT2 et au DG (159), (4). Le rôle répresseur de l'insuline sur l'expression de certaines aquaglycéporines a déjà été démontré sur des tissus essentiels au métabolisme glucidique (139), (136), (160). Cette régulation aboutit à l'inactivation du facteur de transcription Forkhead box a2 (Foxa2) qui se fixe normalement sur un élément de réponse à l'insuline sur le promoteur des gènes des AQP3 (137) et 9 (161). L'AQP9 a été également décrite comme réprimée par l'insuline dans le placenta (162). En plus des arguments physiopathologiques et bibliographiques pour un rôle de l'insuline dans la baisse d'expression des AQP3 et 9 dans les membranes fœtales issues des femmes des groupes DT2 et DG, il a été observé d'autres résultats sur notre cohorte de 129 membranes argumentant notre hypothèse. En effet, dans le groupe DG, il est constaté une baisse d'expression ARN et protéique significative des gènes des AQP3 et 9 dans le sous-groupe traité par un régime avec insuline en comparaison du sous-groupe traité par un régime seul. De plus, il est constaté une baisse d'expression ARN et protéique significative des gènes des AQP3 et 9 dans le sous-groupe des membranes fœtales issues de femmes obèses en comparaison du sous-groupe des membranes fœtales issues de femmes non obèses. L'hyperinsulinisme est retrouvé dans l'obésité (159).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mis en culture des explants de chorion et d'amnion, issus d'une grossesse non pathologique, en présence ou non d'insuline. La comparaison de l'expression ARN des gènes AQP3 et AQP9, entre les explants traités ou non, ne montre aucune différence sur le chorion. Mais, sur l'amnion nous confirmons l'effet attendu de l'insuline, puisque au bout de 48 heures de culture, les deux aquaglycéporines ont leurs transcriptions réprimées à l'échelle ARN et à l'échelle protéique. Cet effet de l'insuline est inhibé par un inhibiteur de la PI3K, le LY294002. Le LY294002 permet même une surexpression ARN des AQP3 et 9. Cela démontre que l'effet répresseur de l'insuline sur la transcription des gènes AQP3 et AQP9 passe par la voie de signalisation de son récepteur. Un

test fonctionnel *in vitro* a été réalisé en présence ou non d'insuline et nous a permis de démontrer que l'insuline diminue l'absorption des molécules de glycérol par l'amnion. La disparition de cet effet de l'insuline en présence de chlorure de mercure (HgCl₂), un inhibiteur non spécifique des perméases membranaires, comprenant les AQP3 et 9 (41), valide techniquement ce test.

Même si Zhang et al. (156) évoquent une répression des AQP3 et 9 par l'insuline dans l'amnion sur les données bibliographiques évoquées précédemment dans d'autres tissus, cela n'avait jamais été démontré. Dans ce contexte, en plus de le démontrer, nous avons étudié le profil de phosphorylation de plusieurs acteurs de la voie de signalisation de l'insuline dans l'amnion. Ainsi, en présence d'insuline, il est mis en évidence une augmentation de la phosphorylation des protéines AKT sur la sérine 473, GSK3 β sur la sérine 9, GSK3 α sur la sérine 21, p70S6K sur la thréonine 412, TSC2 sur la sérine 939. Pour ces 5 protéines, cet effet de l'insuline disparaît en présence d'un inhibiteur de PI3K. Les connaissances actuelles sur la voie de signalisation des récepteurs de l'insuline et d'IGF1 expliquent ces résultats (163). En effet, la fixation de l'insuline sur un de ces deux récepteurs va conduire à une phosphorylation activatrice de PI3K conduisant à la formation de phosphatidyl-inositol triphosphate qui va permettre la phosphorylation activatrice de AKT via PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). AKT va ensuite pouvoir phosphoryler plusieurs protéines dont GSK3 (phosphorylations inhibitrices permettant la synthèse de glycogène) ou TSC2. La phosphorylation de TSC2 va permettre l'activation du complexe mTOR (mammalian target of rapamycin) qui va ensuite phosphoryler p70S6K. L'inhibition de la PI3K supprime donc l'effet de l'insuline sur AKT, GSK3, TSC2 et p70S6K. Il semble que l'insuline agisse sur l'amnion préférentiellement via le récepteur d'IGF1 dont elle est également le substrat (163). En effet, bien que nous ayons mis en évidence l'expression des ARNm du récepteur de l'insuline et de ses deux principaux substrats (IRS1 et IRS2) au niveau de l'amnion, nous

