



**HAL**  
open science

## Aquaporine 4 dans l'oviducte de poule lors d'une pause de ponte induite par une privation alimentaire

Anna Hrabia, Joanna K. Socha, Noboru Saito, Malgorzata Grzesiak, Andrzej Sechman

► **To cite this version:**

Anna Hrabia, Joanna K. Socha, Noboru Saito, Malgorzata Grzesiak, Andrzej Sechman. Aquaporine 4 dans l'oviducte de poule lors d'une pause de ponte induite par une privation alimentaire. 2020, pp.89-99. hal-02926750

**HAL Id: hal-02926750**

**<https://hal.science/hal-02926750>**

Submitted on 1 Sep 2020

**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.

# Aquaporine 4 dans l'oviducte de poule lors d'une pause de ponte induite par une privation alimentaire

Comptes Rendus Biologies 343 (2020) 89-99

Anna Hrabia ; Joanna K. Socha ; Noboru Saito ; Malgorzata Grzesiak ; Andrzej Sechman

## Résumé

Dans la présente étude, nous posons l'hypothèse que l'expression de l'aquaporine 4 (AQP4) dans l'oviducte de poule changerait pendant une pause lors de la ponte induite par un jeûne. Ainsi, le but de notre expérimentation était de déterminer l'expression de l'ARNm et de la protéine AQP4 ainsi que son immunolocalisation dans l'oviducte de poule au cours de la régression. L'expérience a été réalisée sur des poules pondeuses soumises à une pause de ponte induite par une privation alimentaire pendant 5 jours. Les poules témoins ont été nourries *ad libitum*. Les oiseaux ont été sacrifiés au jour 6 de l'expérience et tous les segments de l'oviducte ont été isolés, à savoir l'infundibulum, le magnum, l'isthme, la glande coquillière, et le vagin. Les expressions géniques et protéiques d'AQP4 dans ces tissus ont été testées respectivement par PCR en temps réel et Western blot. L'expression relative d'ARNm d'AQP4 était la plus élevée dans l'infundibulum et le vagin et la plus faible et la moins détectable dans le magnum. Le niveau de la protéine AQP4 était le plus élevé dans l'infundibulum et le plus bas dans le magnum. Le jeûne a entraîné une diminution de l'expression de l'ARNm AQP4 ( $P < 0,001$ ) dans l'infundibulum, une diminution de l'abondance des protéines ( $P < 0,01$ ) dans la glande coquillière et une augmentation du niveau de protéines ( $P < 0,001$ ) dans le vagin. L'immunohistochimie a démontré une localisation dépendante des tissus et des cellules de la protéine AQP4 dans la paroi oviductale. L'intensité de la coloration était la suivante : infundibulum > glande coquillière > vagin  $\geq$  isthme  $\gg$  magnum. Chez les poules témoins, l'immunoréactivité de l'AQP4 dans le vagin était similaire, tandis que dans d'autres segments oviductaux, l'immunoréactivité était plus forte par rapport aux poulets soumis à une pause de ponte. En résumé, ces résultats suggèrent que l'AQP4 est une protéine essentielle impliquée dans la régulation du transport de l'eau nécessaire pour créer un micro-environnement approprié pour la fécondation et la formation d'œufs dans l'oviducte de poule.

## Points forts

- L'AQP4 est exprimé dans les parties oviductales du poulet.
- La famine diminue l'ARNm AQP4 dans l'infundibulum et la protéine AQP4 dans la glande coquille.
- L'immunoréactivité de l'AQP4 dépend du tissu oviductal et de la section.
- L'AQP4 peut réguler la fonction oviductale et la régression.

## 1. Introduction

Chez la poule domestique, un oviducte comprend cinq segments morphologiquement et fonctionnellement différents: l'infundibulum, le magnum, l'isthme, la glande coquille et le vagin. La fonction de l'infundibulum est d'engloutir l'ovule ovulé par l'ovaire. L'infundibulum est également l'endroit où la fécondation se produit et la couche externe de la membrane vitelline se forme. Le magnum synthétise et sécrète la majorité de l'albumen par les cellules des glandes épithéliales et tubulaires. Dans l'isthme, des membranes de coquille d'œuf se forment. Ensuite, dans la glande coquille (utérus), un liquide contenant des électrolytes est ajouté à l'albumen et la coquille d'œuf calcifiée est déposée. Enfin, le vagin aide à l'expulsion des ovules et est responsable du stockage des spermatozoïdes dans les tubules de stockage du sperme [ 1 , 2 , 3 ].

Les propriétés fonctionnelles de l'oviducte aviaire subissent des altérations dynamiques au cours du cycle de reproduction, qui comprend le développement, la ponte et la pause dans la ponte. Tous les événements liés aux activités des oviductes nécessitent un bon équilibre de la sécrétion d'eau et de liquide. Des recherches antérieures sur les mammifères indiquent que les protéines membranaires connues sous le nom d'aquaporines (AQP) sont des acteurs cruciaux dans le maintien de la disponibilité de l'eau et, par conséquent, du volume et de la composition du fluide oviductal [ 4 , 5 , 6 , 7 , 8 ].

