



**HAL**  
open science

# Fonction des rétinoïdes dans les membranes foetales humaines. Action pro-cicatrisante médiée par LOXL4.

Marion Rouzaire

## ► To cite this version:

Marion Rouzaire. Fonction des rétinoïdes dans les membranes foetales humaines. Action pro-cicatrisante médiée par LOXL4.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT: 2016CLF1MM18 . tel-01845749

**HAL Id: tel-01845749**

**<https://theses.hal.science/tel-01845749>**

Submitted on 20 Jul 2018

**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 2016

*ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne

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

Spécialité Biochimie, biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 22 septembre 2016

Marion ROUZAIRE

---

**Fonctions des rétinoïdes dans les membranes fœtales  
humaines : action pro-cicatrisante médiée par LOXL4**

---

Rapporteurs : Pr. Gilles KAYEM, Hôpital Trousseau, Paris  
Dr. Céline MEHATS, Institut Cochin, Paris  
Dr. Thierry FOURNIER, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Paris

Membres : Pr. Vincent SAPIN, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne  
Pr. Denis GALLOT, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne  
Dr. Loïc BLANCHON, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne

EA 7281 – R2D2 / Retinoid, Reproduction, Developmental Diseases  
Faculté de médecine / Université d'Auvergne  
28 place Henri Dunant – BP 38  
F-63001 Clermont-Ferrand cedex, France



# REMERCIEMENTS

Au Professeur Vincent Sapin,

Je voudrais remercier le Professeur Vincent Sapin pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour m'avoir fait confiance. Merci pour tous vos conseils et votre soutien qui ont fait de ma thèse une expérience très enrichissante. Merci également pour votre bonne humeur et humour qui « donnent le ton » à l'équipe pour travailler dans une ambiance agréable au quotidien.

A mes directeurs de thèse, le Docteur Loïc Blanchon et le Professeur Denis Gallot,

Je remercie Loïc très chaleureusement sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Dès le Master 2, tu m'as beaucoup apporté : confiance, soutien et coaching intensif me permettant de poursuivre mon travail en thèse. Merci pour ta disponibilité et tes précieux conseils tout au long de ces presque 4 ans que je n'ai pas vu passer. Ta bienveillance et ta bonne humeur au quotidien y ont grandement contribué et m'ont permis de travailler dans une ambiance détendue. Je suis également très fière d'être ta première thésarde officielle et te souhaites encore d'encadrer beaucoup de doctorant(e)s.

Je remercie le Professeur Denis Gallot pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour l'intérêt porté à ce travail. Votre aide et votre avis médical m'ont permis d'avoir une approche translationnelle des manips et de la recherche de manière générale, constituant un vrai plus dans ce travail. Merci également pour tous les placentas et membranes fournies lors de mon M2 et de ma thèse, matériel biologique indispensable à la réalisation de ce travail.

A Corinne, Damien, Gaël, Christelle et Maryline

Merci pour votre soutien sans faille tout au long de ma thèse et de mon M2. Merci Corinne pour ton aide et tes conseils précieux en manips et en statistiques. Merci Damien pour m'avoir



fait participer à tes études et pour nos moments de rigolade même si tu m'as parfois fait quelques frayeurs en salle de culture ! Merci Gaël pour ton aide en manip dès mon arrivée en M2 mais aussi pour ton soutien au quotidien. Merci à Christelle et Maryline pour les bons moments passés ensemble, je vous souhaite une très bonne thèse à toutes les deux.

A mes parents et à Cléclé,

Merci pour tout votre soutien pendant ces longues années d'études qui se terminent enfin. Je n'aurai bien sûr pas pu réaliser cette thèse sans cela. Merci de m'avoir supporté et encouragé lors de mes études et particulièrement pendant les périodes de partiels. Merci pour votre appui sans faille lors de mes nombreuses réorientations qui m'ont finalement amené à réaliser mes premiers pas dans le monde de la recherche. Et pour finir, le plus important : merci pour tous ces bons moments que nous passons en famille et qui m'apportent toujours beaucoup de joie et ce depuis l'enfance ; les randos en Lozère, les footings groupés, les matchs de rugby, les sorties magasins et surtout les repas festifs toujours très animés.

A Jérôme,

Tes encouragements et ta présence dans les bons comme dans les mauvais moments ont toujours été un soutien essentiel pour moi. Nos sorties footing, piscine, nos fou-rires et soirées passées ensemble m'ont énormément apporté lors de ces années de M2 et de thèse parfois stressantes. Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien depuis un peu plus d'un an maintenant. Les moments de complicités qui nous unissent, ton amour, ta patience et ton optimisme font de ma vie une histoire de conte de fée.

A mes mamies, tantes, oncles, cousins, cousines

Quelques lignes pour vous remercier de toute la joie que vous m'apportez depuis l'enfance. Votre présence et votre appui me sont essentiels et je chéris les week-ends passés avec vous.



Remerciement spécial à tata Josiane et Mathilde pour le temps passé à la relecture orthographique de ce manuscrit.

A Aurélie,

Pour toutes les choses que tu m'as apportées depuis mon arrivée en M2, ton soutien, ton écoute, ta bienveillance et tes encouragements... Tout ceci m'a énormément aidé tout au long de ma thèse qui n'aurait vraiment pas été la même sans toi. Fou rires, cancans et karaoké en salle de culture ont grandement aidés à la réalisation de ces recherches. Merci pour tout ma petite lilie, collègue, amie, colloc ... puis voisine ! Nous formions un duo de choc au labo et il n'est pas prêt de s'arrêter de briller. Ton amitié compte beaucoup pour moi et je suis sûre que nous partageront encore de grands moments quelque soit la ville qui nous sépare (ou pas...).





# SOMMAIRE

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>9</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>10</b>
AVANT-PROPOS .....	11
<b>PARTIE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DES MEMBRANES FŒTALES.....</b>	<b>12</b>
<b>I - Formation et structure des membranes fœtales humaines.....</b>	<b>13</b>
<u>A) Genèse des membranes fœtales .....</u>	<u>13</u>
i) Formation de l'amnios. ....	14
ii) Formation du chorion. ....	14
iii) Accolements membranaires .....	15
<u>B) Structure des membranes .....</u>	<u>15</u>
i) L'amnios.....	15
ii) Le chorion .....	16
<b>II – Rôles des membranes fœtales et rupture programmée .....</b>	<b>17</b>
<u>A) Rôles des membranes fœtales.....</u>	<u>17</u>
<u>B) Rupture programmée des membranes fœtales.....</u>	<u>18</u>
i) Chronologie de la rupture .....	18
ii) Intégrité des membranes au cours de la grossesse .....	19
iii) Mécanismes moléculaires de la rupture programmée .....	21
<b>III – Rupture prématurée des membranes fœtales .....</b>	<b>23</b>
<u>A) RPM spontanée.....</u>	<u>25</u>
i) Causes .....	25



ii) Prise en charge.....	26
<b>B) RPM iatrogène.....</b>	<b>27</b>
i) Causes.....	27
ii) Prise en charge.....	28
<b>PARTIE 2 : LA VITAMINE A .....</b>	<b>30</b>
<b>I- Définition des rétinoïdes .....</b>	<b>31</b>
<u>A) Structure.....</u>	32
<u>B) Propriétés générales.....</u>	32
<u>C) Sources alimentaires.....</u>	33
<b>II- Métabolisme des rétinoïdes.....</b>	<b>34</b>
<u>A) Du bol alimentaire au foie.....</u>	34
i) Absorption intestinale.....	35
ii) Métabolisme dans les entérocytes.....	35
iii) Acheminement des chylomicrons.....	36
<u>B) Stockage hépatique.....</u>	36
<u>C) Du foie aux cellules cibles.....</u>	38
<u>D) Synthèse des acides rétinoïques.....</u>	39
i) Conversion du rétinol en rétinol.....	39
ii) Conversion du rétinol en acides rétinoïques.....	40
<u>E) Catabolisme.....</u>	41
<b>III- Régulation de l'expression des gènes par les acides rétinoïques.....</b>	<b>42</b>
<u>A) Récepteurs nucléaires des acides rétinoïques.....</u>	42
i) Historique.....	42
ii) Structure.....	43
<u>B) Mécanisme d'action.....</u>	45
i) Fixation des récepteurs RARs et RXRs aux RARE.....	45
ii) Régulation transcriptionnelle des acides rétinoïques.....	47



C) <u>Exemples de gènes régulés par la vitamine A</u> .....	48
i) Gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes.....	48
ii) Gènes impliqués dans la structure de la matrice extracellulaire.....	49
<b>IV- Fonctions physiologiques et pharmacologiques de la vitamine A</b> .....	51
A) <u>Rôles pléiotropiques de la Vitamine A, de la vie in utero à l'âge adulte</u> .....	51
i) Reproduction. ....	51
ii) Placentation. ....	52
iii) Développement. ....	53
iv) Après la naissance.....	54
B) <u>Vitamine A et cicatrisation : intérêt pharmacologique</u> .....	54
i) Etudes sur modèle cellulaire.....	55
ii) Etudes sur modèle animal.....	56
iii) Etudes cliniques.....	57
<b>PARTIE 3 : LES LYSYL OXYDASES</b> .....	59
<b>I- Structure et biosynthèse des LOXs</b> .....	60
A) <u>Structure des LOXs</u> .....	61
i) Le domaine C-terminal.....	61
ii) Le domaine N-terminal.....	62
B) <u>Biosynthèse des LOXs</u> .....	62
<b>II- Diversité d'expression des LOXs</b> .....	63
A) <u>Profil d'expression tissulaire des LOXs</u> .....	63
B) <u>Expression des LOXs dans les membranes fœtales</u> .....	64
<b>III- Mécanisme d'action</b> .....	65
A) <u>Mécanisme d'action extracellulaire</u> .....	65
B) <u>Mécanisme d'action intracellulaire</u> .....	66
<b>IV- Fonctions biologiques des LOXs</b> .....	67
A) <u>Knock-out chez le modèle souris</u> .....	67



<u>B) Pathologies associées à une dérégulation de l'expression des LOXs</u> .....	68
i) Les cancers.....	68
ii) Pathologies associées à une surexpression des LOXs.....	69
iii) Pathologies associées à une diminution des LOXs.....	69
<u>C) Fonctions biologiques des LOXs</u> .....	71
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>73</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>76</b>
PUBLICATION N°1 .....	77
« Nuclear retinoids receptors and pregnancy: Placental transfer, functions and pharmacological aspects » Aurélié Comptour #, <b>Marion Rouzaire</b> #, Corinne Belville, Damien Bouvier, Denis Gallot, Loïc Blanchon and Vincent Sapin	
PUBLICATION N°2.....	80
« All-trans retinoic acid promotes wound healing of primary amniocytes through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family.» <b>Marion ROUZAIRE</b> , Aurélié COMPTOUR, Corinne BELVILLE, Damien BOUVIER, Gaël CLAIREFOND, Flora PONELLE, Vincent SAPIN, Denis GALLOT and Loïc BLANCHON	
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>93</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>117</b>
ANNEXE N°1 .....	118
« Lysyl oxidase-like 4 involvement in retinoic acid epithelial wound healing. » Comptour A, <b>Rouzaire M</b> , Belville C, Bonnin N, Daniel E, Chiambaretta F, Blanchon L , Sapin V.	
ANNEXE N°2.....	119
« Cigarette smoke condensate affects the retinoid pathway in human amnion. » <b>Rouzaire M</b> , Comptour A, Belville C, Bouvier D, Sapin V, Gallot D and Blanchon L.	





ANNEXE N°3..... 120

« Retinoic Acids Pathway in the Amnion Implications in VEGF Regulation of Amniotic Fluid Transport. »

Cheung C, Anderson D, **Rouzaire M**, Blanchon L, Sapin V, Brace R.

ANNEXE N°4..... 121

« ATRA promotes wound healing of primary amniocytes layer in an in-vitro model through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family. »

**Rouzaire M**, Comptour A, Belville C, Bouvier D, Clairefond G, Ponelle F, Sapin V, Gallot D, Blanchon L.

ANNEXE N°5..... 122

- Autres travaux de recherche -



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

**Figure 1:** Lignage cellulaire de l'embryologie humaine.

**Figure 2:** Formation de l'amnios.

**Figure 3:** Augmentation du volume de la cavité amniotique.

**Figure 4:** Annexes extra-embryonnaires à la fin du 3<sup>ème</sup> mois.

**Figure 5:** Structure des membranes fœtales humaines.

**Figure 6:** Ultrastructure des membranes fœtales humaines.

**Figure 7:** Présentation des collagènes et des MMPs responsables de leur dégradation dans les membranes fœtales humaines.

