

# L'aquaporine 8 : nouvelle

**PIERRE-YVES MORVAN ET ROMUALD VALLÉE \***. *L'ammoniaporine, AQP8, a été mise en évidence dans l'épiderme. Elle pourrait être au centre du métabolisme de l'urée en favorisant l'entrée de l'ion ammonium dans la mitochondrie ou en favorisant son expression dans l'épiderme*

IL EST BIEN CONNU QUE L'URÉE A UNE ACTION HYDRATANTE sur la peau<sup>1,2</sup>. Elle est un composant majoritaire du facteur d'hydratation naturelle de la peau appelé NMF « Natural Moisturizing Factor<sup>3</sup> » et présent au niveau du *stratum corneum* (le NMF est composé de 7% d'urée). L'urée est produite dans la peau à partir d'ions ammonium qui circulent dans les cellules, et plus particulièrement dans les mitochondries, lors du cycle de l'urée. Ces ions ammonium joueraient donc un rôle primordial pour une bonne hydratation de la peau, or on ne connaît pas les transporteurs de ces ions, appelés aquaporines, dans la peau. Dans d'autres tissus, il a été mis en évidence des pores spécifiques les laissant entrer dans les cellules et plus particulièrement dans les mitochondries.

## Rôle des aquaporines

Les aquaporines sont des protéines membranaires intégrales qui servent de canaux pour le transport d'eau et de petits solutés, tels que le glycérol, à travers la membrane<sup>4</sup>. Elles ont donc un rôle essentiel dans les mécanismes d'absorption et d'excrétion de l'eau ainsi que dans l'homéostasie cellulaire. Les aquaporines sont constituées de six domaines transmembranaires délimitant un canal central, le tout présent dans la bicouche lipidique constituante de la membrane. Il existe treize isoformes d'aquaporines (AQP0-AQP12). Les aquaporines sont exprimées différemment dans de nombreux types de cellules et de tissus<sup>5</sup>.

Récemment, il a été découvert dans les cellules rénales et hépatiques une aquaporine particulière, baptisée AQP8, qui serait perméable à l'urée, et qui aurait un rôle de transporteur d'ions ammonium et de dérivés ammoniaqués. Elle jouerait ainsi un rôle sur la régulation du pH et de la pression osmotique<sup>6,7</sup> : il s'agirait donc d'une « ammoniaporine » plus qu'une aquaporine classique. Cette AQP8 vient d'être mise en évidence dans la membrane mitochondriale<sup>8</sup>, et pourrait donc avoir un rôle primordial dans le cycle de l'urée.

Au niveau de la peau, seules les AQP1, AQP3, AQP5, AQP7, AQP9 et AQP 10 ont été détectées<sup>9</sup>. L'expression d'AQP7 est restreinte aux adipocytes du tissu adipeux<sup>10</sup>.

Le rôle de l'AQP3 dans le maintien de l'hydratation a été très étudié<sup>11</sup>. Il a été montré que l'expression et la localisation cellulaire des aquaporines pouvaient influencer l'hydratation de la peau et le transport de l'eau, agissant ainsi sur la perte insensible en eau (PIE)<sup>12</sup>. La présence d'AQP8 dans la peau n'a jamais été démontrée jusqu'à présent ; si elle était présente dans la peau, elle serait fondamentale au bon maintien de l'hydratation cutanée.

\* Laboratoire des sciences du vivant, CODIF INTERNATIONAL

## A new target for cutaneous hydration: the aquaporine 8

The ammoniaporin, AQP8, has been identified in the epidermis. It could be a key factor in the metabolism of urea, favoring the entry of the ammonium ion into the mitochondria or favoring its expression in the epidermis.

IT IS WELL-KNOWN THAT UREA HAS A MOISTURIZING ACTION on the skin<sup>1,2</sup>. In fact, urea is one of the main constituents in the skin's Natural Moisturizing Factor or NMF<sup>3</sup> present in the *stratum corneum* (NMF consists of 7% urea). Urea is produced in the skin from ammonium ions that circulate in cells, more specifically in the mitochondria, during the urea cycle.

Therefore, these ammonium ions would play a primary role in good skin moisturization, but the carriers of these ions in the skin are not known. In other tissues, specific pores allowing them to penetrate cells and more specifically the mitochondria, have been detected, named aquaporins.