Les AQP sont de petites protéines intégrales des canaux membranaires (~25–35 kDa), perméables à l'eau et à d'autres petits solutés non chargés, comme le glycérol ou l'urée. Les AQP sont divisés en trois sous-groupes en fonction des propriétés structurales et fonctionnelles: les canaux d'eau classiques (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8), les aquaglycéroporines (AQP3, 7, 9 et 10) et les superaquaporines (AQP11 et 12). Il est bien établi que les AQP sont impliqués dans un large éventail de processus de reproduction chez les mammifères, tels que le développement du follicule ovarien, la fécondation et la survie et la croissance embryonnaires [ 4 , 5 , 9 , 10 ]. En revanche, on en sait beaucoup moins sur la participation des PAQ à la régulation des processus de reproduction chez les oiseaux femelles. Jusqu'à présent, Zaniboni et Bakst [ 11 ] localisés AQP2, 3 et 9 dans les cellules épithéliales qui forment les tubules de stockage du sperme dans le vagin de la dinde. Tiwari et ses collègues [ 12 ] ont montré une expression différentielle d'AQP5 dans les cellules tumorales ovariennes de poulet et dans la lignée cellulaire de cancer ovarien de poulet, indiquant que l'AQP5 est impliquée dans la tumorigenèse ovarienne, les métastases et la survie cellulaire. Yang et coll. [ 13 ] ont rapporté une augmentation de l'expression de l'AQP3 dans les tumeurs ovariennes de poulets et ont révélé que l'AQP3 est impliqué dans le développement régulé par les œstrogènes de l'oviducte de poulet. En outre, des recherches antérieures menées par les auteurs ont démontré la présence d'AQP4 dans l'ovaire de poulet en relation avec le développement des follicules, indiquant que l'AQP4 peut participer à la régulation de la croissance des follicules [ 14 ]. Notre étude récente a révélé l'expression dépendante des cellules oviductales, des parties et de l'activité de l'AQP4, suggérant une implication de l'AQP4 dans les fonctions de l'oviducte de poulet, principalement la sécrétion de liquide oviductal [ 15 ]. De plus, une diminution de l'abondance d'AQP4 dans les tissus oviductaux a été observée après le traitement au tamoxifène (bloqueur des récepteurs des œstrogènes), ce qui suggère que les œstrogènes peuvent réguler l'expression d'AQP4 dans l'oviducte de poulet [ 15 ]. Ainsi, en tenant compte du fait que pendant une pause dans la ponte, l'activité de l'oviducte diminue avec la diminution de la concentration plasmatique d'estradiol et de progestérone, nous avons émis l'hypothèse que la régression de l'oviducte de poulet pendant une pause de ponte serait accompagnée d'une régulation négative de l'expression de l'AQP4. Par conséquent, la présente étude a été conçue pour examiner, pour la première fois, si l'expression de l'AQP4 change pendant une pause de ponte induite par la privation de nourriture.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Oiseaux et conception expérimentale**

L'expérimentation animale a été réalisée selon un protocole de recherche approuvé par le Comité local d'éthique animale à Cracovie, Pologne (approbation n°218/2015). Les poules Hy-Line Brown pondeuses ont été obtenues dans une ferme commerciale et ont été mises en cage individuellement sous une photopériode de 14 h de lumière: 10 h d'obscurité avec un accès libre à la nourriture et à l'eau du commerce.

À l'âge de 32 semaines, les poules ont été réparties au hasard en deux groupes: (1) nourries ad libitum (C; N = 6) et (2) soumises à une pause dans la ponte par privation complète de nourriture pendant 5 jours (F; N = 6). Les poulets ont été sacrifiés au jour 6 de l'expérience. Les poules témoins qui ont pondu ont été décapitées 2 h après la ponte. Les parties oviductales, y compris l'infundibulum, le magnum, l'isthme, la glande coquille et le vagin, ont été séparées. Les échantillons de tissus, prélevés dans la partie médiane de chaque segment, ont été immédiatement congelés et conservés à - 80°C pour l'analyse Western blot ou ont été placés dans RNAlater (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) et stockés à - 20°C pour une PCR quantitative en temps réel ultérieure. Les autres fragments de tissu ont été fixés dans du formol tamponné à 10%, déshydratés à travers des solutions d'éthanol graduées, clarifiés dans du xylène et inclus dans de la cire de paraffine. Des coupes de microtome (6 µm d'épaisseur) ont été montées sur des lames de microscope et utilisées pour l'analyse immunohistochimique.

### **2.2. Isolement de l'ARN et analyse RT-PCR**

L'extraction de l'ARN total, la transcription inverse (RT) et la PCR quantitative en temps réel ont été réalisées comme décrit précédemment [ 14 , 15 ]. En bref, l'ARN a été extrait des tissus collectés en utilisant le réactif TRI (Sigma-Aldrich). Les ARN totaux (1  $\mu$ g ) ont été transcrits en sens inverse avec un kit de transcription inverse d'ADNc de grande capacité (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Des mélanges de réaction de transcriptase inverse ont été réalisés dans un volume de 10  $\mu$ L comprenant les amorces aléatoires, le mélange dNTP et la transcriptase inverse MultiScribe selon les recommandations du fabricant. L'ADNc obtenu a été utilisé en qPCR en temps réel duplex pour l' ARNr AQP4 et 18S comme gène de référence, dans un 10  $\mu$ L volume contenant 5  $\mu$ L de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 0,5  $\mu$ L TaqMan Gene Expression Assays avec une sonde TaqMan MGB spécifique et une paire d'amorces ( AQP4 , ID de test: Gg03346640\_m1, numéro d'accès Genbank NM\_001004765. 1, taille de l'amplicon: 87 pb; Applied Biosystems), 0,5  $\mu$ L d'Eucaryotic 18S rRNA Endogenous Control (paire d'amorces et sonde TaqMan étiquetée VIC / TAMRA, cat # 4310893E, taille de l'amplicon: 187 bp; Applied Biosystems), 3  $\mu$ L d'eau et 1  $\mu$ L d'ADNc (10x échantillons dilués après la RT). Les amplifications comprenaient une étape de dénaturation initiale à 50°C pendant 2 min et 95°C pendant 10 min et 40 cycles de PCR à 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 1 min. Chaque échantillon a été analysé en double. De l'eau comme contrôle négatif a été utilisée dans toutes les réactions. La méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  a été utilisée pour calculer le niveau d'expression relatif du gène AQP4 après normalisation en ARNr 18S et étalonnage pour l'expression dans l'infundibulum des poulets témoins.