n'avons pas pu étudier le profil de phosphorylation du récepteur de l'insuline en présence de son substrat (formes phosphorylées et totales non décelables). Cette faible quantité de récepteur de l'insuline dans l'amnion a déjà été décrite (164). En revanche, il a été observé dans l'amnion une importante augmentation de la phosphorylation des tyrosines 1135 et 1136 du récepteur IGF1 (d'un facteur 28) de manière LY294002 indépendante en présence d'insuline.

Les résultats de nos expériences *in vitro* confirment notre hypothèse, à savoir une répression de l'expression des aquaglycéroporines 3 et 9 par l'insuline au niveau des membranes fœtales. Cet effet serait ainsi d'autant plus visible dans un contexte de DT2 ou DG associé à une hyperinsulinémie. Nous pensons que ces membranes issues de grossesses de DT2 et DG restent sensibles à l'insuline et ne souffrent pas des mécanismes de résistance décrits pour d'autres tissus. En effet, leur nature est hybride, à la fois d'origine maternelle et paternelle. En outre, dans notre étude, le profil d'expression en ARN des AQP3 et 9 montre une inhibition dans ce contexte d'hyperinsulinémie, alors que la littérature décrit une élévation des taux dans les tissus insulino-résistants (139). Ces membranes fœtales apparaissent donc comme des victimes collatérales, sensibles à l'hyperinsulinisme ambiant en modulant l'expression de leurs AQP3, sans pour autant intervenir de façon majeure dans le métabolisme du glycérol. Une observation similaire a été réalisée dans le placenta de femmes obèses où il a été mis en évidence une surexpression de la voie mTOR (165). Nous émettons l'hypothèse que par une forte imprégnation insulinique, les aquaglycéroporines sont réprimées au niveau de l'amnion, et contribuent alors à la rétention de liquide amniotique. Cette rétention, surajoutée à la polyurie fœtale, pourrait contribuer au maintien du polyhydramnios.

En conclusion, nos résultats obtenus dans notre travail ouvrent des perspectives :

~ d'ordre diagnostique, en proposant d'établir des niveaux d'expression des AQP3 entre des grossesses physiologiques et pathologiques ; et ce au sein du liquide amniotique si ce dernier est un reflet fidèle de l'expression des membranes fœtales.