**Figure 8:** Profil d'expression des métalloprotéases (MMPs) dans les membranes fœtales humaines non-pathologiques (à terme) et en condition de rupture prématurée (RPM).

**Figure 9:** Comparaison histologique des zones ZIM et ZAM des membranes fœtales humaines.

**Figure 10:** Caractéristiques des ruptures prématurées spontanées et iatrogènes.

**Figure 11:** Principales fonctions de la vitamine A et de ses dérivés.

**Figure 12:** Structure des rétinoïdes

**Figure 13:** Absorption intestinale et stockage hépatique des rétinoïdes.

**Figure 14:** Métabolisme des rétinoïdes au sein d'une cellule cible.

**Figure 15:** Structure des récepteurs nucléaires et fixation aux RARE.

**Figure 16:** Régulation transcriptionnelle des gènes cibles des rétinoïdes : mécanisme d'action.

**Figure 17:** Principaux modèles de souris KO pour RAR et RXR.

**Figure 18:** Structure des lysyl oxydases.

**Figure 19:** Structure du cofacteur LTQ (Lysyl Tyrosyl Quinone) des LOXs.

**Figure 20:** Voie de biosynthèse des LOXs.

**Figure 21:** Fonction biologique principale des LOXs : la biosynthèse du collagène.

**Figure 22:** Mécanisme d'action extracellulaire des LOXs.



# LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>AAS</b> : peptidyl	<b>HDAC</b> : Histone désacétylases
$\alpha$ -AminoAdipic- $\gamma$ -Semialdehydes	<b>HDF</b> : Human Dermal Fibroblasts
<b>ADH</b> : Alcohol DeHydrogenase	<b>HMGB1</b> : High–Mobility Group Box 1
<b>AF-1/-2</b> : Activation Function-1/-2	<b>H2O2</b> : Hydrogen Peroxyde
<b>APL</b> : Acute Promyelocytic Leukemia	<b>HMT</b> : Histone Methyl Transferases
<b>ApoE</b> : APO lipoprotéine E	<b>HNSCC</b> : Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
<b>AQP</b> : Aquaporine	<b>iLBP</b> : intracellular lipid binding protein
<b>AR</b> : Acide Rétinoïque	<b>IUPAC-IUBMB</b> : International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry and Molecular Biology
<b>ARAT</b> : Acyl-CoA : Retinol Acyl Transferase	<b>KO</b> : Knock Out
<b>atRA</b> : all-trans rétinoïque acid	<b>LA</b> : Liquide amniotique
<b><math>\beta</math>APN</b> : $\beta$ amino-propionitrile	<b>LBD</b> : Ligand Binding Domain
<b>BCMO1</b> : $\beta$ -Carotène-15,15'-Monooxygénase 1	<b>LDL</b> : Low Density Lipoprotein
<b>BMP1</b> : Bone Morphogénic Protein 1	<b>LOX</b> : Lysyl Oxydase
<b>CARM1</b> : Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1	<b>LPL</b> : lipoprotéine lipase
<b>CBP/P300</b> : CREB Binding Protein	<b>LRAT</b> : lecithin : rétinol acyltransferase
<b>CDK</b> : Cyclin Dependant Kinase	<b>LRP</b> : LDL receptor Related protein
<b>CEL</b> : Carboxyl Ester Lipase	<b>LTQ</b> : Lysine Tyrosyl Quinone
<b>CmR</b> : Chylomicron Remnant	<b>MAOA, B</b> : Monoamine oxidase A, B
<b>COX-2</b> : CycloOxygénase-2	<b>MAPK</b> : Mitogen Activated Protein Kinase
<b>CRBPI or II</b> : Cellular Retinol Binding Protein type I or II	<b>MDR</b> : Medium chain Dehydrogenase/Reductase
<b>CRABPI or II</b> : Cellular Rétinoïque Acid Binding Protein type I or II	<b>MEC</b> : Matrice ExtraCellulaire
<b>CRH</b> : Cortico-Releasing Hormone	<b>MMP</b> : Matrix MetalloProteinase
<b>CSC</b> : Cigarette Smoke Condensate	<b>mTLD</b> : mammalian Tolloïd Protease
<b>Cter</b> : C terminal	<b>mTLL1 et 2</b> : mammalian tolloïd like 1 et 2 protease
<b>CYP26</b> : Cytochrome P450 subfamily 26	<b>NAD</b> : Nicotinamide Adénine Dinucleotide
<b>DAO</b> : Diamine Oxydase	<b>NADP</b> : Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
<b>DBD</b> : DNA Binding Domain	<b>NCoR</b> : Nuclear Receptor Corepressor
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	<b>NH3</b> : Ammoniac
<b>DR</b> : Direct Repeat	<b>Nter</b> : N terminal
<b>hEGF</b> : human Epithelial Growth Factor	<b>P/CAF</b> : P300/CBP Associated Factor
<b>FAD</b> : Flavine Adénine Dinucleotide	<b>PAO</b> : Polyamine Oxydase
<b>FC</b> : Fold Change	<b>PEG</b> : Polyéthylène Glycol
<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein	
<b>HAT</b> : Histone acetyl transférase	



**PGDH:** ProstaGlandine DésHydrogénase  
**PGHS:** ProtéoGlycane Héparine Sulfate  
**PDGF:** Platelet Derived Growth Factor  
**PKA:** Protein Kinase A  
**PLAT:** Tissue plasminogen activator  
**PLRP2:** Pancreatic Lipase Related Protein 2  
**PPAR:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor  
**PTL:** Pancreatic Triglyceride Lipase  
**qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction  
**RAL:** Rétinal  
**RALDH:** Retinal Dehydrogenase  
**RAR:** Retinoic Acid Receptor  
**RARE:** Retinoic Acid Response Element  
**RBP:** Retinol Binding Protein  
**RDH:** Retinol Dehydrogenase  
**RE:** Retinyl Ester  
**REH:** Retinyl Ester Hydrolase  
**RL-HSD:** RoDH-like 3 $\alpha$ -hydroxysteroid deshydrogenase  
**ROH:** Rétinol  
**RPM :** rupture prématurée des membranes  
**RPMAT :** rupture prématurée des membranes avant terme  
**RPMi :** rupture prématurée des membranes iatrogène

**RXR:** Retinoic X Receptor  
**SA:** Semaine d'aménorrhée  
**SDR:** Short chain Dehydrogenase/Reductase  
**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**SMRT:** Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor  
**SRC/P160:** P160 Steroid Receptor Co-activator  
**SRCR:** Scavenger Region Cystein Rich  
**SR-BI:** Scavenger Receptor class B type I  
**SRI:** Society for Reproductive Investigation  
**SSAO:** monoamine metabolizing Semi carbazide Sensitive Amines Oxydases  
**STRA6:** Stimulated by Retinoic Acid 6  
**Swi/SNF:** Switch/Sucrose Non Fermenting  
**TIMP:** Tissue Inhibitor of MetalloProteinase  
**TLR4:** Toll like Receptor 4  
**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor alpha  
**TTR:** TransThyRetine  
**VAD:** Vitamin A Deficiency  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**ZAM :** zone de morphologie altérée  
**ZIM :** zone de morphologie intacte





## Résumé

La vitamine A et ses dérivés actifs (les rétinoïdes) sont des molécules essentielles à la vie et ce dès la période embryonnaire. Molécules de choix dans de nombreuses applications thérapeutiques, notamment dans les domaines de la dermatologie et de l'ophtalmologie, elles sont le plus couramment utilisées pour leurs propriétés pro-cicatrisantes. Malgré cette utilisation courante en clinique, les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant aux rétinoïdes de promouvoir un processus de cicatrisation restent encore mal connus. Afin de mieux appréhender ces mécanismes, mais aussi afin d'élargir leur utilisation clinique à la rupture prématurée des membranes (RPM), je me suis intéressée aux propriétés pro-cicatrisantes de l'atRA (l'un des dérivés actifs de la vitamine A) sur les membranes fœtales.

Alors que l'amnios et le chorion sont physiologiquement incapables d'initier un processus de cicatrisation suite à une lésion, nos résultats démontrent un effet positif de l'atRA sur la migration des cellules épithéliales amniotiques (amniocytes primaires), conduisant ainsi à une potentialisation de la cicatrisation de plus de 80% *in vitro*. Ce travail, complété par une analyse transcriptomique réalisée sur des membranes fœtales et des amniocytes primaires traités ou non à l'atRA, a permis d'identifier de nombreux gènes régulés par l'atRA au sein de l'amnios et des amniocytes. Parmi ces gènes, je me suis intéressée à un membre de la famille des lysyl oxydases, LOXL4, qui joue un rôle clé dans la dynamique de la matrice extracellulaire en régulant la réticulation du collagène. Une étude de régulation transcriptionnelle associée à de la promotologie ont tout d'abord permis de montrer que l'atRA induisait l'expression du gène LOXL4 de manière directe. Puis, l'inhibition de la protéine LOXL4 lors de tests de blessure (par le  $\beta$ -aminopropionitrile et par un siARN spécifique) nous a permis de démontrer que l'effet pro-cicatrisant de l'atRA était médié, au moins en partie, par la rétino-induction de LOXL4.

Ces nouveaux éléments apportés par ce travail dans la compréhension des mécanismes moléculaires utilisés par l'atRA afin de promouvoir la cicatrisation permettent d'envisager son utilisation future dans la prise en charge clinique des ruptures prématurées.

## Abstract

Vitamin A and its active derivatives (retinoids) are essential molecules for life from the embryonic development to the adulthood. Because of these numerous functions and especially because of their pro-healing properties, they are commonly used in clinic in dermatology and ophthalmology in particular. Despite this routine clinical use, the molecular and cellular mechanisms used by retinoids to promote a healing process remain unclear. To better understand these mechanisms, but also to expand its clinical use to the premature rupture of fetal membranes (PROM), we looked to pro-healing properties of atRA (active derivative of vitamin A) on the human fetal membranes.

While amnion and chorion are unable to initiate a physiological process of healing after injury, our results demonstrate a positive effect of atRA on the migration of primary amniocytes, leading to an healing improvement of up to 80% *in vitro*. This work, completed by a transcriptomic analysis performed on fetal membranes and primary amniocytes treated or not with atRA, allowed the identification of many genes regulated by atRA within the amnion and the amniocytes. Among these genes, we looked to a member of the lysyl oxidase family, LOXL4, which plays a key role in the dynamic of the extracellular matrix by regulating collagen crosslinking. First, transcription and promotology experiments have shown that atRA strongly induced the expression of LOXL4 in a direct manner. Then, the inhibition of the LOXL4 protein in scratch assay experiments (using  $\beta$ -aminopropionitrile or a specific siRNA) allowed us to demonstrate that the pro-healing effect of atRA was mediated, at least in part, by the retinoid-induction of this gene.

Besides providing new elements to understand how atRA exerts their pro-healing properties, this work proposes atRA as a promising candidate to improve the clinical management of premature rupture of the fetal membranes by promoting re-epithelialization of the amnion.



# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Avant-propos

Les membranes fœtales, annexes embryonnaires constituées de l'amnios et du chorion, jouent un rôle primordial tout au long de la grossesse notamment en protégeant le fœtus contre les agents infectieux extérieurs et en assurant l'homéostasie du liquide amniotique. Lors de la parturition, leur rupture est programmée pour survenir peu de temps après le début du travail, permettant ainsi l'accouchement. Cependant, dans certains cas pathologiques, les membranes se rompent bien avant le terme de la grossesse engendrant des risques affectant principalement le fœtus et conduisant à une prématurité plus ou moins grave de ce dernier. Actuellement, la prise en charge de ces ruptures prématurées reste néanmoins peu efficace et complexe au vu de l'incapacité des membranes fœtales à cicatriser naturellement et à permettre ainsi à la poche des eaux de retrouver son intégrité.