### **2.3. Extraction de protéines et analyse par Western blot**

L'analyse Western blot pour la protéine AQP4 a été réalisée comme décrit récemment [ 15 ]. La concentration de protéines dans les homogénats tissulaires a été estimée par la méthode de Bradford avec un réactif de dosage Bradford compatible avec le détergent Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Les échantillons (20  $\mu$ g de protéines totales) ont été mélangés avec du tampon de chargement et chauffés à 99,9°C pendant 7 min. Après dénaturation, les échantillons ont été chargés dans un gel de SDS-polyacrylamide à 12% et les protéines ont été séparées par électrophorèse dans des conditions réductrices. Les protéines résolues ont été transférées du gel à une membrane de nitrocellulose en utilisant un buvard semi-sec (Thermo Scientific Pierce G2 Fast Blotter; Thermo Fisher Scientific) dans Genie Transfer Buffer (20 mM Tris, 150 mM glycine dans 20% de méthanol) pendant 7 min à une tension constante de 25 V. Les membranes ont été bloquées pendant 60 min avec du lait écrémé à 5% dans du TBST (0,1% Tween-20 dans une solution saline tamponnée au Tris, pH 7,4). Après lavage, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-poulet AQP4 (fabriqué sur mesure par Operon Biotechnologies, Tokyo, Japon, et sa spécificité confirmée dans les tissus de poulet comme décrit précédemment [ 14, 15 , 16 ] dilué à 1: 3000. Les membranes ont ensuite été lavées et traitées avec un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à de la peroxydase de raifort secondaire (1: 5000, 60 min, RT; cat # R-05072-500, Advansta, Menlo Park, CA, USA). Ensuite, pour contrôler les quantités variables de protéines, les membranes ont été dépouillées et ré-sondées avec des anti-  $\beta$  monoclonaux de souris-actine-IgG conjuguée à l'HRP (1: 500; cat # sc-47778, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Les sites de la réaction anticorps-antigène ont été détectés à l'aide de la chimioluminescence améliorée (Advansta) et visualisés à l'aide d'un système d'imagerie ChemiDoc-It 410 et du logiciel VisionWorks Life Science. Les bandes représentant chaque échantillon ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du programme ImageJ (développé aux National Institutes of Health). Les abondances relatives de la protéine AQP4 ont été normalisées à la  $\beta$ -actine dans chaque point de données correspondant.

### **2.4. Immunohistochimie**

La localisation immunohistochimique de l'AQP4 a été réalisée en routine comme indiqué précédemment [ 15 ]. En bref, après blocage des sites de liaison non spécifiques avec 5% de sérum de chèvre normal dans TBST, les coupes ont été incubées pendant une nuit avec un anticorps AQP4 polyclonal de lapin primaire anti-poulet (le même que pour Western blot) dilué 1: 250 dans TBST. Les lames ont été rincées deux fois pendant 5 min dans du TBS, avant incubation avec des IgG de chèvre anti-lapin marquées à la biotine secondaire (1: 300, 90 min, température ambiante; chat # BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA), suivi par un complexe avidine-biotine-peroxydase de raifort - kit Vectastain ABC (30 min; Vector Laboratories). La réaction colorée a été développée par incubation avec de la diaminobenzidine et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Solution. De plus, les coupes ont été colorées avec de l'hématoxyline QS (Vector Laboratories). Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'anticorps primaire par du sérum de lapin normal ou du tampon TBST. Les lames ont

été examinées sous un Axio Scope. Microscope optique A1 avec caméra couleur Axiocam 503 et logiciel Zen 2.3 pro (Carl Zeiss, Allemagne). L'intensité de l'immunoréactivité a été estimée comme étant très forte, forte, modérée, faible et très faible.

## **2.5. Analyse des données**

Les données ont été analysées à l'aide de différentes analyses statistiques qui sont spécifiées dans les légendes des figures. Les tests comprenaient une analyse non paramétrique de la variance unidirectionnelle de Kruskal – Wallis sur les rangs suivie du test de Student-Newman-Keuls. Pour comparer les moyennes des deux groupes, le test non paramétrique de Mann – Whitney U ou le test t de Student ont été appliqués. Les différences de valeurs ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ . Les calculs ont été effectués avec SigmaPlot\_V\_13 (Systat Software Inc., USA).

## **3. Résultats**

### **3.1. Expression de l'ARNm et de la protéine pour AQP4**

Les poules à jeun ont arrêté la ponte au jour 4 ou 5 de l'expérience. Le poids de l'oviducte des poules à jeun était 62,3% inférieur ( $P < 0,01$ ) à celui des poulets témoins ( $69,4 \pm 4,03$  g vs  $26,1 \pm 0,93$  g).

L'analyse PCR en temps réel a démontré que l'expression de l'ARNm d' AQP4 variait selon le segment oviductal (figure 1 ). Chez les poulets témoins, l'expression relative de l'ARNm (QR) d' AQP4 était la plus faible et la moins détectable dans le magnum et l'isthme ( $P < 0,001$ ), et la plus élevée dans l'infundibulum et le vagin. Chez les poules soumises à une pause dans la ponte, il y avait une diminution de 86% ( $P < 0,001$ ) du niveau d' ARNm AQP4 dans l'infundibulum par rapport aux poules témoins.

La présence différentielle de la protéine AQP4 dans des segments particuliers de l'oviducte de poulet a également été observée en utilisant Western blot (figure 2 ). Dans chaque segment de l'oviducte des oiseaux témoins et à jeun, une bande d'environ 32 kDa a été identifiée (figure 2 A). L'analyse des images a révélé que la densité de la protéine AQP4 était plus élevée dans l'infundibulum, la glande coquille et le vagin que dans le magnum et l'isthme (données non présentées; l'analyse a été réalisée uniquement sur les bandes AQP4 sans normalisation par la densité de  $\beta$ -actine). Les figures 2 B, C et D montrent les Western blots et les expressions relatives d'AQP4 dans l'infundibulum, la glande coquille et le vagin, respectivement, des deux groupes examinés. Le jeûne a provoqué une diminution de 25,2% ( $P < 0,01$ ) du niveau relatif de protéine AQP4 dans la glande coquille et une augmentation de 221% ( $P < 0,001$ ) dans le vagin.