~ d'ordre thérapeutique, en identifiant des cibles moléculaires, les AQP3, dont le niveau d'expression protéique est anormal lors d'une pathologie dérégulant le volume de liquide amniotique. Il serait intéressant par exemple de voir l'effet de l'acide rétinoïque sur l'expression anormalement basse de l'AQP3 dans le cadre d'hyperinsulinémisme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kawasaki E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Pediatr Endocrinol Case Rep Clin Investig Off J Jpn Soc Pediatr Endocrinol*. 2014 Oct;23(4).
2. Peacock AS, Bogossian F, McIntyre HD, Wilkinson S. A review of interventions to prevent Type 2 Diabetes after Gestational Diabetes. *Women Birth J Aust Coll Midwives*. 2014 Dec;27(4).
3. 12. Management of Diabetes in Pregnancy. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38(Supplement 1).
4. Vambergue A, Valat AS, Dufour P, Cazaubiel M, Fontaine P, Puech F. [Pathophysiology of gestational diabetes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2002 Oct;31(6 Suppl).
5. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jan;87(1).
6. Lepercq J. [Obstetrical management of pregestational diabetes mellitus]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2002 Oct;31(6 Suppl):4S11–4S7.
7. Hillman N, Herranz L, Vaquero PM, Villarroel A, Fernandez A, Pallardo LF. Is pregnancy outcome worse in type 2 than in type 1 diabetic women? *Diabetes Care*. 2006 Nov;29(11):2557–8.
8. Bell R, Bailey K, Cresswell T, Hawthorne G, Critchley J, Lewis-Barned N. Trends in prevalence and outcomes of pregnancy in women with pre-existing type I and type II diabetes. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2008 Mar;115(4):445–52.
9. Wahabi HA, Alzeidan RA, Bawazeer GA, Alansari LA, Esmaeil SA. Preconception care for diabetic women for improving maternal and fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2010;10.
10. Lassmann-Vague V, Basdevant A, Cathelineau G, Fenichel P, Laborde D, Mouroux D, et al. [Pregnancy and contraception in the diabetic woman. Gestational diabetes. Recommendations of ALFEDIAM (French Language Association for the Study of Diabetes and Metabolic Diseases)]. *Diabetes Metab*. 1996 Dec;22(6):459–69.
11. Jacqueminet S, Jannot-Lamotte M-F. [Management of gestational diabetes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2010 Dec;39(8 Suppl 2):S251–63.
12. Kinsley B. Achieving better outcomes in pregnancies complicated by type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther*. 2007;29 Suppl D:S153–60.
13. Ali S, Dornhorst A. Diabetes in pregnancy: health risks and management. *Postgrad Med J*. 2011 Jun;87(1028):417–27.
14. Hillman N, Herranz L, Vaquero PM, Villarroel A, Fernandez A, Pallardo LF. Is pregnancy outcome worse in type 2 than in type 1 diabetic women? *Diabetes Care*. 2006 Nov;29(11):2557–8.
15. Mahieu-Caputo D, Sentilhes L, Popovic I, Marpeau L, Descamps P, Madelenat P. *Physiologie du liquide amniotique*. EMC. Elsevier Masson SAS. 2008;
16. Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol*. 2008 Aug;32(4):288–94.
17. Idris N, Wong SF, Thomae M, Gardener G, McIntyre DH. Influence of polyhydramnios on perinatal outcome in pregestational diabetic pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Sep;36(3):338–43.
18. Pasquier J-C, Doret M. [Fetal membranes: embryological development, structure and the physiopathology of the preterm premature rupture of membranes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2008 Oct;37(6):579–88.
19. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*. 1998 Jan;19(1):1-11.
20. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000 May 18;342(20):1500–7.
21. Kendal-Wright CE. Stretching, mechanotransduction, and proinflammatory cytokines

- in the fetal membranes. *Reprod Sci* Thousand Oaks Calif. 2007 Dec;14(8 Suppl).
22. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;15:88-99.
 23. Sangwan VS, Basu S. Antimicrobial properties of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol*. 2011 Jan;95(1):1-2.
 24. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001 Apr;85(4):444-9.
 25. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007 Mar;28(2-3):161-9.
 26. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Nov;191(5):1678-87.
 27. Smith R. Parturition. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):271-83.
 28. Whittle WL, Patel FA, Alfaidy N, Holloway AC, Fraser M, Gyomerey S, et al. Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biol Reprod*. 2001 Apr;64(4):1019-32.
 29. Alvi SA, Brown NL, Bennett PR, Elder MG, Sullivan MH. Corticotrophin-releasing hormone and platelet-activating factor induce transcription of the type-2 cyclo-oxygenase gene in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod*. 1999 May;5(5):476-80.
 30. Johnson RF, Mitchell CM, Clifton V, Zakar T. Regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (PGDH) gene activity, messenger ribonucleic acid processing, and protein abundance in the human chorion in late gestation and labor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Nov;89(11):5639-48.
 31. Li W, Challis JRG. Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6569-74.
 32. Bryant-Greenwood GD, Millar LK. Human fetal membranes: their preterm premature rupture. *Biol Reprod*. 2000 Dec;63(6):1575-9.
 33. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod*. 1997 Apr;56(4):800-11.
 34. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod*. 1997 Apr;56(4):812-20.
 35. McLaren J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Jan;14(1):237-41.
 36. Liu H, Zheng Z, Wintour EM. Aquaporins and fetal fluid balance. *Placenta*. 2008 Oct;29(10):840-7.
 37. Beall MH, van den Wijngaard JPHM, van Gemert MJC, Ross MG. Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta*. 2007 Sep;28(8-9):824-32.
 38. Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta*. 2007 Jun;28(5-6):421-8.

39. Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004 Aug 20;43(33):4278–90.
40. Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R. The aquaporins. *Genome Biol.* 2006;7(2):206.
41. Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol.* 2009 Apr;13(2):107–17.
42. Damiano AE. Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2011 Mar;32 Suppl 2:S207–11.
43. Ishibashi K. New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(190):251–62.
44. King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep;5(9):687–98.
45. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem.* 1994 May 20;269(20):14648–54.
46. Asai M, Higuchi S, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Hirano K. Regulators for blood glucose level affect gene expression of aquaporin 3. *Biol Pharm Bull.* 2006 May;29(5):991–6.
47. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle Georget Tex.* 2011 May 15;10(10):1548–56.
48. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Stols AL. Lens membranes II. Isolation and characterization of the main intrinsic polypeptide (MIP) of bovine lens fiber membranes. *Exp Eye Res.* 1976 Sep;23(3):365–71.
49. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 1992 Apr 17;256(5055):385–7.
50. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, et al. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol.* 1993 Oct;265(4 Pt 2):F463–76.
51. Lin H, Hejtmancik JF, Qi Y. A substitution of arginine to lysine at the COOH-terminus of MIP caused a different binocular phenotype in a congenital cataract family. *Mol Vis.* 2007;13:1822–7.
52. Okamura T, Miyoshi I, Takahashi K, Mototani Y, Ishigaki S, Kon Y, et al. Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice. *Genomics.* 2003 Apr;81(4):361–8.
53. Shiels A, Bassnett S. Mutations in the founder of the MIP gene family underlie cataract development in the mouse. *Nat Genet.* 1996 Feb;12(2):212–5.
54. Francis P, Chung JJ, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, et al. Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet.* 2000 Sep 22;9(15):2329–34.
55. Farjo R, Peterson WM, Naash MI. Expression profiling after retinal detachment and reattachment: a possible role for aquaporin-0. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Feb;49(2):511–21.
56. Iandiev I, Pannicke T, Hartig W, Grosche J, Wiedemann P, Reichenbach A, et al. Localization of aquaporin-0 immunoreactivity in the rat retina. *Neurosci Lett.* 2007 Oct 16;426(2):81–6.
57. Schnermann J, Chou CL, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9660–4.
58. Oshio K, Watanabe H, Yan D, Verkman AS, Manley GT. Impaired pain sensation in mice lacking Aquaporin-1 water channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):1022–8.

59. Ma T, Jayaraman S, Wang KS, Song Y, Yang B, Li J, et al. Defective dietary fat processing in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jan;280(1):C126–34.
60. Zhang D, Vetrivel L, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. *J Gen Physiol*. 2002 Jun;119(6):561–9.
61. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005 Jan;19(1):76–8.
62. Mann SE, Ricke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Jun;192(6):2041–4; discussion 2044–6.
63. Herrera M, Garvin JL. Aquaporins as gas channels. *Pflugers Arch*. 2011 Oct;462(4):623–30.
64. Wang Y, Cohen J, Boron WF, Schulten K, Tajkhorshid E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. *J Struct Biol*. 2007 Mar;157(3):534–44.
65. Herrera M, Garvin JL. Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 May;292(5):F1443–51.
66. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):786–92.
67. Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon T-H, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):205–44.
68. Taguchi D, Takeda T, Kakigi A, Takumida M, Nishioka R, Kitano H. Expressions of aquaporin-2, vasopressin type 2 receptor, transient receptor potential channel vanilloid (TRPV)1, and TRPV4 in the human endolymphatic sac. *The Laryngoscope*. 2007 Apr;117(4):695–8.
69. Domeniconi RF, Orsi AM, Justulin LAJ, Leme Beu CC, Felisbino SL. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res*. 2008 May;332(2):329–35.
70. Inase N, Fushimi K, Ishibashi K, Uchida S, Ichioka M, Sasaki S, et al. Isolation of human aquaporin 3 gene. *J Biol Chem*. 1995 Jul 28;270(30):17913–6.
71. Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, et al. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):C1332–45.
72. Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, et al. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol*. 1995 Nov;269(5 Pt 2):F663–72.
73. Roudier N, Bailly P, Gane P, Lucien N, Gobin R, Cartron J-P, et al. Erythroid expression and oligomeric state of the AQP3 protein. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):7664–9.
74. Mann SE, Ricke EA, Yang BA, Verkman AS, Taylor RN. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Oct;187(4):902–7.
75. Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins--new players in cancer biology. *J Mol Med Berl Ger*. 2008 May;86(5):523–9.
76. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch*. 2008 Jul;456(4):693–700.
77. Guerin CF, Regli L, Badaut J. [Roles of aquaporins in the brain]. *Med Sci MS*. 2005 Sep;21(8-9):747–52.

78. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Apr;14(4):265–77.
79. Saikali P, Cayrol R, Vincent T. Anti-aquaporin-4 auto-antibodies orchestrate the pathogenesis in neuromyelitis optica. *Autoimmun Rev*. 2009 Dec;9(2):132–5.
80. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem*. 1995 Jan 27;270(4):1908–12.
81. Krane CM, Towne JE, Menon AG. Cloning and characterization of murine Aqp5: evidence for a conserved aquaporin gene cluster. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. 1999 May;10(5):498-505.
82. Soyfoo MS, Konno A, Bolaky N, Oak JS, Fruman D, Nicaise C, et al. Link between inflammation and aquaporin-5 distribution in submandibular gland in Sjogren's syndrome? *Oral Dis*. 2012 Sep;18(6):568–74.
83. Funaki H, Yamamoto T, Koyama Y, Kondo D, Yaoita E, Kawasaki K, et al. Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 1):C1151–7.
84. Parvin MN, Kurabuchi S, Murdiastuti K, Yao C, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, et al. Subcellular redistribution of AQP5 by vasoactive intestinal polypeptide in the Brunner's gland of the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jun;288(6):G1283–91.
85. Kumari SS, Varadaraj M, Yerramilli VS, Menon AG, Varadaraj K. Spatial expression of aquaporin 5 in mammalian cornea and lens, and regulation of its localization by phosphokinase A. *Mol Vis*. 2012;18:957–67.
86. Procino G, Mastrofrancesco L, Sallustio F, Costantino V, Barbieri C, Pisani F, et al. AQP5 is expressed in type-B intercalated cells in the collecting duct system of the rat, mouse and human kidney. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2011;28(4):683–92.
87. Zhang Z, Chen Z, Song Y, Zhang P, Hu J, Bai C. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. *J Pathol*. 2010 Jun;221(2):210–20.
88. Chae YK, Woo J, Kim M-J, Kang SK, Kim MS, Lee J, et al. Expression of aquaporin 5 (AQP5) promotes tumor invasion in human non small cell lung cancer. *PloS One*. 2008;3(5):e2162.
89. Jung HJ, Park J-Y, Jeon H-S, Kwon T-H. Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells. *PloS One*. 2011;6(12):e28492.
90. Chae YK, Kang SK, Kim MS, Woo J, Lee J, Chang S, et al. Human AQP5 plays a role in the progression of chronic myelogenous leukemia (CML). *PloS One*. 2008;3(7):e2594.
91. Kang SK, Chae YK, Woo J, Kim MS, Park JC, Lee J, et al. Role of human aquaporin 5 in colorectal carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2008 Aug;173(2):518–25.
92. Ma T, Frigeri A, Skach W, Verkman AS. Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Dec 15;197(2):654–9.
93. Ma T, Yang B, Kuo WL, Verkman AS. cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13. *Genomics*. 1996 Aug 1;35(3):543–50.
94. Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39873–9.
95. Jeremic A, Cho WJ, Jena BP. Involvement of water channels in synaptic vesicle swelling. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2005 Oct;230(9):674–80.
96. Iandiev I, Dukic-Stefanovic S, Hollborn M, Pannicke T, Hartig W, Wiedemann P, et