Dans ce contexte, nous avons étudié les effets des acides rétinoïques, dérivés actifs de la vitamine A déjà utilisés en clinique pour leurs propriétés pro-cicatrisantes, dans les phénomènes de réparation des membranes fœtales humaines. L'ensemble de ce travail doit pouvoir permettre de proposer, *in fine*, un moyen de restituer l'intégrité de l'amnios après une lésion.

Ce projet s'inscrit complètement dans les axes de recherche portés par l'équipe R2D2, qui s'attache à mieux comprendre, au sein de différents tissus, les mécanismes moléculaires et cellulaires généraux de la cicatrisation des épithéliums lésés.



# PARTIE 1 : Physiopathologie des membranes

## fœtales

### **I - Formation et structure des membranes fœtales humaines**

A) Embryogénèse

B) Structure des membranes

### **II - Rôles des membranes fœtales et rupture programmée**

A) Rôles des membranes fœtales

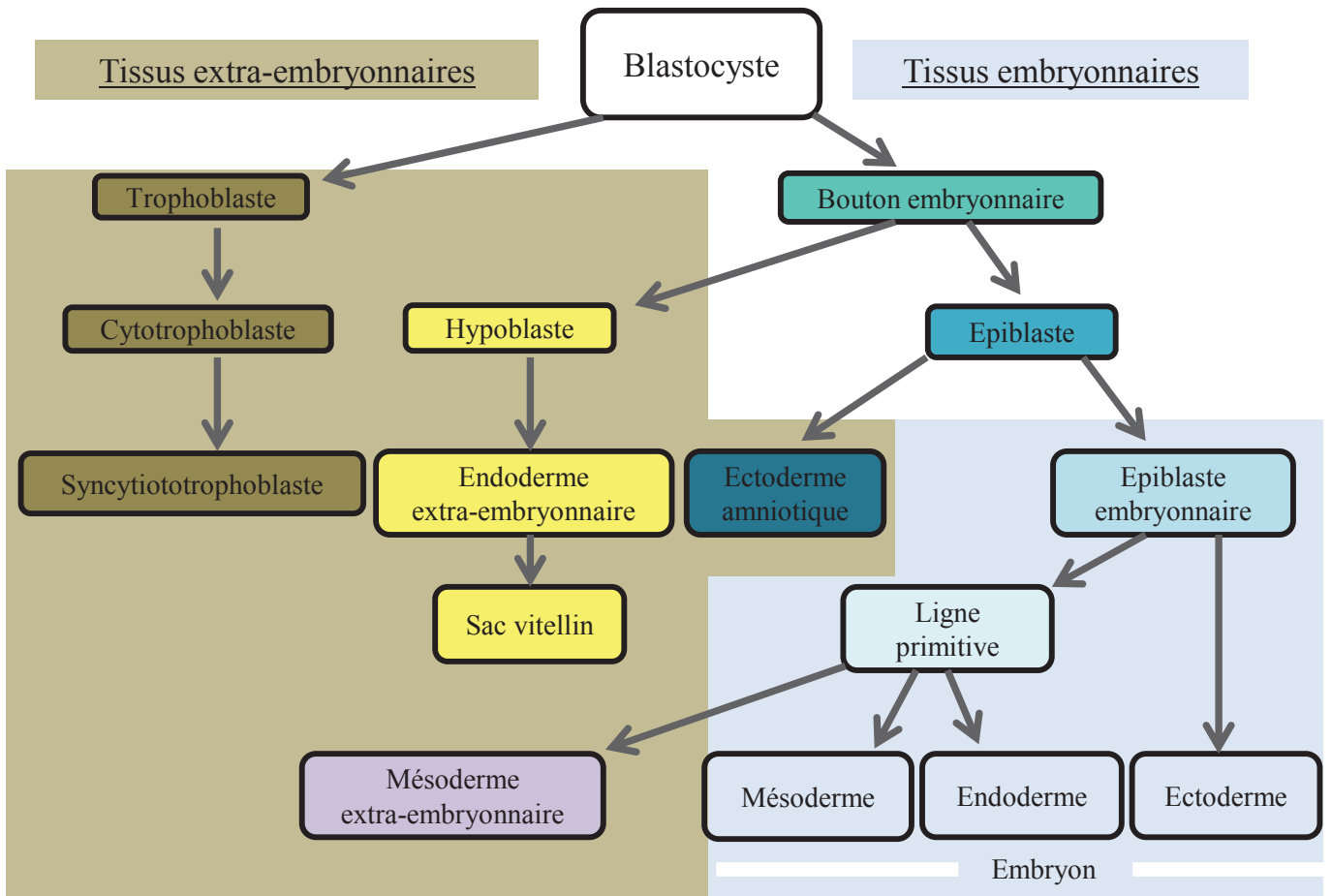
B) Rupture programmée des membranes fœtales

### **III - Rupture prématurée des membranes fœtales (RPM)**

A) RPM spontanée

B) RPM iatrogène





**Figure 1:** Lignage cellulaire de l'embryologie humaine.  
 (D'après: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>.)

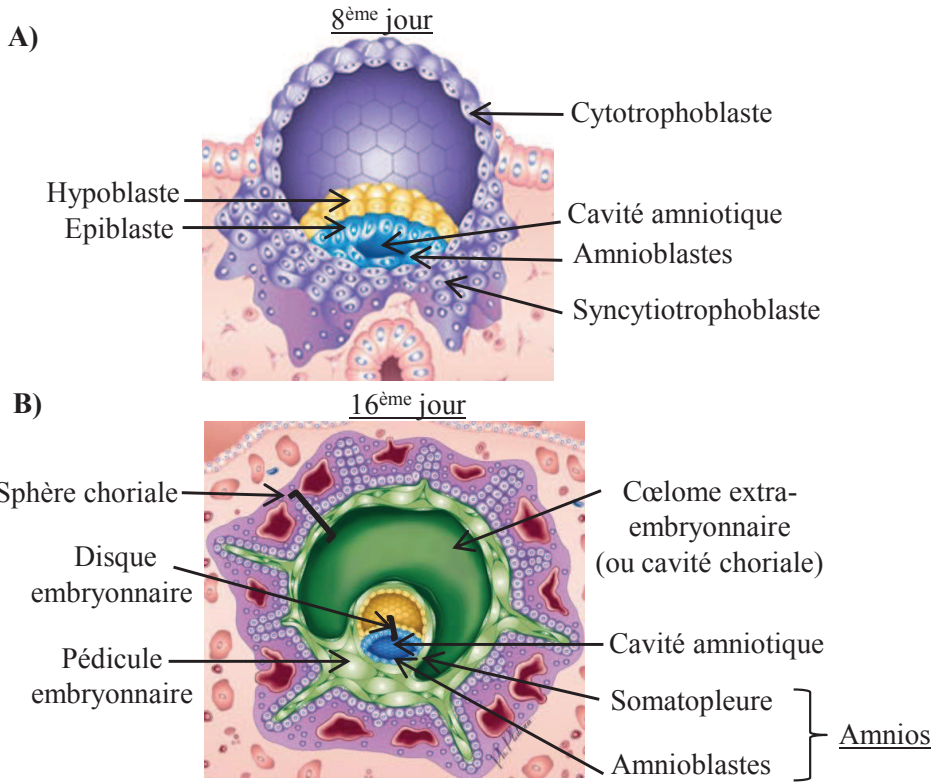
## **I - Formation et structure des membranes fœtales humaines**

Le développement des annexes extra-embryonnaires, composées du placenta et des membranes fœtales, permet d'établir une véritable interface entre la mère et le fœtus. Lieu d'échange de nutriments, d'eau et de déchets métaboliques, elles présentent également une activité régulatrice indispensable au maintien de la grossesse et à la parturition.

Bien qu'elles soient moins étudiées que le placenta, les membranes fœtales constituent un ensemble tissulaire transitoire complexe indispensable au bon déroulement de la grossesse. En s'insérant de part et d'autre du placenta, elles délimitent la cavité amniotique dans laquelle baigne le fœtus en croissance et doivent, de ce fait, s'adapter aux nombreuses contraintes mécaniques et biologiques de la vie *in utero*.

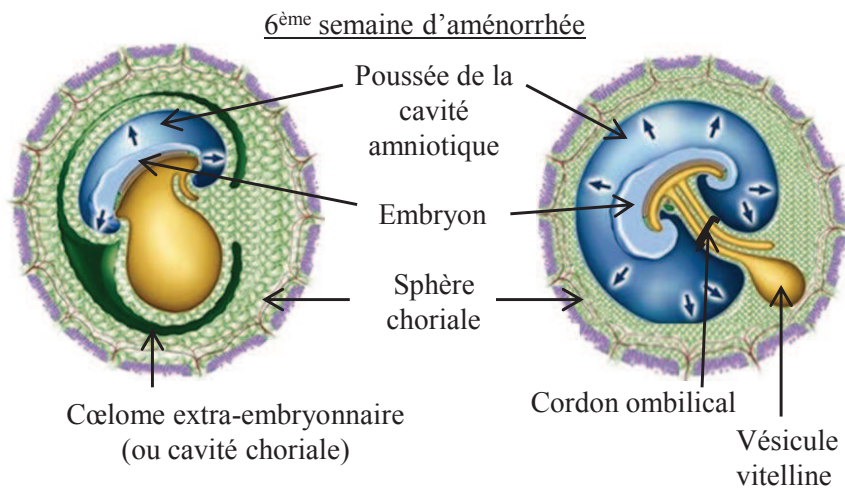
### A) Genèse des membranes fœtales

Au stade blastocyste, 5 jours après la fécondation, l'œuf se compose d'un amas de cellules internes, appelé bouton embryonnaire, d'une cavité, le blastocœle, et d'une couche de cellules externes constituant le trophoblaste. Cette couche externe assurera l'implantation (au 6<sup>ème</sup> jour après la fécondation) et constituera la première interface entre la mère et le fœtus. De nombreuses modifications de l'œuf surviennent après l'implantation. D'une part, le trophoctoderme se différencie pour donner naissance au syncytiotrophoblaste et au cytotrophoblaste qui seront destinés exclusivement à la formation des annexes embryonnaires. D'autre part, les cellules du bouton embryonnaire se réarrangent en un disque bilaminaire composé : i) d'un épithélium appelé épiblaste, qui participera à la formation de l'embryon et des annexes (notamment l'amnios et le mésoderme extra-embryonnaire). ii) de l'hypoblaste sous-jacent qui se différenciera en sac vitellin (Figure 1).



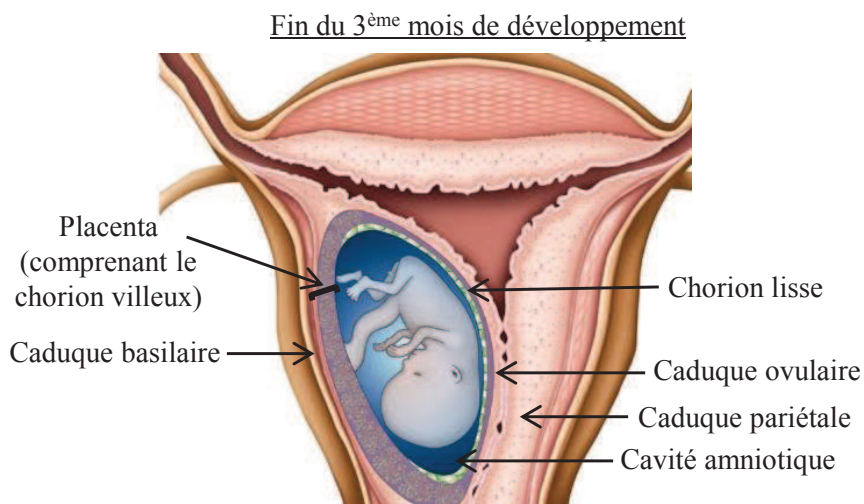
**Figure 2** : Formation de l'amnios.

Au 8<sup>ème</sup> jour, les amnioblastes (dérivés de l'épiblaste) migrent pour former la cavité amniotique (A). Au 16<sup>ème</sup> jour, la somatopleure qui dérive du mésoderme extra-embryonnaire, vient entourer les amnioblastes (B), elle constituera leur soutien mécanique pour former le feuillet amniotique.