### **3.2. Localisation immunohistochimique de la protéine AQP4**

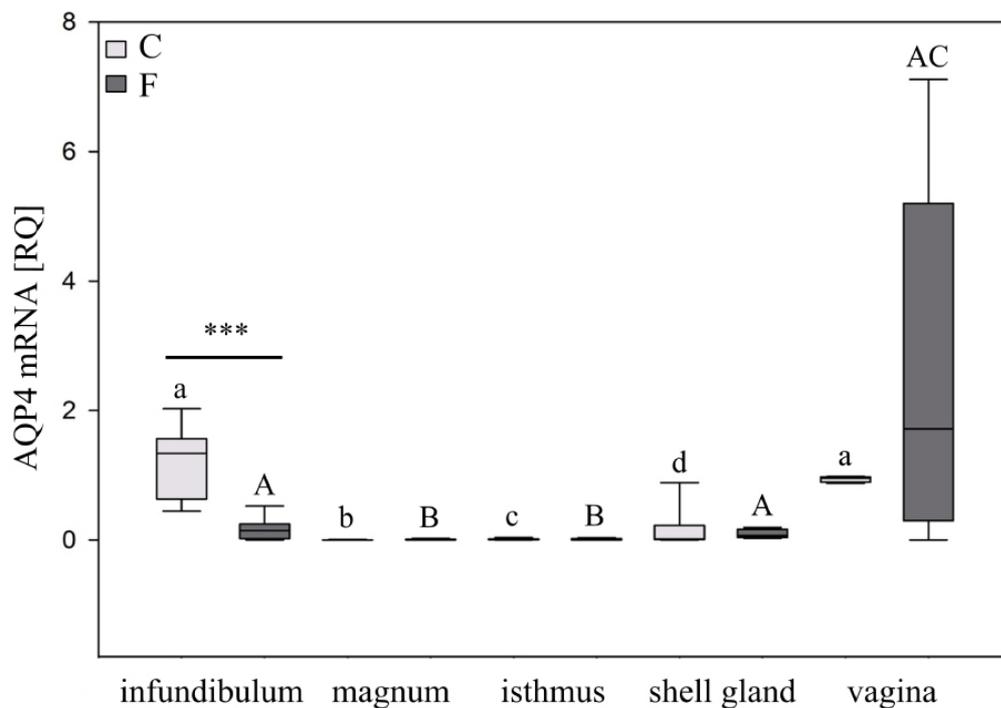


Figure 1. Expression de l'ARNm d'AQP4 dans l'oviducte de poulet pendant une pause de ponte induite par le jeûne. La boîte à moustaches montre la médiane (lignes dans les cases) et 25/75 percentiles (tailles des cases). Les astérisques indiquent des différences significatives entre les groupes témoin (C) et à jeun (F) (test U de Mann – Whitney; \*\*\* P < 0,001). Différentes lettres en exposant indiquent des différences (test ANOVA et SNK de Kruskal – Wallis; P < 0,05) entre les groupes témoins (lettres minuscules) et à jeun (lettres majuscules).

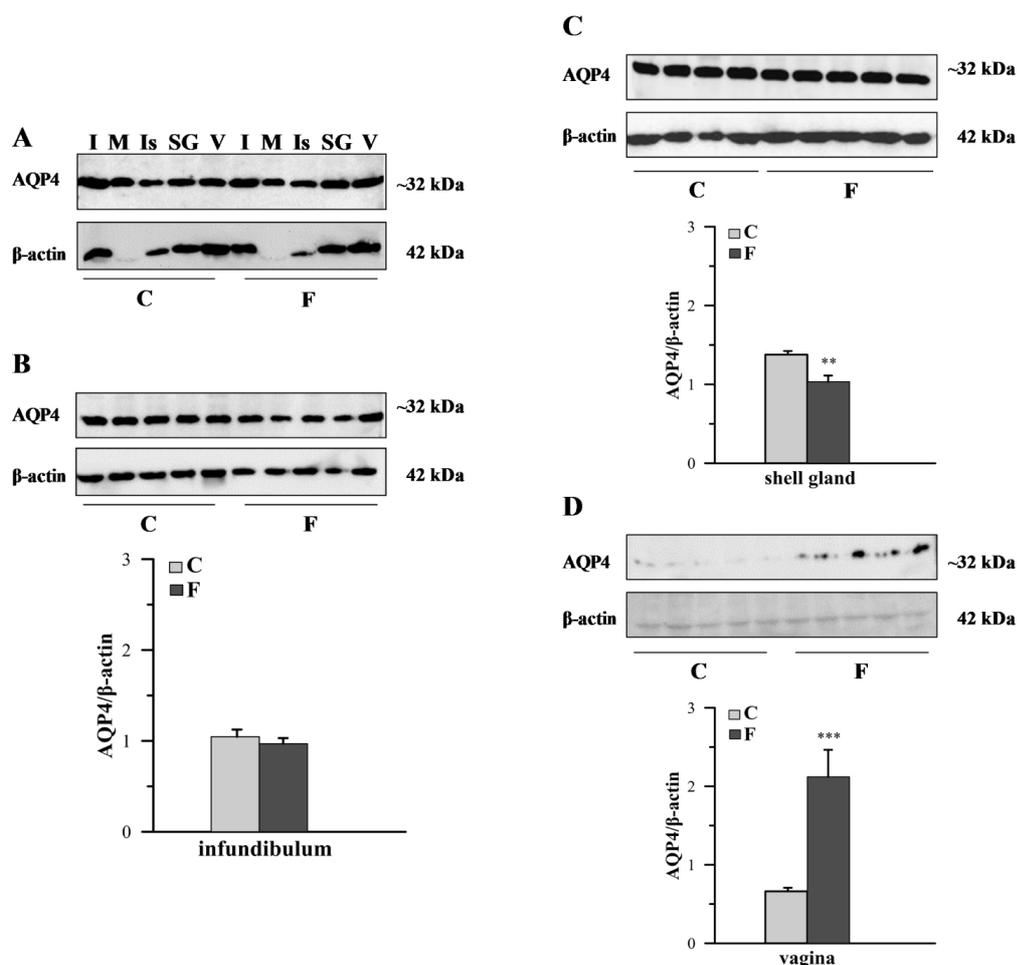


Figure 2. Analyse par Western blot de la protéine AQP4 dans l'oviducte de poulet pendant une pause de ponte induite par le jeûne. A. Tache représentative de l'AQP4 dans les parties oviductales des groupes témoins (C) et à jeun (F). B, C, D. Le transfert et l'expression relative de la protéine AQP4 dans l'infundibulum, la glande coquille et le vagin, respectivement, des poules

témoins et à jeun. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM (N = 5 ou 6) des rapports de l'AQP4 à la  $\beta$ -actine (test t de Student; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001). I - infundibulum, M - magnum, Is - isthme, SG - glande coquille, V - vagin.