- al. Immunolocalization of aquaporin-6 in the rat retina. *Neurosci Lett*. 2011 Feb 25;490(2):130–4.
97. Laforenza U, Gastaldi G, Polimeni M, Tritto S, Tosco M, Ventura U, et al. Aquaporin-6 is expressed along the rat gastrointestinal tract and upregulated by feeding in the small intestine. *BMC Physiol*. 2009;9:18.
98. Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S, Shimono M, Satoh K, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. Presence and localization of aquaporin-6 in rat parotid acinar cells. *Cell Tissue Res*. 2008 Apr;332(1):73-80.
99. Taguchi D, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Nishioka R, Kitano H. Expression and immunolocalization of aquaporin-6 (Aqp6) in the rat inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2008 Aug;128(8):832–40.
100. Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, et al. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15;272(33):20782–6.
101. Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, et al. Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec 8;241(1):53–8.
102. Saito K, Kageyama Y, Okada Y, Kawakami S, Kihara K, Ishibashi K, et al. Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 1):2073–6.
103. Moretti E, Terzuoli G, Mazzi L, Iacoponi F, Collodel G. Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2012 Jun;58(3):129–35.
104. Sohara E, Ueda O, Tachibe T, Hani T, Jishage K, Rai T, et al. Morphologic and functional analysis of sperm and testes in Aquaporin 7 knockout mice. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):671–6.
105. Yeung C-H, Callies C, Rojek A, Nielsen S, Cooper TG. Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod*. 2009 Feb;80(2):350–7.
106. Kondo H, Shimomura I, Kishida K, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, et al. Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur J Biochem FEBS*. 2002 Apr;269(7):1814–26.
107. Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22;280(16):15493–6.
108. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):10993–8.
109. Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Physiological roles of AQP7 in the kidney: Lessons from AQP7 knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1758(8):1106–10.
110. Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, Tohsaka A, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Aug 28;237(3):714–8.
111. Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, et al. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30329–33.
112. Calamita G, Ferri D, Gena P, Liquori GE, Cavalier A, Thomas D, et al. The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17149–53.
113. Yang B, Zhao D, Verkman AS. Evidence against functionally significant aquaporin

- expression in mitochondria. *J Biol Chem*. 2006 Jun 16;281(24):16202–6.
114. Soria LR, Fanelli E, Altamura N, Svelto M, Marinelli RA, Calamita G. Aquaporin-8-facilitated mitochondrial ammonia transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 5;393(2):217–21.
115. Molinas SM, Trumper L, Marinelli RA. Mitochondrial aquaporin-8 in renal proximal tubule cells: evidence for a role in the response to metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Aug 1;303(3):F458–66.
116. Benga O, Huber VJ. Brain water channel proteins in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2012 Dec;33(5-6):562–78.
117. Kobayashi K, Yasui M. Cellular and subcellular localization of aquaporins 1, 3, 8, and 9 in amniotic membranes during pregnancy in mice. *Cell Tissue Res*. 2010 Nov;342(2):307–16.
118. Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA, Ross MG. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Nov;185(5):1226–31.
119. Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 6;244(1):268–74.
120. Rojek AM, Skowronski MT, Fuchtbauer E-M, Fuchtbauer AC, Fenton RA, Agre P, et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3609–14.
121. Leung J, Pang A, Yuen W-H, Kwong Y-L, Tse EWC. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):740–6.
122. Wang S, Chen J, Beall M, Zhou W, Ross MG. Expression of aquaporin 9 in human chorioamniotic membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Dec;191(6):2160–7.
123. Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, et al. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Oct 5;287(4):814–9.
124. 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 Jul 19;1576(3):335–40.
125. Morinaga T, Nakakoshi M, Hirao A, Imai M, Ishibashi K. Mouse aquaporin 10 gene (AQP10) is a pseudogene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 14;294(3):630–4.
126. Wang W, Hart PS, Piesco NP, Lu X, Gorry MC, Hart TC. Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues. *Calcif Tissue Int*. 2003 Mar;72(3):222–7.
127. Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, et al. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(17):7770–9.
128. Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem*. 2006;7:14.
129. Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita Y. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Mar;300(3):R566–76.
130. Noda Y, Sasaki S. Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1758(8):1117–25.
131. Bustamante M, Hasler U, Kotova O, Chibalin AV, Mordasini D, Rousselot M, et al. Insulin potentiates AVP-induced AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Feb;288(2):F334–44.