**Figure 3** : Augmentation du volume de la cavité amniotique.

Dès la 6<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA), la cavité amniotique repousse le mésenchyme somatopleural qui tend à effacer la cavité chorale en s'étendant tout autour de l'embryon. Cette poussée permettra l'accolement de la somatopleure (amnios) à la sphère chorale autour de la 18<sup>ème</sup> SA.



**Figure 4** : Annexes extra-embryonnaires à la fin du 3<sup>ème</sup> mois.

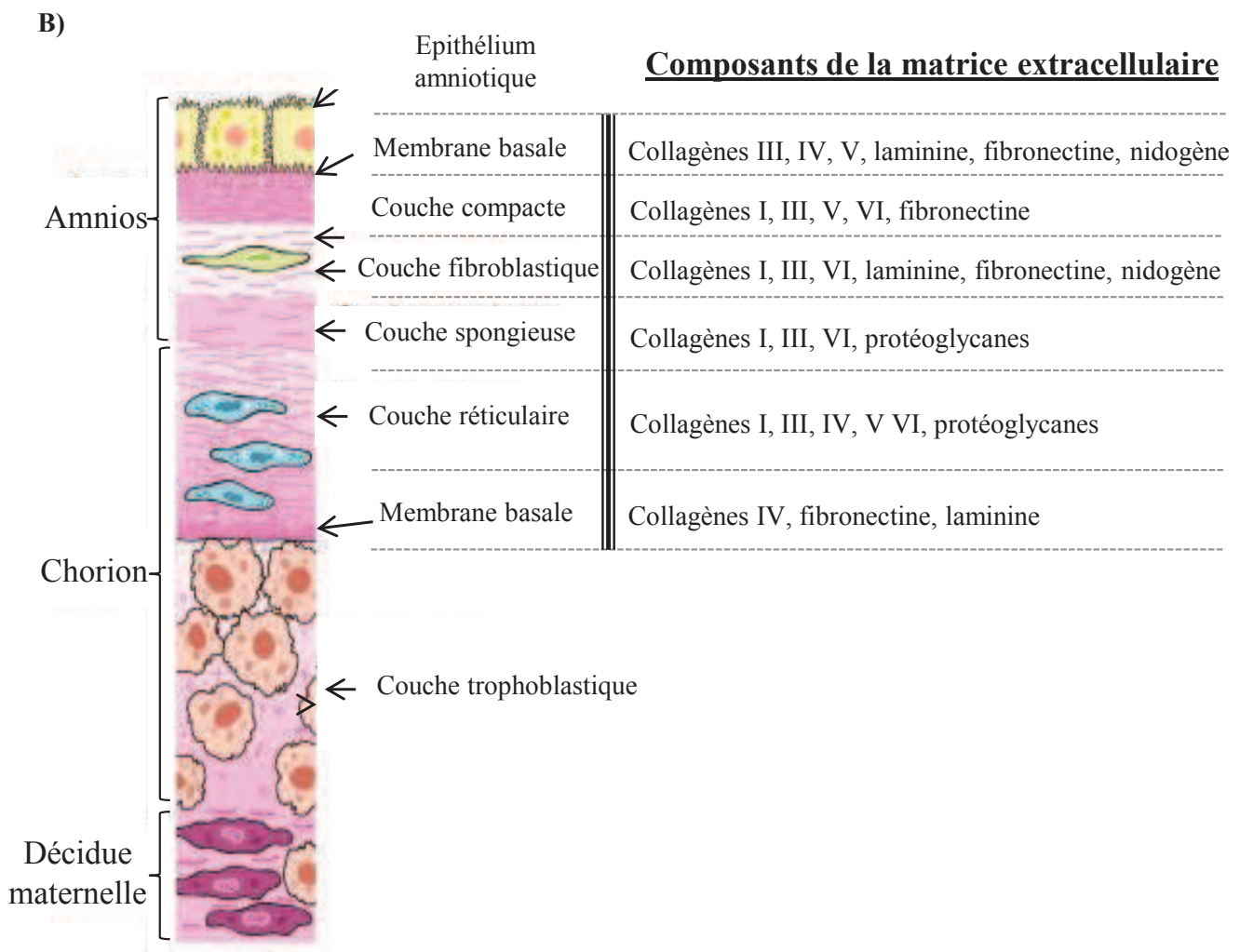
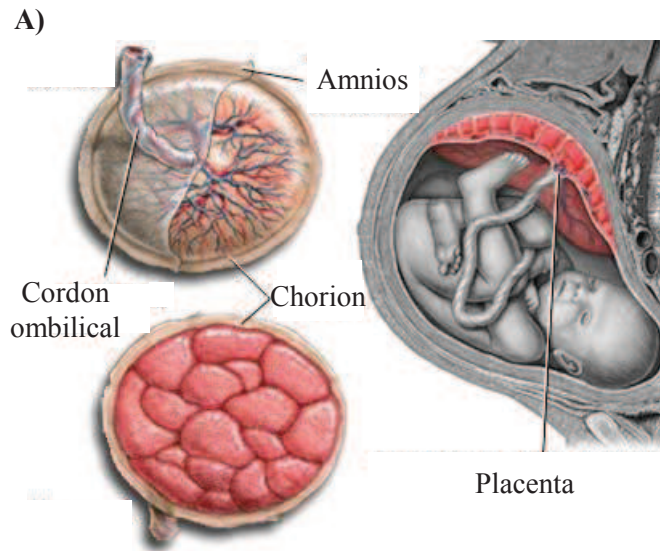
L'accroissement de la cavité amniotique plaque la caduque ovulaire contre la caduque pariétale oblitérant la cavité utérine. Les villosités chorales involuent du côté du caduque ovulaire donnant naissance au chorion lisse qui entoure l'amnios et constitue ainsi le feuillet externe des membranes fœtales.

### i) Formation de l'amnios

La formation de l'amnios débute pendant la 4<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA). Au 8<sup>ème</sup> jour de développement, des cellules de l'épiblaste se différencient en cellules épithéliales amniotiques, ou amnioblastes, et migrent pour délimiter une nouvelle cavité : la cavité amniotique (Figure 2A). A partir du 12<sup>ème</sup> jour, le mésoderme extra-embryonnaire se développe et prend le nom de somatopleure au niveau de la cavité amniotique et du pédicule embryonnaire. La somatopleure constituera le support mécanique de l'épithélium amniotique (amnioblastes) pour former le feuillet de l'amnios (Figure 2B). Au cours de la 6<sup>ème</sup> SA, le volume de liquide amniotique augmente fortement et repousse les parois de l'amnios qui s'étend alors tout autour de l'embryon à la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine (Figure 3).

### ii) Formation du chorion

Au cours de la deuxième semaine de développement, le cœlome extra-embryonnaire (ou cavité chorale) apparaît et s'accroît jusqu'à entourer la vésicule vitelline secondaire et la cavité amniotique au 16<sup>ème</sup> jour. Cette cavité repousse le mésoderme extra-embryonnaire qui va venir tapisser la face interne du cytotrophoblaste (somatopleure) d'une part, et la face externe de la vésicule vitelline d'autre part (splanchnopleure). Ainsi, le chorion sera formé par l'association de la somatopleure et des cytotrophoblastes délimitant l'œuf de la décidue maternelle. A partir de la fin du 2<sup>ème</sup> mois de développement, les villosités de la sphère chorale vont disparaître du côté de la caduque ovulaire, donnant alors naissance au chorion lisse non vascularisé. A l'inverse, les villosités chorales situées à l'opposé (en direction de la caduque basilaire), se développent et constituent le chorion vilieux qui entrera dans la composition du placenta apparaissant sous forme discoïde à la fin du 3<sup>ème</sup> mois (Figure 4).



**Figure 5:** Structure des membranes fœtales humaines.

A) Les membranes fœtales délimitent la cavité amniotique. L'amnios constitue le feuillet interne, au contact du liquide amniotique, tandis que le chorion se situe au contact de la décidue maternelle.

(D'après: Bárcena et al., 2011. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03372.x)

B) L'amnios se compose de 5 couches histologiques distinctes: l'épithélium, la membrane basale, la couche compacte, la couche fibroblastique et la couche spongieuse au contact du chorion. Ce dernier est composé de 3 couches: la couche réticulaire, la membrane basale et la couche trophoblastique au contact de la décidue maternelle. Les principaux composants de la matrice extracellulaire sont indiqués dans la colonne de droite.

(D'après : D. Evain-Brion et A. Malassiné. *Le placenta humain*. Lavoisier, 2010 . p 30)

### iii) Accolements membranaires

Autour de la 18<sup>ème</sup> SA, la croissance accrue de la cavité amniotique est telle qu'elle repousse la cavité chorale qui disparaît, permettant l'accolement des deux feuillets mésoblastiques : l'amnios et le chorion.

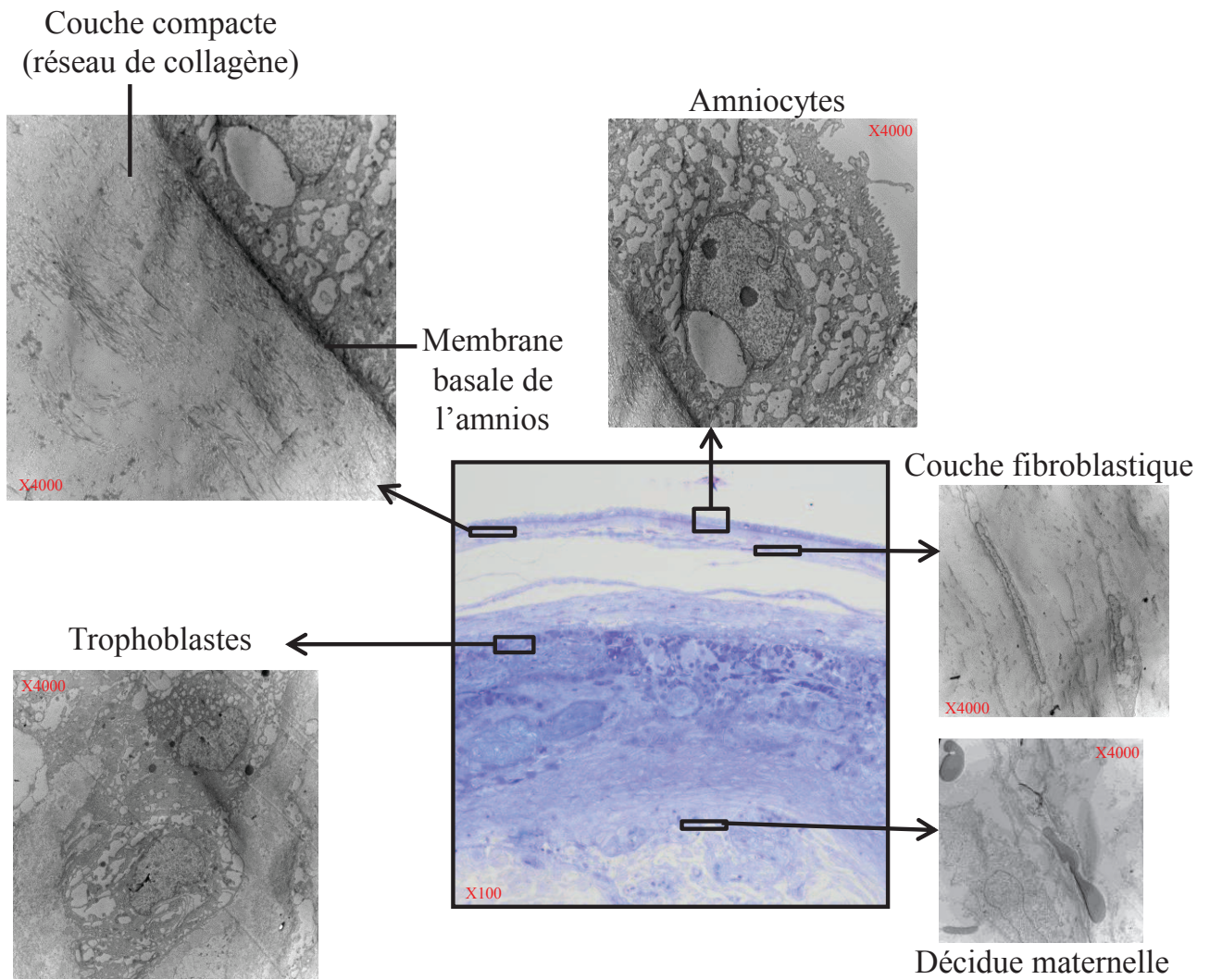
L'accolement du chorion lisse à la décidue maternelle pariétale constitue la dernière étape de la formation des membranes fœtales. Elle survient autour de la 24<sup>ème</sup> semaine du fait de la disparition de la caduque ovulaire qui n'est plus suffisamment irriguée pour subsister.