Une immunoréactivité spécifique pour AQP4 a été trouvée dans la paroi de tous les segments de l'oviducte de poulet des poules témoins et à jeun. Des différences d'intensité d'immunoréaction entre les segments et à l'intérieur des couches de paroi de l'oviducte ont été observées (Figure 3). Dans le groupe témoin, l'intensité de la réaction immunopositive était la suivante: l'infundibulum > glande coquille > vagin  $\geq$  isthme >> magnum. Une très forte réaction positive pour AQP4 a été trouvée dans l'épithélium luminal de l'infundibulum. Une forte immunoréaction a été observée dans les muscles situés dans le stroma de l'infundibulum ainsi que dans l'épithélium luminal et les glandes tubulaires de la glande coquille. Une intensité modérée de coloration a été trouvée dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'isthme et l'épithélium luminal et les muscles du vagin. Une faible immunoréactivité pour l'AQP4 était présente dans l'épithélium luminal du magnum et dans les muscles stromaux de l'isthme et de la glande coquille. Une réaction immunopositive très faible a été trouvée dans les glandes tubulaires et les muscles du magnum. De plus, une coloration modérée de la protéine AQP4 a été notée dans la paroi des vaisseaux sanguins des parties oviductales. La réaction immunopositive pour la protéine AQP4 dans les segments oviductaux était plus forte que pour les poules témoins que pour les poules à jeun, sauf dans le vagin où aucune différence d'immunoréactivité AQP4 n'a été observée (Figure 3).

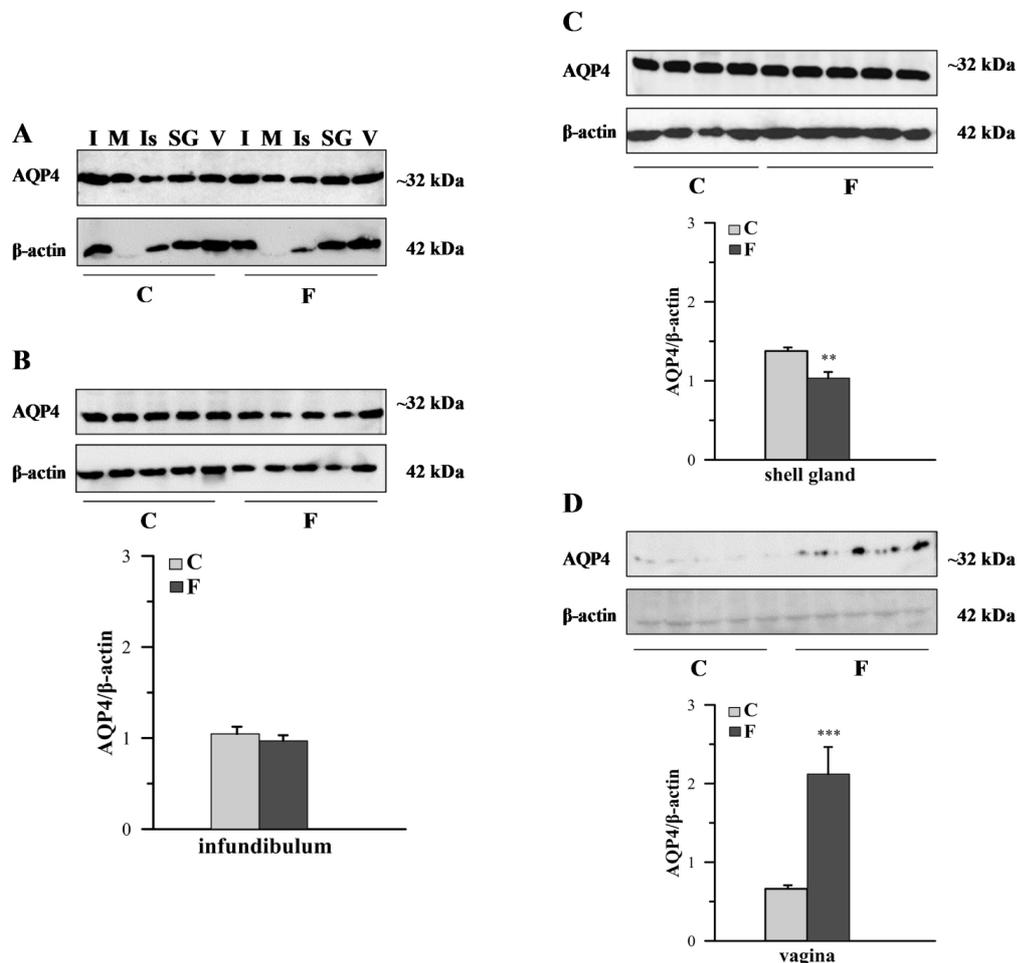


Figure 3. Localisation immunohistochemique de la protéine AQP4 dans les parties oviductales du poulet lors d'une pause de ponte induite par le jeûne. Une immunocoloration très forte pour AQP4 a été trouvée dans l'épithélium luminal (E) de l'infundibulum. Une forte immunoréaction a été observée dans les muscles situés dans le stroma (S) de l'infundibulum (A) ainsi que dans l'épithélium luminal et les glandes tubulaires (TG) de la glande coquille (G). Une intensité modérée de coloration a été trouvée dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'isthme (E) et de l'épithélium et des muscles vaginaux (I). Une faible coloration était présente dans l'épithélium luminal du magnum (C) et dans les muscles stromaux de l'isthme et de la glande coquille (E, G). Une immunoréactivité très faible a été trouvée dans les glandes tubulaires et les muscles du magnum. De plus, une immunoréaction modérée pour AQP4 a été notée dans la paroi des vaisseaux sanguins (bv). Chez les poules témoins (C), l'immunoréactivité de l'AQP4 dans les

parties oviductales, à l'exception du vagin, était plus forte que chez les poules à jeun (F). Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ .

## 4. Discussion

Cette étude a examiné, pour la première fois, l'expression de AQP4 ARNm et de protéines dans les parties poulet oviducte: le infundibulum, magnum, Isthme, coquille glande, et le vagin lors d'une pause dans la pose induite par la privation de nourriture. Les résultats actuels confirment notre suggestion précédente [ 15 ] selon laquelle l'AQP4 est impliqué dans la régulation du volume et de la composition du liquide oviductal, et du volume cellulaire dans l'oviducte de la poule au cours de différents états physiologiques. Cela a été fortement postulé pour les AQP dans l'oviducte, l'utérus ou le vagin des mammifères également [ 5 , 7 , 10 ]. Les résultats obtenus correspondent également à notre étude récente de la distribution de l'AQP4 dans l'oviducte de poulet après traitement au tamoxifène [ 15], et sont largement cohérents avec ceux rapportés précédemment dans la littérature sur les humains et les rongeurs [ 5 , 10 , 17 ].

Dans la lignée d'une précédente étude [ 15 ], nous avons observé la plus forte abondance d' ARNm et de protéines AQP4 dans l'infundibulum, la glande coquille et le vagin, indiquant que ces segments sont les principaux endroits où l'AQP4 exerce un rôle. Par conséquent, la présence d'AQP4 principalement dans l'épithélium de surface et les muscles lisses stromaux de l'infundibulum peut favoriser la sécrétion de liquide par les cellules épithéliales. Cela aide à maintenir un micro-environnement approprié pour la fécondation et à réguler la contractilité de l'infundibulum, en particulier au moment de l'ovulation [ 18]. Dans la glande coquille, l'AQP4 était localisé dans l'épithélium luminal et glandulaire. Cela peut être essentiel pour la régulation de la libération et de l'absorption des fluides. Le rôle de l'AQP4 dans la glande coquille semble être particulièrement crucial car dans ce segment oviductal, le volume et la composition biochimique du liquide changent de manière significative au cours de la formation de la coquille. Il s'élève dans les 6 premières heures après que l'œuf pénètre dans la glande de la coquille et 8 ml d'eau contenant des électrolytes sont ajoutés dans l'albumen de l'œuf. Au cours des 6 dernières heures de calcification de la coquille d'œuf, le volume de liquide dans la glande de la coquille diminue et le taux d'absorption de liquide diminue à 0,15 ml / 8 h ou moins [ 1 ]. De plus, lors de la formation des œufs, la concentration de  $\text{K}^+$  et de glucose augmente, tandis que la concentration de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  diminue dans le liquide de la glande coquille [ 1 ]. L'AQP4 peut également réguler la localisation subcellulaire d'autres protéines membranaires. Les interactions entre le potentiel de récepteur transitoire vanilloïde 4 (TRPV4; un canal calcique sensible au volume) et AQP4 constituent un système moléculaire qui régule le volume astroglial en intégrant la détection d'osmose, la signalisation du calcium et le transport de l'eau [ 19]. Une régulation similaire peut exister dans la glande de la coquille où une biominéralisation rapide se produit, entraînant le dépôt d'environ 6 g de carbonate de calcium dans la coquille de l'œuf. Dans le vagin, l'AQP4 est abondant dans l'épithélium luminal et les muscles. Cela peut être attribuable à la régulation de l'homéostasie de l'eau associée au stockage, à la libération et au mouvement des spermatozoïdes. Un rôle similaire était auparavant présumé pour AQP2, AQP3 et AQP9 dans l'oviducte de la dinde car ils sont localisés dans les cellules épithéliales des tubules de stockage du sperme situés à la jonction utéro-vaginale [ 11 ]. Les résultats actuels fournissent des preuves supplémentaires suggérant que l'AQP4 participe à la régulation de l'équilibre hydrique et ionique dans l'oviducte de poulet.

En plus du transport de l'eau et des ions, les AQP sont également responsables du transport de gaz, tels que  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$  et  $\text{NH}_3$  [ 20 ]. Bien que l'AQP4 ait été identifié comme un canal de gaz pour le  $\text{NO}$  et l' $\text{O}_2$  [ 21 ], il semble probable que cet AQP maintient également l'échange de  $\text{CO}_2$ . Par conséquent, on peut supposer que l'AQP4 est impliqué dans la régulation du transport de gaz dans l'oviducte de la poule, en particulier en ce qui concerne le  $\text{CO}_2$  dans la glande coquille où il est nécessaire pour la synthèse du  $\text{CaCO}_3$  pour le dépôt dans la coquille d'œuf.

Bien que les AQP soient importants dans la régulation de la sécrétion et de l'absorption des fluides et dans le maintien du volume cellulaire, ils sont également impliqués dans d'autres processus non directement liés au transport de l'eau. Ces processus comprennent l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération et la mort [ 22 ]. Chez les oiseaux, l'induction d'une pause dans la ponte est accompagnée d'un faible taux de prolifération cellulaire [ 23 ] et d'un taux élevé d'apoptose des cellules épithéliales et glandulaires dans la paroi oviductale [ 24 , 25]. Dans cette étude, l'AQP4 était plus faible dans une grande partie de l'oviducte des poules à jeun. Cela peut, au moins en partie, être attribuable à la survenue d'une mort cellulaire apoptotique

et à une réduction de la prolifération cellulaire. Les découvertes dans la littérature sur les rongeurs étayent cette spéculation. Une augmentation de l'apoptose des neurones et des astrocytes a été observée suite à une hémorragie intracérébrale chez des souris avec délétion AQP4 [ 26 ]. De plus, une apoptose basale accrue a été observée dans les cellules souches neurales adultes obtenues à partir de souris knock-out AQP4 [ 27 ].