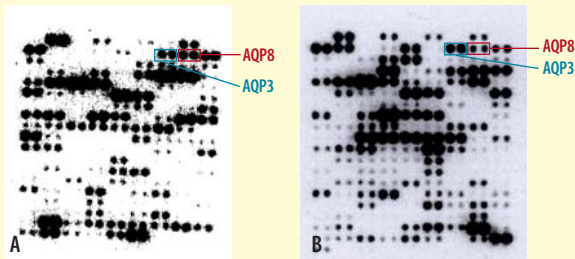
Aquaporins are integral membranous proteins serving as channels for carrying water and small solutes, such as glycerol, via the membrane<sup>4</sup>. Therefore, these aquaporins have an essential role in water absorption and excretion mechanisms and in cellular homeostasis. Aquaporins consist of six transmembranous domains delimiting a central channel, contained in the constituent dual lipid layer of the membrane. There are thirteen aquaporin isoforms (AQP0-AQP12). Aquaporins are expressed differently in many cell and tissue types<sup>5</sup>.

Recently, a specific aquaporin, called AQP8, was discovered in kidney and liver cells, which would appear to be permeable to urea, act as an ammonium ion and ammonia derivative carrier and also play a role in pH regulation and osmotic pressure<sup>6,7,8</sup>: therefore, it consists of an "ammoniaporin", rather than a conventional aquaporin. This AQP8 was recently detected in the mitochondrial membrane<sup>9</sup>, and, therefore, could have a primary role in the urea cycle.

In the skin, only AQP1, AQP3, AQP5, AQP7, AQP9 and AQP10 have

# cible pour l'hydratation cutanée

**Figure 1 – Détection des ARN des AQP3 et AQP8**  
*AQP3 and AQP8 mRNA detection*



Membrane pour les mini-chips permettant de visualiser des spots correspondant à la détection des ARNm de AQP3 et AQP8 parmi les ARNm extraits des kératinocytes humains normaux (A) et des épidermes humains reconstitués (B).

*Membrane for mini-chips used to view spots corresponding to AQP3 and AQP8 mRNA detection in mRNA extracted from normal human keratinocytes (A) and reconstituted human epidermis (B).*

## Résultats

### • Expression des ARNm AQP8 dans des kératinocytes

La technique des mini-chips a permis de mettre en évidence l'expression des ARNm de l'AQP8 dans les kératinocytes épidermiques humains normaux (NHEK) en culture (figure 1A), et dans les épidermes humains reconstitués (EHR) (figure 1B). Les ARNm de l'AQP3 étaient utilisés comme des contrôles de référence. Les RT-PCR ont confirmés l'expression des ARNm d'AQP8 dans les NHEK et les EHR.

### • Détection de la protéine AQP8 dans des kératinocytes

La présence de la protéine AQP8 a été mise en évidence dans l'épiderme de la peau humaine, et dans les épidermes humains reconstitués en culture, par une révélation immunohistochimique utilisant un anticorps spécifique de l'AQP8 (figure 2). L'AQP8 est exprimée au niveau de la membrane des cellules de la couche basale et au niveau du cytoplasme des cellules supra-basales. L'AQP8 ne semble pas exprimée au niveau des cellules de la couche granuleuse et de la couche cornée. La protéine AQP3 était utilisée comme marquage de référence. La localisation d'AQP3 au niveau des épidermes reconstitués est principalement membranaire, et au niveau des couches basales et supra-basales de l'épiderme. Une immunolocalisation plus précise de l'AQP8 a été

been detected (Boury-Jamot M. et al., 2006). The expression of AQP7 is restricted to adipocytes into adipose tissue<sup>10</sup>. The role of AQP3 in maintaining moisturization has been studied extensively<sup>11</sup>. In this way, it has been demonstrated that the cellular expression and location of aquaporins could influence skin moisturization and water transport and thus have an effect on trans-epidermal water loss (TEWL)<sup>12</sup>. The presence of AQP8 in skin has never previously been demonstrated; if it was present in the skin, it would be fundamental in maintaining satisfactory skin moisturization.

In order to evaluate AQP8 gene expression in the skin, experiments were conducted on normal human keratinocyte (NHEK) cultures, reconstituted human epidermis (RHE) and human adipocytes, differentiated or not.