### B) Structure des membranes

Les membranes fœtales sont donc composées de deux feuillets accolés. L'amnios, feuillet le plus interne, est en contact direct avec le liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus. Le chorion, lui, constitue le feuillet le plus externe et est accolé à la décidue maternelle sous-jacente (Figure 5A). Les premières études décrivant la structure anatomique et histologique des membranes fœtales ont été menées par Golden Bourne dans les années 60 (1-3). Ces données ont été largement enrichies les années suivantes (4,5) et ont permis d'aboutir, de nos jours, à une description détaillée très complète de chacun des deux feuillets.

#### i) L'amnios

L'amnios est un feuillet qui n'est ni vascularisé ni innervé, il se compose de cinq couches d'une épaisseur totale d'environ 0,1mm (1) (Figure 5B). La première est composée d'une monocouche de cellules épithéliales cubiques qui bordent la cavité amniotique. Cet épithélium repose sur une membrane basale composée de collagènes de type III, IV et V ainsi que de glycoprotéines non-collagéniques (telle que la laminine et la fibronectine) sécrétées par les cellules épithéliales. La 3<sup>ème</sup> couche, appelée couche compacte, forme un véritable squelette fibreux conférant une grande résistance au feuillet amniotique et participant ainsi à



**Figure 6:** Ultrastructure des membranes fœtales humaines.

Une coupe de membranes foetales observée en microscopie optique est présentée au centre de la figure.

Les différentes couches ont ensuite été observées en microscopie électronique, permettant notamment la visualisation du réseau de collagène très présent au sein de la couche compacte de l'amnios.

l'intégrité des membranes fœtales (5). Elle se compose d'un réseau dense de collagènes fibrillaires (de type I et III principalement) organisés en faisceaux, eux même sécrétés par la couche fibroblastique sous-jacente. Cette dernière est la couche la moins épaisse de l'amnios, elle se compose de cellules mésenchymateuses (fibroblastes) et de rares macrophages enchâssés dans une matrice extracellulaire. La dernière couche de l'amnios se trouve au contact du chorion, il s'agit de la couche spongieuse. Riche en protéoglycanes hydratées, elle permet une absorption des nombreuses déformations causées à la fois par les mouvements du fœtus et par les chocs extérieurs. De plus, elle constitue une zone de glissement entre l'amnios et le chorion.

L'organisation des fibres de collagène est primordiale pour assurer la résistance de l'amnios aux pressions extérieures. En plus du réseau fibreux dense de la couche compacte, la solidité de l'amnios est assurée par des ponts de collagènes reliant la membrane basale aux couches profondes du feuillet amniotique. Ces fibres, composées de collagènes de types V et VI, sont visibles en microscopie sous forme de rubans organisés en travées parallèles (6) (Figure 6).

## ii) Le chorion

Le chorion est un feuillet beaucoup plus épais que le feuillet amniotique (avec une épaisseur pouvant atteindre 0,4mm) mais cependant bien moins résistant aux forces de tension. Il se compose de trois couches (Figure 5B). La première, située au contact de l'amnios, est appelée couche réticulaire. Elle est constituée d'un réseau fibreux riche en collagène et en protéoglycanes dans lequel s'enchâssent des cellules fusiformes et stellaires. Cette structure adhère fermement à la membrane basale chorale sous-jacente. Cette dernière, riche en collagène de type IV, en laminine et en fibronectine, constitue le support de la couche trophoblastique en permettant l'ancrage et la connexion de fibres dans le trophoblaste. La couche trophoblastique est formée par un empilement de 2 à 10 couches de cellules





trophoblastiques. C'est la structure la plus externe des membranes fœtales, située en contact étroit avec les cellules de la décidue maternelle.

## **II – Rôles des membranes fœtales et rupture programmée**

Les membranes fœtales constituent un ensemble tissulaire complexe transitoire, assurant aussi bien des fonctions mécaniques que biologiques, indispensables au bon déroulement de la grossesse. Ces différentes fonctions seront présentées dans une première partie (A) alors que l'importance des membranes dans l'initiation de la parturition sera traitée dans une deuxième partie (B) qui détaillera la physiologie de la rupture, processus programmé pour survenir au terme de la grossesse.

### A) Rôles des membranes fœtales

Premièrement, les membranes délimitent la cavité amniotique dans laquelle se trouve le fœtus en croissance. De ce fait, elles assurent une protection mécanique aussi bien contre les chocs extérieurs que contre les mouvements du fœtus lui-même. Leur solidité et leur capacité à absorber les chocs découlent d'une grande résistance moléculaire indispensable au maintien de leur intégrité.

A côté de cette protection physique, les membranes constituent une véritable barrière immunologique. De nombreuses études font état des rôles anti-inflammatoires et antimicrobiens des membranes fœtales (7–9), leur conférant un intérêt particulier pour une utilisation en « tissue engineering » (10) et en clinique (11). De par ce rôle immunitaire, le fœtus et les membranes elles mêmes sont protégés des agents infectieux extérieurs présents dans le tractus génital. Ces systèmes de défense contre les infections - essentiels pour la santé de la mère et du fœtus - sont toutefois imparfaits, pouvant provoquer une pathologie redoutée des cliniciens : la chorioamniotite (12).



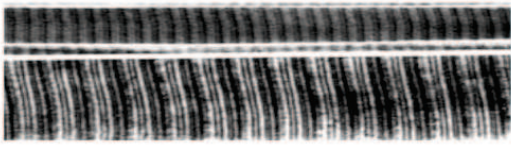
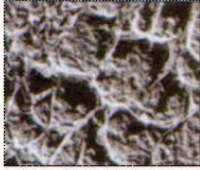
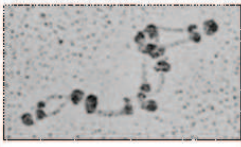
En outre, les membranes fœtales sont en contact direct avec le liquide amniotique dont la régulation de l'homéostasie (volume, composition, renouvellement...) est indispensable pour le développement harmonieux du fœtus. En effet, une anomalie de volume du liquide amniotique peut conduire à des pathologies obstétricales graves telles que le polyhydramnios et l'oligohydramnios (13). Les membranes fœtales jouent un rôle majeur dans la régulation du volume de liquide amniotique. Bien que les mécanismes moléculaires restent mal connus, il a été établi que la résorption du liquide se faisait en partie par transfert trans-membranaire : le surplus de liquide serait résorbé par passage au travers des membranes fœtales, de la cavité amniotique vers la circulation maternelle placentaire (14,15). Plusieurs systèmes ont été décrits pour assurer ce flux parmi lesquels la transcytose vésiculaire, qui pourrait être régulée par le facteur VEGF comme démontré sur le modèle ovin (16–18) . De plus, de nombreuses études ont permis de démontrer l'implication des aquaporines dans la régulation du volume du liquide amniotique au travers des membranes fœtales (19–22).

Pour finir, les membranes fœtales sont impliquées dans l'initiation de la parturition de par leur rupture en fin de grossesse. Communément appelé rupture de la poche des eaux, ce processus finement régulé semble programmé pour survenir au terme de la grossesse.

## B) Rupture programmée des membranes fœtales

### i) Chronologie de la rupture

La rupture des membranes est programmée pour survenir une fois le travail commencé. Elle peut survenir spontanément ou bien être provoquée artificiellement par le clinicien. Les contractions utérines rapprochées, caractéristiques de l'entrée en travail, constituent un facteur déclencheur de la rupture. En effet, les forces de cisaillement générées par les contractions exercent une pression sur les membranes, augmentant ainsi leur étirement. A côté de ces contraintes mécaniques favorisant la rupture, les membranes fœtales sont soumises à de

Collagènes					
Familles de collagènes	Fibrillaires			Laminaires	De jonction / ancrage
Assemblage	Faisceaux puis fibres			Réseau de tétramères	Tétramères puis filament perlé
Micrographie					
Collagènes exprimés dans les membranes fœtales	I	III	V	IV	VI
		<u>Amnios</u> : couche compacte, fibroblastique et spongieuse <u>Chorion</u> : couche réticulaire	<u>Amnios</u> : toutes les couches <u>Chorion</u> : couche réticulaire	<u>Amnios</u> : membrane basale, couche compacte <u>Chorion</u> : couche réticulaire	<u>Amnios</u> : membrane basale, couche spongieuse <u>Chorion</u> : couche réticulaire, membrane basale
MMPs exprimés dans les membranes fœtales	MMP1, 2, 3, 8, 13, 14	MMP1, 2, 8, (10), 13, 14	MMP2, 9, 10	MMP2, 9 et 10	MMP13

**Figure 7:** Présentation des collagènes et des MMPs responsables de leur dégradation dans les membranes fœtales humaines.

(D'après Vadillo-Ortega et al., 2006 ; Cohen et al., 2006 ; Hessle et al., 1986)

nombreuses modifications de composition et d'organisation concourant à leur fragilisation au niveau du col utérin en fin de grossesse. De ce fait, il n'est pas rare que la rupture survienne spontanément avant le début du travail, ce qui est le cas chez 10% des femmes accouchant à terme (23).

Chronologiquement, il a été établi que la séparation de l'amnios et du chorion constituait le premier évènement du processus de rupture (24). Le chorion, moins résistant, se rompt rapidement suite à la séparation des deux feuillets. A l'inverse, la grande résistance de l'amnios lui confère la capacité à se distendre sans se rompre alors qu'il n'a plus de support mécanique (25). Sa rupture, dépendante de sa dégradation, apparaît comme un phénomène hautement régulé.

#### ii) Intégrité des membranes au cours de la grossesse

Les membranes fœtales sont dotées d'une grande résistance indispensable au bon déroulement de la grossesse. Comme décrit précédemment, leur intégrité est assurée en majeure partie par la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire et en particulier des collagènes (Figure 5B et 7). De nombreux éléments appuient l'hypothèse d'une dégradation programmée de cette matrice afin de conduire, en fin de grossesse, à une fragilisation des membranes fœtales, favorisant ainsi leur rupture.

#### Balance MMPs / TIMPs

Tout au long de la grossesse, l'intégrité des membranes est maintenue grâce à un équilibre entre la production et la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette balance est hautement dépendante des enzymes de dégradation des composants de la matrice : les métalloprotéases (MMPs), et de leur inhibiteurs : les TIMPs. A ce jour, au moins 26 MMPs ont été identifiées chez l'Homme. Elles peuvent être divisées en six groupes distincts selon leur substrat : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les membranes-type MMPs

	Noms des MMPs	Famille des MMPs	Expression des MMPs		
			Membranes fœtales à terme	Membranes fœtales RPM	Liquide amniotique RPM
1	MMP-1	Collagénases	+	↑	↑
2	MMP-8		+	↑	↑
3	MMP-13		+	+	+
4	MMP-18		-	ND	ND
5	MMP-2	Gélatinases	+	↑	↑ / pas modifiée
6	MMP-9		+	↑	↑
7	MMP-3	Stromélysines	+	+	↑
8	MMP-10		+	ND	ND
9	MMP-11		+	ND	ND
10	MMP-27		-	ND	ND
11	MMP-7	Matrilysines	-	ND	ND
12	MMP-26		-	-	ND
13	MMP-14	MT-MMPs	+	↑	↑
14	MMP-15		+	+	ND
15	MMP-16		-	-	ND
16	MMP-17		+	-	ND
17	MMP-24		+/-	-	ND
18	MMP-25		-	-	ND
19	MMP-12	Autres enzymes	-	ND	ND
20	MMP-19		+	+	ND
21	MMP-20		-	-	ND
22	MMP-21		-	ND	ND
23	MMP-22		-	ND	ND
24	MMP-23		+	+	ND
25	MMP-28		-	ND	ND
26	MMP-29		-	ND	ND

**Figure 8:** Profil d'expression des métalloprotéases (MMPs) dans les membranes fœtales humaines non-pathologiques (à terme) et en condition de rupture prématurée (RPM).