132. Kwon T-H, Nielsen J, Masilamani S, Hager H, Knepper MA, Frokiaer J, et al. Regulation of collecting duct AQP3 expression: response to mineralocorticoid. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Dec;283(6):F1403–21.
133. Stoenoiu MS, Ni J, Verkaeren C, Debaix H, Jonas J-C, Lameire N, et al. Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2003 Mar;14(3):555–65.
134. Moon C, King LS, Agre P. Aqp1 expression in erythroleukemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1562–70.
135. Ben Y, Chen J, Zhu R, Gao L, Bai C. Upregulation of AQP3 and AQP5 induced by dexamethasone and ambroxol in A549 cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Apr 30;161(2):111–8.
136. Liu H, Mei Z-C, Xiao X. [Effects of insulin and LY294002 inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi Zhonghua Ganzangbing Zazhi Chin J Hepatol*. 2010 Jun;18(6):455–8.
137. Higuchi S, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Kiho T, Hirano K. Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin. *J Cell Biochem*. 2007 Nov 1;102(4):1051–8.
138. Okahira M, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Hirano K. Regulation of aquaporin 3 expression by magnesium ion. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jun 24;588(1):26–32.
139. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rotellar F, Valenti V, et al. Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Apr;96(4):E586–97.
140. Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2915–21.
141. Kishida K, Shimomura I, Kondo H, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, et al. Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36251–60.
142. Blanchon L, Marceau G, Borel V, Prat C, Herbet A, Bouvier D, et al. [Implications of retinoid pathway in human fetal membranes: study of target genes]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2011 Jun;39(6):370–2.
143. Bellemere G, Von Stetten O, Oddos T. Retinoic acid increases aquaporin 3 expression in normal human skin. *J Invest Dermatol*. 2008 Mar;128(3):542–8.
144. Umenishi F, Schrier RW. Induction of human aquaporin-1 gene by retinoic acid in human erythroleukemia HEL cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 10;293(3):913–7.
145. Wang S, Amidi F, Beall M, Gui L, Ross MG. Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture. *J Soc Gynecol Investig*. 2006 Apr;13(3):181–5.
146. Wang S, Amidi F, Yin S, Beall M, Ross MG. Cyclic adenosine monophosphate regulation of aquaporin gene expression in human amnion epithelia. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2007 Apr;14(3):234–40.
147. Qi H, Li L, Zong W, Hyer BJ, Huang J. Expression of aquaporin 8 is diversely regulated by osmotic stress in amnion epithelial cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009 Dec;35(6):1019–25.
148. Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, Taylor RN. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Mar;194(3):884–7.
149. Zhu X-Q, Jiang S-S, Zou S-W, Hu Y-C, Wang Y-H. [Expression of aquaporin 3 and

- aquaporin 9 in placenta and fetal membrane with idiopathic polyhydramnios.]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009 Dec;44(12):920–3.
150. Huang J, Qi H. [Expression of aquaporin 8 in human fetal membrane and placenta of idiopathic polyhydramnios]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009 Jan;44(1):19-22.
 151. Zhu X, Jiang S, Hu Y, Zheng X, Zou S, Wang Y, et al. The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios. *Early Hum Dev*. 2010 Oct;86(10):657–63.
 152. Zhu XQ, Jiang SS, Zhu XJ, Zou SW, Wang YH, Hu YC. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios. *Placenta*. 2009 Aug;30(8):670–6.
 153. Bednar AD, Beardall MK, Brace RA, Cheung CY. Differential expression and regional distribution of aquaporins in amnion of normal and gestational diabetic pregnancies. *Physiol Rep*. 2015 Mar;3(3):e12320.
 154. Marceau G, Gallot D, Borel V, Lemery D, Dastugue B, Dechelotte P, et al. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 11;346(4):1207–16.
 155. FOGH J, LUND RO. Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1957 Mar;94(3):532–7.
 156. Zhang Y, Ding S, Shen Q, Wu J, Zhu X. The expression and regulation of aquaporins in placenta and fetal membranes. *Front Biosci Landmark Ed*. 2012;17:2371–82.
 157. Zhu X-Q, Jiang S-S, Zou S-W, Hu Y-C, Wang Y-H. [Expression of aquaporin 3 and aquaporin 9 in placenta and fetal membrane with idiopathic polyhydramnios.]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009 Dec;44(12):920–3.
 158. Idris N, Wong SF, Thomae M, Gardener G, McIntyre DH. Influence of polyhydramnios on perinatal outcome in pregestational diabetic pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Sep;36(3):338–43.
 159. Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle Georget Tex*. 2014;13(16):2494–500.
 160. Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2915–21.
 161. Yokoyama Y, Iguchi K, Usui S, Hirano K. AMP-activated protein kinase modulates the gene expression of aquaporin 9 via forkhead box a2. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Nov;515(1-2):80–8.
 162. Castro Parodi M, Farina M, Dietrich V, Aban C, Szpilbarg N, Zotta E, et al. Evidence for insulin-mediated control of AQP9 expression in human placenta. *Placenta*. 2011 Dec;32(12):1050–6.
 163. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan;6(1).
 164. Wolf HJ, Desoye G. Immunohistochemical localization of glucose transporters and insulin receptors in human fetal membranes at term. *Histochemistry*. 1993 Nov;100(5):379–85.
 165. Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, Lager S, Jones HN, Roos S, et al. Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jan;98(1):105–13.