Il devient de plus en plus évident que les AQP sont régulés par les hormones stéroïdes sexuelles [ 8 , 9 , 17 , 28 , 29 , 30 , 31 , 32 ]. D'autre part, l'oviducte des oiseaux est un organe sensible aux hormones stéroïdiennes et il est connu que la concentration de stéroïdes dans le plasma sanguin et les tissus oviductaux diminue considérablement pendant la pause naturelle ou induite par le sevrage alimentaire dans la ponte [ 33]. Par conséquent, dans l'étude, nous avons examiné si la privation de nourriture affecterait l'expression de l'AQP4 en même temps que la régression des oviductes et la pause de l'activité des oviductes. Nous avons trouvé une réduction visible de l'expression de l'AQP4 aux niveaux d'ARNm ou de protéines dans l'infundibulum, le magnum, l'isthme et la glande coquille des poules privées de nourriture par rapport aux poules témoins. Il semble qu'il y ait deux explications possibles à la diminution de l'expression d'AQP4 dans la plupart des segments oviductaux pour les poules à jeun. Premièrement, il y a eu une diminution des concentrations plasmatiques et tissulaires d'estradiol et de progestérone à la suite du jeûne, ce qui, dans des conditions normales, peut stimuler la synthèse d'AQP4. Deuxièmement, il y avait une réduction de l'activité fonctionnelle des cellules oviductales en conséquence, au moins en partie, de la limitation de l'action des stéroïdes [ 33 , 34 ]. Ces résultats sont également en ligne avec les résultats précédents selon lesquels il existe une réduction marquée de l'expression de l'AQP4 dans l'oviducte des poules traitées avec du tamoxifène, un bloqueur des récepteurs des œstrogènes [ 15 ]. Les présents résultats soutiennent notre hypothèse antérieure sur l'implication des hormones stéroïdes sexuelles dans les mécanismes orchestrant l'expression de l'AQP4 dans l'oviducte de poulet.

Fait intéressant, dans le vagin, il n'y a eu aucun changement dans l'expression de l'ARNm d' AQP4 , et même une augmentation de l'abondance de la protéine AQP4 chez les poules à jeun. Cependant, après le traitement au tamoxifène, l'expression de l'AQP4 était nettement réduite [ 15 ]. Ces résultats peuvent suggérer un mécanisme légèrement différent de contrôle de la synthèse d'AQP4 dans le vagin du poulet par rapport aux autres segments oviductaux. De plus, il convient de noter que chez les oiseaux femelles, les spermatozoïdes peuvent être stockés pendant de longues périodes dans le vagin. Ainsi, un niveau élevé d'abondance d'AQP4 détecté dans le vagin, également pendant une pause dans la ponte provoquée par la privation de nourriture peut être attribuable au maintien d'un environnement approprié pour le sperme résidant dans les tubules de stockage du sperme, en particulier dans des conditions physiologiques défavorables.

## **5. Conclusions**

En conclusion, les résultats de cette étude ont montré, pour la première fois, une réduction de l'expression de l'AQP4 au niveau de l'ARNm ou des protéines dans l'infundibulum, le magnum, l'isthme et la glande coquille de poules soumises à une pause de ponte induite par la privation de nourriture. En revanche, aucun changement dans AQP4 On a observé une expression d'ARNm avec une augmentation concomitante de l'abondance de la protéine AQP4 dans le vagin des poules à jeun. Ces données confirment notre hypothèse précédente selon laquelle l'expression de l'ARNm et de la protéine AQP4 dépend non seulement de l'activité de l'oviducte de poulet, mais également de l'état physiologique. Sur la base de nos résultats, il semble probable que l'AQP4 soit essentiel dans la régulation du transport de l'eau nécessaire à la création d'un micro-environnement approprié pour la fécondation et la formation d'œufs dans l'oviducte de la poule. Depuis AQP4 pourrait participer à la diminution du volume cellulaire qui est nécessaire pour les événements apoptotiques, nous proposons que AQP4 peut participer à la mort cellulaire apoptotique qui se produit fréquemment dans l'oviducte régressif pendant une pause dans la ponte. De plus, une relation entre l'action des stéroïdes et l'expression du gène AQP4 et de la protéine est suggérée.

## **Remerciements**

Ce travail a été soutenu par le ministère des Sciences et de l'Enseignement supérieur de Pologne (numéro de subvention 0215000000-D204).

## **Conflit d'intérêt**

Aucun des auteurs n'a de conflit d'intérêts à déclarer.

## Contributions d'auteur

JKS a effectué la recherche. AH a écrit le manuscrit. MG, NS et AS ont révisé le manuscrit. AH a conçu l'étude de recherche.