+: exprimée ; - : pas exprimée ; +/- : exprimé dans 50% des tissus testés ;

ND: non déterminé ; ↑ : expression augmentée par rapport aux membranes à terme.

(D'après Menon R et al., 2004) (27).

(MT-MMPs) et les « autres enzymes » (26). Leur profil d'expression dans les membranes fœtales a été largement étudié aussi bien en condition physiologique (à terme) qu'en condition pathologique de rupture prématurée des membranes (RPM) (Figure 8) (27). Il en est de même pour les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMPs) : tous les membres de la famille identifiés à ce jour (TIMP1, 2, 3 et 4) sont exprimés dans les membranes fœtales et certains semblent impliqués dans le processus de rupture (28,29).

### Zone à morphologie altérée

Plusieurs études ont cherché à caractériser la microstructure des membranes fœtales à terme et plus particulièrement au niveau de leur point de rupture (30–32). Une zone particulière, localisée le long de la ligne de rupture au niveau du col utérin, a été identifiée et appelée ZAM pour « zone à morphologie altérée ». La zone ZAM présente des caractéristiques particulières en comparaison de la zone plus éloignée du point de rupture (appelée ZIM).

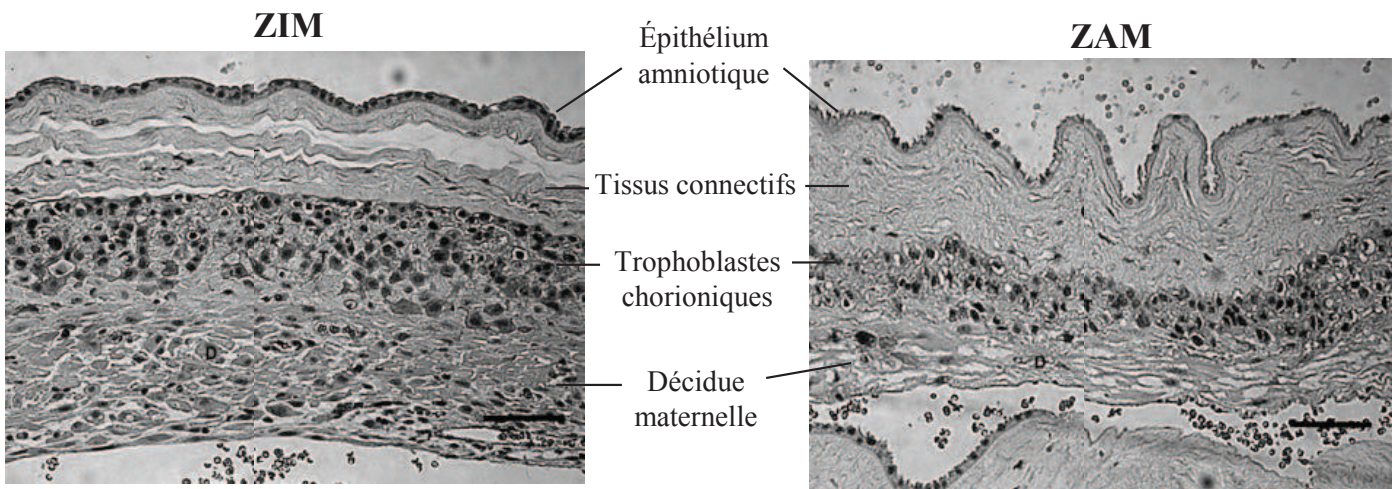
Tout d'abord, des caractéristiques histologiques ont été décrites (Figure 9):

- Au niveau du point de rupture, l'épaisseur globale des membranes est diminuée à cause d'un amincissement de la décidue et de la couche trophoblastique du chorion.
- Le tissu conjonctif est désorganisé. Son état apparaît relâché et présente des gonflements en zone ZAM alors qu'il est dense et compacté dans les zones éloignées du col.

Puis, de nombreuses caractéristiques biochimiques décrites par la suite ont permis d'expliquer la morphologie de la zone ZAM :

- Il a notamment été démontré que certaines enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire étaient dérégulées au sein de la zone ZAM. Par exemple, la protéine MMP-9, impliquée dans la dégradation des collagènes est augmentée alors que l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-3 est, lui, diminué (32).
- De plus, des modifications d'expression d'autres composants de la matrice ont également été démontrées dans ZAM : La décorine, protéoglycane impliquée dans l'organisation du





**Figure 9:** Comparaison histologique des zones ZIM et ZAM des membranes fœtales humaines.

Au niveau de ZIM (zone à morphologie intacte) l'organisation des tissus connectifs est dense et compacte. A l'inverse, le tissu conjonctif est relâché et la décidua ainsi que la couche trophoblastique du chorion sont amincies dans ZAM (zone à morphologie altérée; au niveau du cervix). Échelle = 100  $\mu$ m.

(D'après McLaren et al., 1999) (31)

collagène en faisceau, est diminuée alors que le biglycan, autre protéoglycane, se retrouve augmenté. Ce dernier déstabilise les faisceaux de collagène en interférant avec la décorine, facilitant la rupture. D'autre part, la quantité d'acide hyaluronique est 3 fois supérieure dans la zone ZAM par rapport à la zone opposée au col (ZIM). De par sa structure, ce composé a la capacité de se gorger d'eau et d'augmenter ainsi la pression au sein de la matrice extracellulaire, favorisant également la rupture (33,34).

- Enfin, une augmentation des phénomènes d'apoptose a également été mise en évidence au niveau de la zone ZAM, concourant également à sa fragilisation.

### iii) Mécanismes moléculaires de la rupture programmée

Des modifications de la structure des membranes, notamment une diminution de leur contenu en collagènes et une augmentation de leur activité collagénase sont associées au déclenchement de la rupture. Des études sur les rongeurs ont également mis en évidence une augmentation de l'apoptose à la suite de ce processus de dégradation de la matrice (35). Chez l'Homme, ces phénomènes d'apoptose semblent apparaître uniquement au sein de la zone qui sera amenée à rompre (ZAM) (36). Il y aurait donc un déséquilibre dans la balance des MMPs et des TIMPs associé à des processus pro-apoptotiques qui concourraient, à terme, à la rupture des membranes (37,38). De nombreuses études réalisées chez l'Homme et sur modèle animal font état des modifications d'expression des MMPs et des TIMPs survenant avant et pendant l'accouchement. Chez l'Homme, les membranes fœtales présentent une forte augmentation de l'activité de MMP1 avant le travail et de MMP3, MMP8 et MMP9 pendant le travail. Il a également été démontré que la concentration de TIMP1 diminuait au cours de la parturition puis augmentait en post-natal (39,40). Ces phénomènes hautement régulés mettent en jeu des signaux émanant de tous les acteurs de la vie *in utero* : le placenta, le liquide amniotique, la caduque utérine, le fœtus en croissance et les membranes fœtales elles-mêmes (41).



Au cours de la grossesse, la CRH (corticotropin-releasing hormone) sécrétée par le placenta augmente pour atteindre sa concentration maximale à terme. Elle peut alors exercer son action au sein de l'hypophyse fœtale, conduisant à la synthèse de cortisol par les glandes surrénales du fœtus (42,43). L'augmentation du cortisol dans la circulation fœtale et dans le liquide amniotique en fin de grossesse stimule à son tour la production de CRH par le syncytiotrophoblaste, modulant ainsi la quantité de cortisol et de CRH. Ces deux hormones vont alors exercer une partie de leur action au niveau des poumons fœtaux en stimulant leur maturation qui se termine à partir du 8<sup>ème</sup> mois de grossesse. La sécrétion de surfactant, constituant la dernière étape du développement pulmonaire, enrichit alors le liquide amniotique en protéines et en phospholipides qui génèreraient, de par leur action pro-inflammatoire, une augmentation de l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la synthèse de prostaglandine E2 (44) au contact de l'amnios. Ces dernières médient l'activation des MMPs et permettent ainsi d'initier la dégradation des membranes conduisant à leur rupture.

De même, la CRH présente dans le liquide amniotique agit directement au niveau de la sécrétion de MMP9 dans les membranes fœtales, concourant à leur fragilisation (45). La libération des MMPs, et plus particulièrement MMP3 et MMP9, est également induite par la relaxine, hormone sécrétée par la décidue à son niveau maximum en fin de grossesse (46).

En parallèle, le chorion connaît également des modifications à l'approche du terme. Tout au long de la grossesse, ce feuillet sécrète la prostaglandine déshydrogénase (PGDH) dont le rôle est d'inhiber les prostaglandines afin d'empêcher les contractions utérines en dehors de l'accouchement. L'expression de cette enzyme est réprimée par des mécanismes post-transcriptionnels en fin de grossesse, exposant de ce fait la décidue maternelle et les membranes fœtales à l'action de la prostaglandine E2 (47), médiatrice de l'activation des MMPs (48).



En plus de ces dérégulations de la balance production/dégradation de la matrice, des modifications des protéines régulant l'organisation de la MEC ont été mises en évidence en fin de grossesse. Par exemple, il a été démontré que l'activité des lysyl oxydases diminuait avec l'âge gestationnel pour arriver à un minimum d'activité en fin de grossesse. Ces enzymes exprimées au niveau des membranes fœtales permettent d'assurer les pontages entre les fibres de collagènes et sont donc indispensables au maintien de l'intégrité de la matrice. Leur étude au sein des membranes fœtales faisant l'objet d'une grande partie de ce travail de thèse, les lysyl oxydases sont détaillées dans la 3<sup>ème</sup> partie de la synthèse bibliographique.

Pour finir, de plus en plus d'études soutiennent l'hypothèse que l'inflammation stérile induite par le travail contribuerait au processus de rupture (49–52). Il a notamment été démontré que l'entrée en travail induisait l'expression d'un large panel de gènes caractéristiques d'une réaction inflammatoire aiguë au sein des membranes fœtales (50). En accord avec cette hypothèse, ce type de réaction inflammatoire, déclenchée en absence d'agents infectieux, est très fréquemment retrouvée dans les membranes ayant rompu prématurément (51,52).

Toutes ces modifications survenant au terme de la grossesse semblent se coordonner pour aboutir à la fragilisation des membranes fœtales, facilitant ainsi leur rupture après le début du travail. La rupture serait donc dépendante à la fois de mécanismes hautement régulés concourant à fragiliser les membranes en les dégradant, et de forces de tension et d'étirement générées par les contractions utérines de plus en plus rapprochées une fois le travail commencé.

### **III – Rupture prématurée des membranes fœtales**

La rupture des membranes apparaît comme un processus physiologiquement programmé pour la fin de la grossesse. Cependant, dans des cas de grossesses pathologiques, elle peut survenir avant le début du travail, on parle alors de rupture prématurée des

	<b>RPM spontanée</b>	<b>RPM iatrogène</b>
Causes	Multifactorielle Souvent infectieuse.	Amniocentèse ou fœtoscopie.
Taille de la brèche	Etendue large.	Dépend du diamètre de l'instrument chirurgical.
Type de brèche	Diffuse, peu délimitée.	Nettement délimitée.
Localisation	Souvent en regard du col utérin.	Au niveau du site d'insertion de l'instrument.
Age gestationnel	Variable Plus fréquente au 3ème trimestre.	Suite à la procédure chirurgicale Souvent au 2ème et 3ème trimestre.
Incidence	1% à 4% des grossesses	1% à 2% après une amniocentèse 3% à 30% après une fœtoscopie

**Figure 10:** Caractéristiques des ruptures prématurées spontanées et iatrogènes.

(D'après Devlieger et al., 2006) (55)

membranes (RPM). Si cette dernière survient avant 37 SA (RPM avant terme ou RPMAT) une prise en charge clinique est alors indispensable pour prévenir au maximum l'accouchement prématuré et les risques liés à la prématurité du fœtus. Cette pathologie obstétricale courante survient dans 2 à 3% des grossesses, soit chez près de 25000 patientes par an en France (53,54).

Des facteurs extérieurs tels que l'exposition au tabac, à des polluants ou à des agents infectieux sont connus pour être des facteurs de risque de RPM. A côté de ces causes, souvent qualifiées d'environnementales, les gestes invasifs pratiqués par les obstétriciens à visée diagnostique ou thérapeutique (fœtoscopie, amniocentèse) constituent également un facteur de risque important de RPM qualifiée alors de rupture «iatrogène» (Figure 10).