Résumé

Pendant la grossesse, les aquaporines (AQPs) exprimées au sein des membranes fœtales sont essentielles pour assurer l'homéostasie du volume de liquide amniotique (LA), mais leur régulation par l'insuline n'a jamais été explorée chez les femmes diabétiques.

Le but de notre étude était de préciser le rôle des AQPs 1, 3, 8 et 9 au sein des membranes fœtales chez des parturientes diabétiques et d'étudier la régulation de leur expression par l'insuline.

A partir des 129 membranes fœtales, réparties selon 4 populations (36 témoins, 35 diabètes de type 1 (DT1), 17 diabètes de type 2 (DT2) et 41 diabètes gestationnels (DG)), nous avons établi un profil d'expression qualitatif et quantitatif des gènes des AQPs. Dans un second temps, nous avons étudié la régulation par l'insuline de l'expression des AQPs 3 et 9 au sein d'explants d'amnion et de chorion.

L'expression ARN et protéique des AQPs au sein de nos différents fragments de membranes fœtales a été étudiée par RT-PCR quantitative et ELISA. Des membranes fœtales issues de grossesses non pathologiques, séparées en ses 2 feuillets (amnion et chorion), ont été utilisées pour étudier la régulation de l'expression des gènes des AQPs 3 et 9 par l'insuline ainsi que la voie de signalisation de l'insuline au sein de l'amnion. Un test au glycérol tritié a permis l'étude fonctionnelle de l'insuline sur les AQPs. Un inhibiteur de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) est utilisé pour analyser le signal intracellulaire de l'insuline.

L'expression du gène de l'AQP 3 est significativement plus faible dans les groupes DT2 et DG. Au sein d'explants de membranes fœtales non diabétiques, il a été observé au sein de l'amnion (mais pas du chorion), une répression significative par l'insuline de l'expression ARN et protéique des gènes AQPs 3 et 9 qui est bloquée par l'inhibiteur de PI3K.

Au sein des membranes fœtales, la répression de l'AQP 3 observée *in vivo*, est permise par l'hyperinsulinisme connu des patientes atteintes de DT2 ou de DG.

Mots clés : aquaporines, insuline, amnion, diabètes gestationnels

Abstract

During pregnancy, aquaporins (AQPs) expressed in fetal membranes are essential for controlling the homeostasis of the amniotic volume, but their regulation by insulin was never explored in diabetic women.

The aim of our study was to investigate the involvement of AQP 1, 3, 8, and 9 expressed in fetal membranes in diabetic parturient women, and the control of their expression by insulin.

From 129 fetal membranes in 4 populations, (controls, type 1 (T1D), type 2 (T2D) and gestational diabetes (GD)), we established an expression AQPs profile. In a 2nd step, the amnion was used to study control of the expression and functions of AQPs 3 and 9 by insulin.

The expression of transcripts and proteins of AQPs was studied by qRT-PCR and ELISA. We analysed the regulation by insulin of the expression of AQPs 3 and 9 in the amnion. A tritiated glycerol test enabled us to measure the impact of insulin on the functional characteristics. Using an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) we analysed the insulin intracellular signaling pathway.

Expression of AQP3 protein was significantly weaker in groups T2D and GD. In non-diabetic fetal membranes, we showed for the amnion (not for the chorion) a significant repression by insulin of the ARN expression of AQPs 3 and 9, which was blocked by PI3K inhibitor.

In fetal membranes, the repression of AQP3 protein expression and functions observed *in vivo* is allowed by the hyper-insulinism described in pregnant women with T2D or GD.

Key words: aquaporins, insulin, amnion, gestational diabetes