## Results

### • AQP8 mRNA expression in keratinocytes

The mini-chip technique was used to detect AQP8 mRNA expression in normal human (NHEK) epidermal keratinocytes in culture (figure 1A) and in reconstituted human (EHR) epidermis (figure 1B). AQP3 mRNA was used as reference controls. The RT-

PCR analyses confirmed the expression of AQP8 mRNA in both NHEK and RHE.

### • AQP8 protein detection in keratinocytes

The presence of AQP8 protein was detected in the epidermis of human skin, and in reconstituted human epidermis in culture, by immunohistochemical detection using an AQP8-specific antibody (figure 2). AQP8 is expressed in the basal layer cell membrane and in the supra-basal cell cytoplasm. AQP8 does not appear to be expressed in the granular layer cell cytoplasm and in the corneal layer.

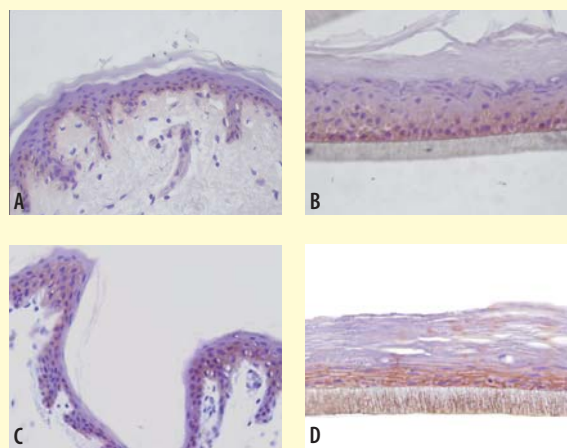
AQP3 protein was used for the reference staining. The localization of AQP3 on the level of the reconstituted epidermis is mainly membranous and on the level of the basal and supra-basal layers of the skin. A more precise immunolocalization of AQP8 was obtained in epidermis by

confocal microscopy (figure 3). It was also detected in keratinocytes in culture (NHEK) (Figure 4).

## Discussion-Conclusion

The presence of the ammoniaporin AQP8 in human skin is now demonstrated. This ammoniaporin had never previously been identified in skin. Its expression in skin represents a major discovery. It could be at the center of the metabolism of

**Figure 2 – Observations microscopiques des marquages de l'AQP8 (A-B) et de l'AQP3 (C-D)**  
*Microscopic observations of AQP8 (A-B) and AQP3 (C-D)*



Dans des fragments de peaux humaines (A-C) et des épidermes humains reconstitués (B-D).

*Staining in fragments of human skin (A-C) and reconstituted human epidermis (B-D).*

●●● obtenue dans des épidermes en microscopie confocale (figure 3). Elle a été également mise en évidence dans des kératinocytes en culture (NHEK) (figure 4).

### Discussion-Conclusion

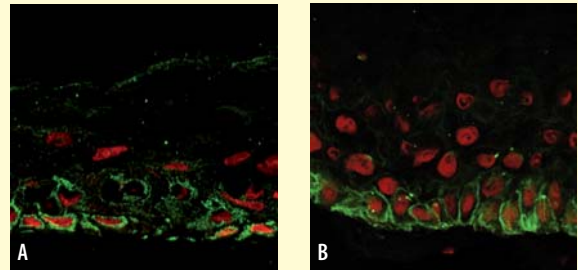
La présence de l'ammoniaporine AQP8 dans la peau humaine est désormais prouvée. Cette ammoniaporine n'avait jamais été identifiée dans la peau. Son expression cutanée constitue une découverte majeure. Elle pourrait être au centre du métabolisme de l'urée produite par la mitochondrie et constituante importante du NMF (Natural Moisturizing Factor) intervenant dans l'hydratation de la peau. L'AQP8 interviendrait donc dans le métabolisme de l'urée soit en favorisant l'entrée de l'ion ammonium dans la mitochondrie (l'AQP8 a été détectée dans la membrane mitochondriale), soit en favorisant son expression dans l'épiderme pour reconstituer le stock d'urée du NMF. Elle serait donc une composante essentielle dans l'hydratation de la peau.

Des travaux sont en cours pour sélectionner des extraits de plantes ou de substances qui régulent l'expression de l'AQP8 dans les cellules de la peau, et /ou qui ouvrent ou ferment ces canaux à ammonium.