Responsable d'un tiers des naissances prématurées dans le monde, conduisant elles-mêmes à 20% de mortalité périnatale, la RPM est surtout problématique pour les cliniciens à cause de l'incapacité des membranes fœtales à cicatriser (55). En effet, l'analyse (à terme) de membranes fœtales ayant subi une fœtoscopie au 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse démontre l'absence de signe témoignant d'un processus de cicatrisation notamment au niveau histologique, où aucune infiltration inflammatoire ou fibrose n'ont été observées au niveau du site de la lésion créée par le fœtoscope. Même si quelques cellules semblent proliférer au niveau du chorion, cela ne suffit pas à initier une fermeture de la lésion (56). Ainsi, cette brèche restant ouverte peut faciliter un écoulement plus ou moins important du liquide amniotique. Les principales complications de la RPM sont : l'oligohydramnios (faible volume de liquide amniotique) pouvant entraîner une hypoplasie pulmonaire chez le fœtus et la chorioamniotite. Actuellement, la prise en charge médicale des RPM ne rencontre pas de résultats satisfaisants et dépend essentiellement de l'âge gestationnel de survenue. En effet, pour les RPM survenant entre 34 et 37 SA, aucune intervention thérapeutique particulière n'est mise en place en dehors de la surveillance du risque infectieux alors qu'avant 34 SA, il





est préférable pour le fœtus que la grossesse se poursuive afin de réduire au maximum les risques liés à la prématurité.

#### A) RPM spontanée

##### i) Causes

De nombreuses étiologies de la RPM spontanée ont été rapportées dans la bibliographie, toutefois, le mécanisme précis reste encore mal connu. L'élément causal retrouvé le plus couramment est l'inflammation et/ou l'infection chronique (57). Cette dernière entraînerait une production accrue de cytokines pro-inflammatoires capable de médier le déclenchement précoce des contractions utérines ainsi que l'activation de la cascade des MMPs.

Les modifications de la balance MMPs / TIMPs dans les membranes fœtales et le liquide amniotique après RPM ont d'ailleurs été largement décrites dans la littérature (Figure 7) (27,58,59). L'activation des MMPs, sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires permettrait la dégradation du tissu lésé et favoriserait ainsi la rupture des membranes avant le terme de la grossesse.

Actuellement, les signaux permettant de provoquer une telle réponse inflammatoire au niveau des membranes restent peu connus. Les agents infectieux présents dans le tractus génital sont capables de coloniser la décidue et d'atteindre les membranes fœtales par voie ascendante, générant ainsi une micro inflammation chronique au niveau du chorion (60). Cependant, la présence de telles bactéries a également été décrite dans des membranes non pathologiques rompant à terme. Il semble alors peu probable que l'infection soit à elle seule responsable de la rupture prématurée (61). De plus, il est maintenant clairement établi qu'un processus inflammatoire peut se produire au niveau des membranes en absence d'agent pathogène. Ce type d'inflammation, dite stérile, est retrouvé très fréquemment dans les membranes de RPM



spontanée. Elle serait médiée par des protéines de type « alarmines » telles que HMGB1 en réponse à un stimulus (51,52).

A côté de cette voie inflammatoire, la relaxine, dont la quantité est augmentée en cas de RPM, serait capable d'induire l'expression des MMPs et de l'activateur tissulaire du plasminogène (46,62,63). La RPM pourrait donc être également médiée par une voie indépendante de l'inflammation.

D'autre part, des causes environnementales telles que le stress, les carences en vitamines (C et E) ou l'exposition à des substances toxiques (cocaïne, tabac, polluants) sont associées à la RPM (64–67). Ces facteurs favorisant la rupture seraient source de stress oxydatif et participeraient ainsi à la fragilisation progressive des membranes (68–72).

En outre, le risque de RPM est également augmenté en cas de grossesse multiple, de saignement vaginal, d'hématome rétroplacentaire ou d'insuffisance cervicale par exemple. Le syndrome d'Ehler Danlos, maladie génétique présentant des défauts du tissu conjonctif, prédisposerait également à la RPM.

De fait, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la RPM reste actuellement complexe de par le profil multifactoriel de cette pathologie. Une cause n'est identifiée que dans 40% des cas, rendant la prise en charge préventive de la RPM difficile.

## ii) Prise en charge

La prise en charge clinique de la RPM est hautement dépendante de l'âge gestationnel. Dans les cas de RPM précoce (avant 24 SA), une stratégie consiste à restaurer le volume de liquide amniotique perdu par amnioinfusion d'une solution saline. Cette technique devait permettre de palier aux complications liées à l'oligohydramnios telles que la distorsion faciale, l'hypoplasie pulmonaire ou le retard de croissance intra-utérin (73). Toutefois, ces tentatives n'ont jamais montré d'efficacité clinique et l'utilisation de cette technique est toujours largement discutée.



Avant 34 SA, la prise en charge des RPM vise à prolonger la grossesse au maximum afin d'éviter les risques liés à la prématurité du fœtus. A ce jour, c'est l'antibiothérapie qui a montré sa capacité à prolonger la grossesse.

Au-delà de 34SA, cette attitude dite expectative est discutée car les risques de morbidité liés à la prématurité sont rares à partir de cette période alors que les risques de chorioamniotite et d'hématome rétroplacentaire présentent un danger pour la mère et/ou le fœtus. En effet, une fois rompues, les membranes fœtales ne peuvent plus assurer leur rôle de barrière immunitaire face aux bactéries de la flore vaginale. L'antibiothérapie et la surveillance du risque infectieux deviennent alors des éléments essentiels de la prise en charge. Selon les cas, et après l'évaluation du ratio bénéfice/risque par l'obstétricien, l'accouchement sera déclenché pour palier au risque infectieux (54,64,74).

## B) RPM iatrogène

### i) Causes

La RPM iatrogène (RPMi) est une complication majeure des procédures chirurgicales fœtales. A l'inverse de la RPM spontanée, la rupture n'est pas due à une fragilisation progressive des membranes mais à l'insertion d'un instrument chirurgical traversant la poche des eaux pour pouvoir atteindre le fœtus ou le liquide amniotique. Dans ce cas, l'instrument chirurgical crée une brèche qui ne parvient pas à cicatriser. Ces procédures réalisées à visée diagnostique (amniocentèse) ou thérapeutique (fœtoscopie), entraînent un risque plus ou moins élevé de RPMi selon le diamètre de l'instrument utilisé et le nombre de sites d'entrée nécessaires à la procédure (75,76). De nombreuses études rapportent le risque de RPMi pendant ce type d'interventions chirurgicales, mais avec des chiffres parfois discordants pour une même procédure (77,78). Lors de ces dernières années, un développement accru de ces procédures « mini-invasive » est survenu. Elles permettent en effet de réduire les risques des chirurgies



fœtales réalisées anciennement « à ventre ouvert ». Les indications thérapeutiques sont nombreuses mais rares, comme par exemple l'occlusion trachéale pratiquée pour traiter l'hypoplasie pulmonaire causée par les hernies diaphragmatiques ou encore le traitement du syndrome transfuseur-transfusé, compliquant 10% des grossesses gémellaires monochoriales, qui consiste à coaguler au laser des anastomoses vasculaires entre les deux jumeaux (79).

A nouveau, et comme dans les cas de RPM spontanées, des expériences menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les membranes fœtales ne cicatrisaient pas suite à ce type d'interventions, laissant dans tous les cas un trou au niveau du site d'insertion de l'instrument (56,80). Toutefois, dans certains cas il semblerait que l'amnios et le chorion glissent naturellement l'un par rapport à l'autre, limitant ainsi la fuite du liquide amniotique (81).

#### ii) Prise en charge

Deux types de stratégies thérapeutiques sont actuellement envisagés. La première, appelée amnio-patch, consiste à injecter des plaquettes puis du cryoprécipité (plasma congelé) dans la cavité amniotique (82). Des expériences réalisées *in vitro* ont en effet démontré leur capacité à adhérer à l'amnios lésé pour y former un clou plaquettaire obturant la brèche. Cette stratégie, décrite pour la première fois par Quintero *et al.* en 1996, permet de traiter les symptômes d'une RPMi confirmée en limitant la fuite de liquide et le risque infectieux. Malgré des résultats prometteurs, l'efficacité et l'innocuité de cette technique restent encore à démontrer. En effet, des cas de morts fœtales *in utero* inexplicables ont été observés chez certaines patientes et mettent en cause les facteurs relargués lors de l'activation des plaquettes. De plus, l'efficacité de cette technique, de ce fait très peu utilisée par les cliniciens, reste difficile à confirmer du fait de l'absence de groupe contrôle et du nombre limité de patientes incluses dans les études (55,83,84).

La seconde prise en charge est une stratégie préventive. Elle consiste à combler la brèche créée par l'instrument chirurgical (aiguille ou fœtoscope) en appliquant un bouchon (plug) de





collagène au moment du retrait de l'instrument. L'efficacité de cette technique a été démontrée *in vivo* sur le modèle lapin : le plug de collagène obture la brèche créée par le fœtoscope et limite la fuite du liquide amniotique, empêchant ainsi l'oligohydramnios et l'hypoplasie pulmonaire en résultant (85). Malgré ces résultats prometteurs, cette technique montre actuellement une faible efficacité en clinique (86) et nécessite donc des travaux de recherche pour optimiser son utilisation chez l'Homme. Ces dernières années, plusieurs études ont été menées dans le but d'améliorer cette dernière stratégie en potentialisant au mieux la cicatrisation au niveau de la brèche membranaire demeurant inexistante si le plug inerte est utilisé seul (87–95).

Ainsi, et dans le but de permettre une meilleure cicatrisation des membranes fœtales lésées, la vitamine A et ses dérivés actifs déjà largement utilisés en pratique clinique apparaissent comme des adjuvants potentiellement prometteurs pour optimiser cette stratégie. Cette hypothèse s'appuie sur l'importante bibliographie déjà parue sur cette thématique et dont les principaux résultats, en rapport avec ce travail de thèse, sont décrits ci-après.