## Références

1. R. J. Etches *Reproduction in Poultry*, CAB International, Wallingford, UK, 1996
2. J. P. Brillard Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination, *Poult. Sci.*, Volume 72 (1993), pp. 923-928
3. M. R. Bakst Observations on the turkey oviductal sperm-storage tubule using differential interference contrast microscopy, *J. Reprod. Fertil.*, Volume 95 (1992), pp. 877-883
4. S. Arrighi; G. Bosi; S. Frattini; B. Coizet; D. Groppetti; A. Pecile Morphology and aquaporin immunohistochemistry of the uterine tube of Saanen goats (*Capra hircus*): comparison throughout the reproductive cycle, *Reprod. Domest. Anim.*, Volume 51 (2016), pp. 360-369
5. C. Zhu; Z. Jiang; F. W. Bazer; G. A. Johnson; R. C. Burghardt; G. Wu Aquaporins in the female reproductive system of mammals, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, Volume 20 (2015), pp. 838-871
6. M. T. Skowronski; T. H. Kwon; S. Nielsen Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system, *J. Histochem. Cytochem.*, Volume 57 (2009), pp. 61-67
7. H. F. Huang; R. H. He; C. C. Sun; Y. Zhang; Q. X. Meng; Y. Y. Ma Function of aquaporins in female and male reproductive systems, *Hum. Reprod. Update*, Volume 12 (2006), pp. 785-795
8. M. Brañes; B. Morales; M. Ríos; M. Villalón Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, Volume 288 (2005), pp. 1048-1057
9. M. Grzesiak; K. Knapczyk-Stwora; M. R. Luck; A. Mobasher; M. Slomczynska Effect of prenatal and neonatal anti-androgen flutamide treatment on aquaporin 5 expression in the adult porcine ovary, *Reprod. Domest. Anim.*, Volume 51 (2016), pp. 105-113
10. A. D. Sales; C. H. Lobo; A. A. Carvalho; A. A. Moura; A. P. Rodrigues Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation, *Genet. Mol. Res.*, Volume 12 (2013), pp. 6718-6732
11. L. Zaniboni; M. R. Bakst Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct, *Poult. Sci.*, Volume 83 (2004), pp. 1209-1212
12. A. Tiwari; J. A. Hadley; R. Ramachandran Aquaporin 5 expression is altered in ovarian tumors and ascites-derived ovarian tumor cells in the chicken model of ovarian tumor, *J. Ovarian Res.*, Volume 7 (2014), 99 pages
13. C. Yang; W. Lim; H. Bae; G. Song Aquaporin 3 is regulated by estrogen in the chicken oviduct and is involved in progression of epithelial cell-derived ovarian carcinomas, *Domest. Anim. Endocrinol.*, Volume 55 (2016), pp. 97-106
14. M. Nowak; M. Grzesiak; N. Saito; M. Kwasniewska; A. Sechman; A. Hrabia Expression of aquaporin 4 in the chicken ovary in relation to follicle development, *Reprod. Domest. Anim.*, Volume 52 (2017), pp. 857-864
15. J. K. Socha; N. Saito; D. Wolak; A. Sechman; A. Hrabia Expression of aquaporin 4 in the chicken oviduct following tamoxifen treatment, *Reprod. Domest. Anim.*, Volume 53 (2018), pp. 1339-1346
16. K. Yoshimura; K. Sugiura; Y. Ohmori; N. Aste; N. Saito Immunolocalization of aquaporin-4 in the brain, kidney, skeletal muscle, and gastrointestinal tract of chicken, *Cell Tissue Res.*, Volume 344 (2011), pp. 51-61
17. C. Richard; J. Gao; N. Brown; J. Reese Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse, *Endocrinology*, Volume 144 (2003), pp. 1533-1541
18. J. Rzasas Prostaglandin production by the hen oviduct in vivo and in vitro, *Adv. Physiol. Sci.*, Volume 33 (1981), pp. 177-183
19. A. O. Jo; D. A. Ryskamp; T. T. Phuong; A. S. Verkman; O. Yarishkin; N. MacAulay; D. Križaj TRPV4 and AQP4 channels synergistically regulate cell volume and calcium homeostasis in retinal Müller glia, *J. Neurosci.*, Volume 35 (2015), pp. 13525-13537
20. M. Herrera; J. L. Garvin Aquaporins as gas channels, *Pflügers Arch.*, Volume 462 (2011), pp. 623-630

21. Y. Wang; E. Tajkhorshid Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4, *Proteins*, Volume 78 (2010), pp. 661-670
22. A. Galán-Cobo; R. Ramírez-Lorca; M. Echevarría Role of aquaporins in cell proliferation: What else beyond water permeability?, *Channels (Austin)*, Volume 10 (2016), pp. 185-201
23. B. Heryanto; Y. Yoshimura; T. Tamura Cell proliferation in the process of oviductal tissue remodeling during induced molting in hens, *Poult. Sci.*, Volume 76 (1997), pp. 1580-1585
24. B. Heryanto; Y. Yoshimura; T. Tamura; T. Okamoto Involvement of apoptosis and lysosomal hydrolase activity in the oviductal regression during induced molting in chickens: a cytochemical study for end labeling of fragmented DNA and acid phosphatase, *Poult. Sci.*, Volume 76 (1997), pp. 67-72
25. J. K. Socha; A. Hrabia Alterations in apoptotic markers and egg-specific protein gene expression in the chicken oviduct during pause in laying induced by tamoxifen, *Theriogenology*, Volume 105 (2018), pp. 126-134
26. H. Chu; J. Xiang; P. Wu; J. Su; H. Ding; Y. Tang; Q. Dong The role of aquaporin 4 in apoptosis after intracerebral hemorrhage, *J. Neuroinflammation*, Volume 11 (2014), 184 pages
27. H. Kong; Y. Fan; J. Xie; J. Ding; L. Sha; X. Shi; X. Sun; G. Hu AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells, *J. Cell Sci.*, Volume 121 (2008), pp. 4029-4036
28. A. Skowronska; P. Mlotkowska; S. Nielsen; M. T. Skowronski Difference in expression between AQP1 and AQP5 in porcine endometrium and myometrium in response to steroid hormones, oxytocin, arachidonic acid, forskolin and cAMP during the mid-luteal phase of the estrous cycle and luteolysis, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, Volume 13 (2015), 131 pages
29. M. T. Skowronski; A. Skowronska; S. Nielsen Fluctuation of aquaporin 1, 5, and 9 expression in the pig oviduct during the estrous cycle and early pregnancy, *J. Histochem. Cytochem.*, Volume 59 (2011), pp. 419-427
30. R. H. He; J. Z. Sheng; Q. Luo; F. Jin; B. Wang; Y. L. Qian; C. Y. Zhou; X. Sheng; H. F. Huang Aquaporin-2 expression in human endometrium correlates with serum ovarian steroid hormones, *Life Sci.*, Volume 79 (2006), pp. 423-429
31. L. A. Lindsay; C. R. Murphy Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy, *Reproduction*, Volume 131 (2006), pp. 369-378
32. E. M. Jablonski; N. A. McConnell; F. M. Hughes Jr; Y. M. Huet-Hudson Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement, *Biol. Reprod.*, Volume 69 (2003), pp. 1481-1487
33. J. K. Socha; A. Sechman; M. Mika; A. Hrabia Effect of growth hormone on steroid concentrations and mRNA expression of their receptor, and selected egg-specific protein genes in the chicken oviduct during pause in laying induced by fasting, *Domest. Anim. Endocrinol.*, Volume 61 (2017), pp. 1-10
34. H. E. Paczoska-Eliasiewicz; A. Gertler; M. Proszkowiec; J. Proudman; A. Hrabia; A. Sechman; M. Mika; T. Jacek; S. Cassy; N. Raver; J. Rzasas Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian functions in hens (*Gallus domesticus*), *Reproduction*, Volume 126 (2003), pp. 739-751