### Références

1. Serup J. A double-blind comparison of two creams containing urea as the active ingredient. Assessment of efficacy and side-effects by non-invasive techniques and a clinical scoring scheme. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 177, 34-43 (1992).
2. Treffel P, Gabard B. Stratum corneum dynamic function measurements after moisturizer or irritant application. *Arch Dermatol Res*. 287, 474-479 (1995).
3. Marty JP. NMF and cosmetology of cutaneous hydration. *Ann Dermatol Venereol*. 129, 131-136 (2002).
4. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*. 118(Pt 15), 3225-32 (2005).
5. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in Histochemistry Cytochemistry*. 39(1), 1-83 (2004).
6. Jahn TP, Moller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kuhlbrandt W, Schjoerring JK. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett*. 574, 31-36 (2004).
7. Liu K, Nagase H, Huang CG, Calamita G, Agre P. Purification and functional characterization of aquaporin-8. *Biol Cell*. 98, 153-161 (2006).
8. Calamita Giuseppe, Ferri Domenico, Gena Patrizia, E. Liquori Giuseppa, Cavalier Annie, Thomas Daniel and Svelto Maria. The Inner Mitochondrial Membrane Has Aquaporin-8 Water Channels and Is Highly Permeable to Water. *J. Biol. Chem., Vol. 280, Issue 17, 17149-17153, (2005)*.
9. Boury-Jamot M, Sougrat R, Tailhardat M, Le Varlet B, Bonte F, Dumas M, Verbavatz JM. Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochim Biophys Acta*. 1758(8), 1034-42 (2006 Aug).
10. Kuriyama, H.; Kawamoto, S.; Ishida, N.; Ohno, I.; Mita, S.; Matsuzawa, Y.; Matsubara, K.; Okubo, K. Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 53-58, (1997).
11. Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem*. 47, 1275-1286 (1999).
12. Agren J, Zelenin S, Hakansson M, Eklof AC, Aperia A, Nejsum LN, Nielsen S, Sedin G. Transepidermal water loss in developing rats: role of aquaporins in the immature skin. *Pediatr Res*. 53, 558-565 (2003).

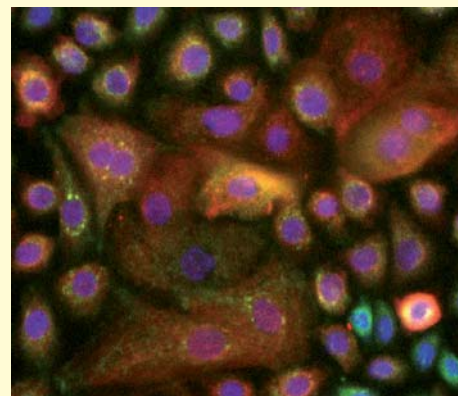
Figure 3 – Visualisation d'AQP-8 (A) et AQP3 (B) dans des épidermes reconstitués SkinEthic®  
Visualization of the AQP-8 (A) and AQP3 (B) on reconstituted SkinEthic® epidermis



En immunofluorescence, en microscopie confocale (24 heures de traitement, objectif x120). Les aquaporines sont marquées en vert (Alexa 488) et les noyaux en rouge (iodure de propidium).

By immunofluorescence, in confocal microscopy (24 hours treatment, objective x120). Aquaporins are stained in green (FITC) and nucleus in red (propidium iodure).

Figure 4 – Observations en microscopie à fluorescence du double marquage de l'AQP8 et des mitochondries dans des kératinocytes  
Fluorescence microscopy observations of double staining of AQP8 and mitochondria in normal human keratinocytes



Kératinocytes humains normaux (NHEK) en culture monocouche. Les mitochondries sont marquées en vert par Mitotracker Green, AQP8 en rouge et les noyaux en bleu.

Normal human keratinocytes (NHEK) in single-layer culture. The mitochondria are stained green with Mitotracker Green, AQP8 red and the nuclei blue.

●●● urea produced by the mitochondrion and a significant constituent of NMF (Natural Moisturizing Factor) involved in skin moisturization. Therefore, AQP8 would be involved in the urea metabolism either by promoting the penetration of the ammonium ion into the mitochondrion (AQP8 was detected in the mitochondrial membrane), or by promoting its expression in the epidermis to reconstitute the urea stock in NMF. Therefore, AQP8 would be an essential component in skin moisturization. Studies are actually conducted to select extracts of plants or substances which control the expression of the AQP8 in the skin cells, and/or which open or close these ammonium channels.