# PARTIE 2 : La vitamine A.

## **I- Définition des rétinoïdes**

A) Structure

B) Propriétés générales

C) Sources de vitamine A

## **II- Métabolisme des rétinoïdes**

A) Du bol alimentaire au foie

B) Stockage hépatique

C) Du foie aux cellules cibles

D) Synthèse des acides rétinoïques

E) Catabolisme

## **III- Régulation de l'expression des gènes par les acides rétinoïques**

A) Récepteurs nucléaires des acides rétinoïques

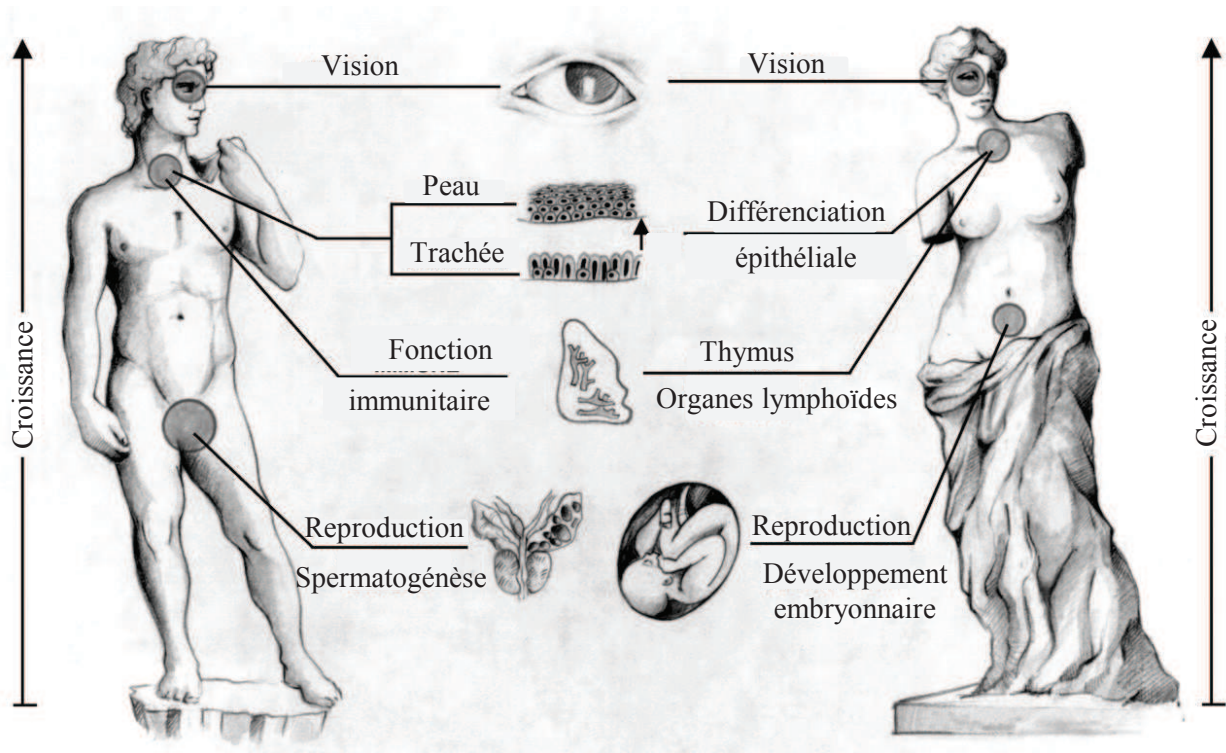
B) Mécanisme d'action

C) Exemples de gènes régulés par la vitamine A

## **IV- Fonctions de la vitamine A**

A) Rôles pléiotropiques de la Vitamine A, de la vie *in utero* à l'âge adulte

B) Vitamine A et cicatrisation : intérêt pharmacologique



**Figure 11:** Principales fonctions de la vitamine A et de ses dérivés.  
 (D'après Ross et al., 2000) (99)

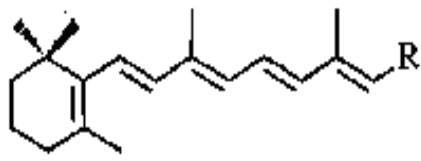
## I- Définition des rétinoïdes

Composés dérivés de la vitamine A, les rétinoïdes appartiennent à la famille des isoprénoïdes comprenant le rétinol ainsi qu'un ensemble de dérivés apparentés.

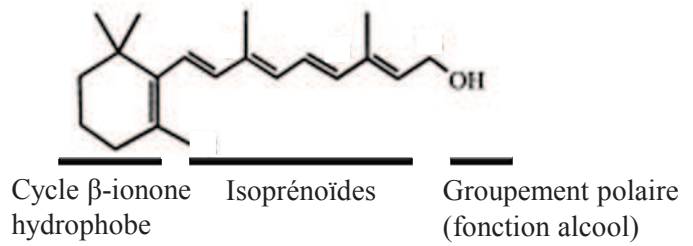
La vitamine A (également appelée tout-trans rétinol) a été découverte en 1913 par McCollum et Davis grâce à des expériences nutritionnelles réalisées chez le rat. Leur étude démontra que le jaune d'œuf et le beurre étaient capables de restaurer la croissance de rats nourris pendant plusieurs mois avec un régime pauvre en caséine, en glucides et en sels à l'inverse du lard et de l'huile qui n'avaient pas d'effet (96). Peu après, ils isolèrent ce composé actif du reste de la matière grasse par solubilisation dans l'alcool éthylique et le nommèrent « facteur A ». Ce facteur liposoluble devint ensuite la vitamine A ; terme inventé par Casimir Funk, désignant la contraction de « vital » pour la vie et « amine » pour son appartenance à la classe des composés organiques.

Son importance dans la reproduction fut démontrée quelques années plus tard (97). Depuis, les rôles de la vitamine A ont été largement étayés grâce à des études nutritionnelles, puis génétiques, sur des modèles animaux ainsi que par des études cliniques sur des populations présentant des déficiences en vitamine A (98). Apportée exclusivement par l'alimentation, la vitamine A et ses dérivés métaboliques sont essentiels à la vie. Ils jouent en effet un rôle crucial dans de nombreuses grandes fonctions physiologiques telles que la reproduction, le développement embryonnaire, la croissance, la vision, le maintien des épithéliums et l'immunité (Figure 11) (99).

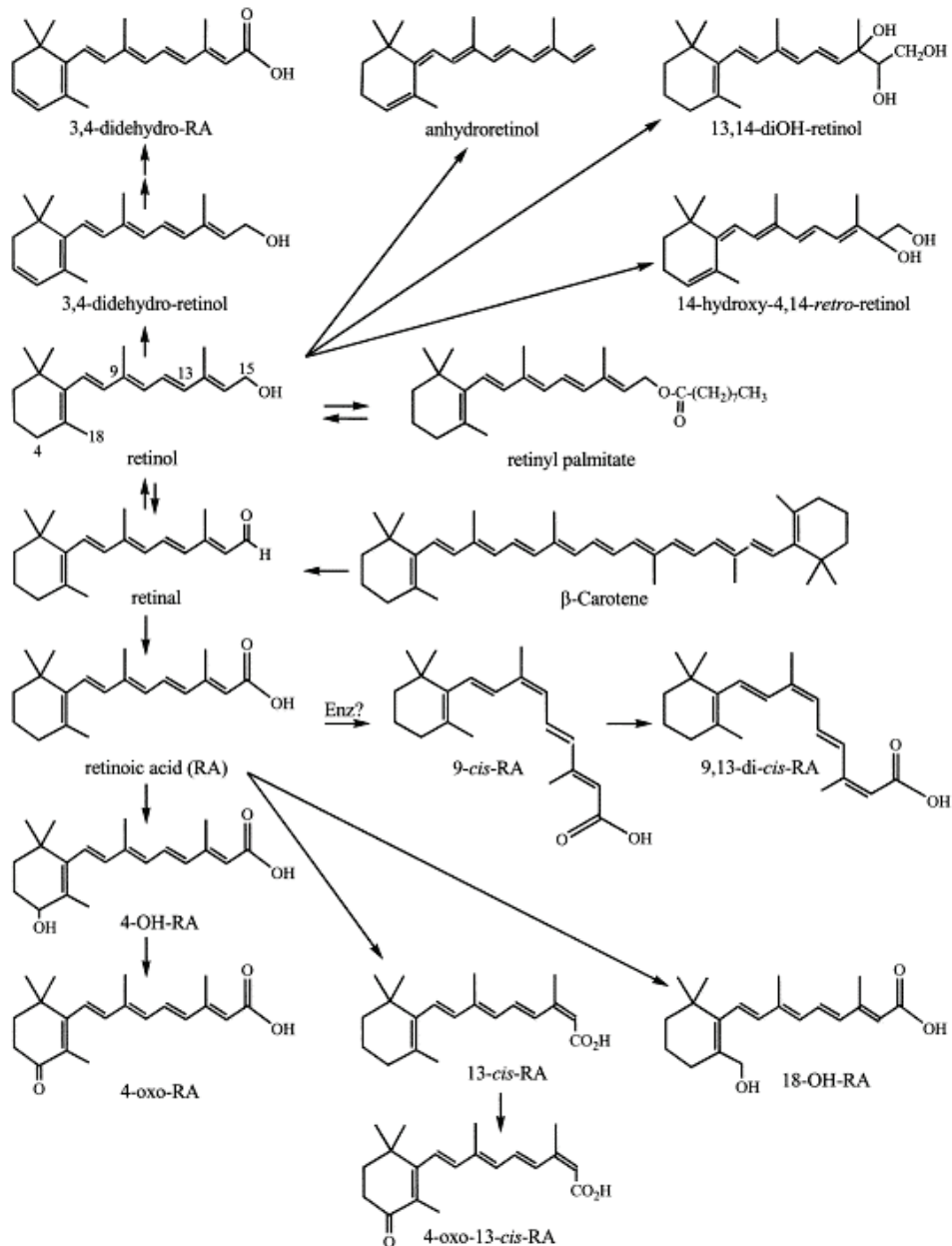
A) Rétinoïdes



B) Rétinol (Vitamine A)



C)



**Figure 12:** Structure des rétinoïdes

A) Structure générale des rétinoïdes. R représente un groupement fonctionnel propre à chaque rétinoïde.

B) Structure du rétinol. Ici, le groupement fonctionnel est un groupement alcool.

C) Structure des principaux composés de la famille des rétinoïdes.

(D'après Liébecq et al., 1997 ; Napoli et al., 1999) (101-102)

## A) Structure

Selon l'IUPAC-IUBMB, les rétinoïdes sont définis comme des composés monocycliques contenant une chaîne de 5 doubles liaisons carbone et un groupe fonctionnel situé à l'extrémité de la chaîne latérale qui est propre à chaque rétinoïde (Figure 12A) (100,101). Cette famille comprend le rétinol (ou Vitamine A) (Figure 12B) et un ensemble de dérivés biologiques et synthétiques apparentés. Ils peuvent être classés en trois formes : le rétinol et ses formes de stockage, le rétinal (ou rétinaldéhyde) et les acides rétinoïques (Figure 12C) (102).

La structure de la vitamine A (ou « tout-trans-rétinol ») fut définie en 1931 par Karrer *et al.* puis cristallisée en 1937 (103). Elle se compose d'une partie hydrophobe (cycle  $\beta$ -ionone), de quatre unités d'isoprénoïdes et d'une fonction alcool constituant le groupement polaire à son extrémité.

## B) Propriétés générales

Le rétinol et ses dérivés sont des molécules très instables en présence de lumière et sensibles aux agents oxydants. De ce fait, le rétinol est estérifié en rétinylesters (RE) une fois dans l'organisme pour y être stocké. Parmi ceux-ci, les acides palmitiques, oléiques et linoléiques sont les formes de RE les plus abondantes chez l'Homme (104).

Malgré les nombreuses formes existantes du rétinol et des acides rétinoïques, il semblerait que les formes oxydées (oxo-) et conjuguées (hydroxy-), présentes à des concentrations très faibles, n'aient pas d'activité biologique. Même si certaines de ces formes pourraient toutefois jouer un rôle biologique, il paraît très probable que la plupart soient des produits du catabolisme destinés à être éliminés par l'organisme (104).





La vitamine A étant une vitamine liposoluble, son transport au sein des fluides biologiques, tels que le plasma ou les liquides intra- et extracellulaires, nécessite de nombreuses protéines. Parmi celles-ci, la protéine RBP lui permet de circuler dans le sang et de rejoindre ainsi ses tissus cibles.

Le rétinal, ou rétinaldéhyde, est majoritairement présent sous la forme de 11-cis-rétinal. Il joue un rôle crucial dans la vision et plus particulièrement dans la phototransduction. En absorbant la lumière, le 11-cis-rétinal s'isomérisse pour donner le tout-trans-rétinal. Ce changement de conformation permet alors d'activer une protéine, l'opsine, dont le rôle est de convertir le signal lumineux en signal électrique.

La structure des rétinoïdes, et plus particulièrement leur chaîne latérale constituée d'alternances entre des doubles et des simples liaisons, leur confère la capacité à absorber la lumière (entre 300 et 400nm), ce sont des chromophores.

### C) Sources alimentaires

Bien que la vitamine A soit vitale pour l'organisme, aucun mammifère n'est capable de la synthétiser *de novo*. Elle est uniquement apportée par l'alimentation, principalement sous forme de caroténoïdes.

Ces molécules sont présentes naturellement dans tous les organismes photosynthétiques et sont responsables des couleurs jaune et rouge de la plupart des fruits, des légumes et des fleurs. Les caroténoïdes ingérés en grande quantité par certains oiseaux, insectes et invertébrés marins leur confèrent également une couleur caractéristique. Commercialement, ils sont d'ailleurs utilisés en tant que colorants alimentaires mais aussi en tant que complément nutritionnel pour leur apport en vitamine A (105).



Les plantes et les animaux sont capables de cliver les caroténoïdes et de les métaboliser pour former les différents dérivés des rétinoïdes indispensables à la vie. Sur près de 600 caroténoïdes identifiés à ce jour, seulement 10% sont des précurseurs de la vitamine A, dont le  $\beta$ -carotène qui est de loin le principal. Très présents dans les fruits et légumes les caroténoïdes peuvent également être ingérés en consommant des œufs, de la volaille ou du poisson mais dans une moindre mesure. Enfin, l'Homme en tant qu'omnivore, peut ingérer directement du rétinol ou des RE (stockés dans le foie) en consommant des produits carnés issus de tissus ayant déjà converti les caroténoïdes en rétinoïdes (106).

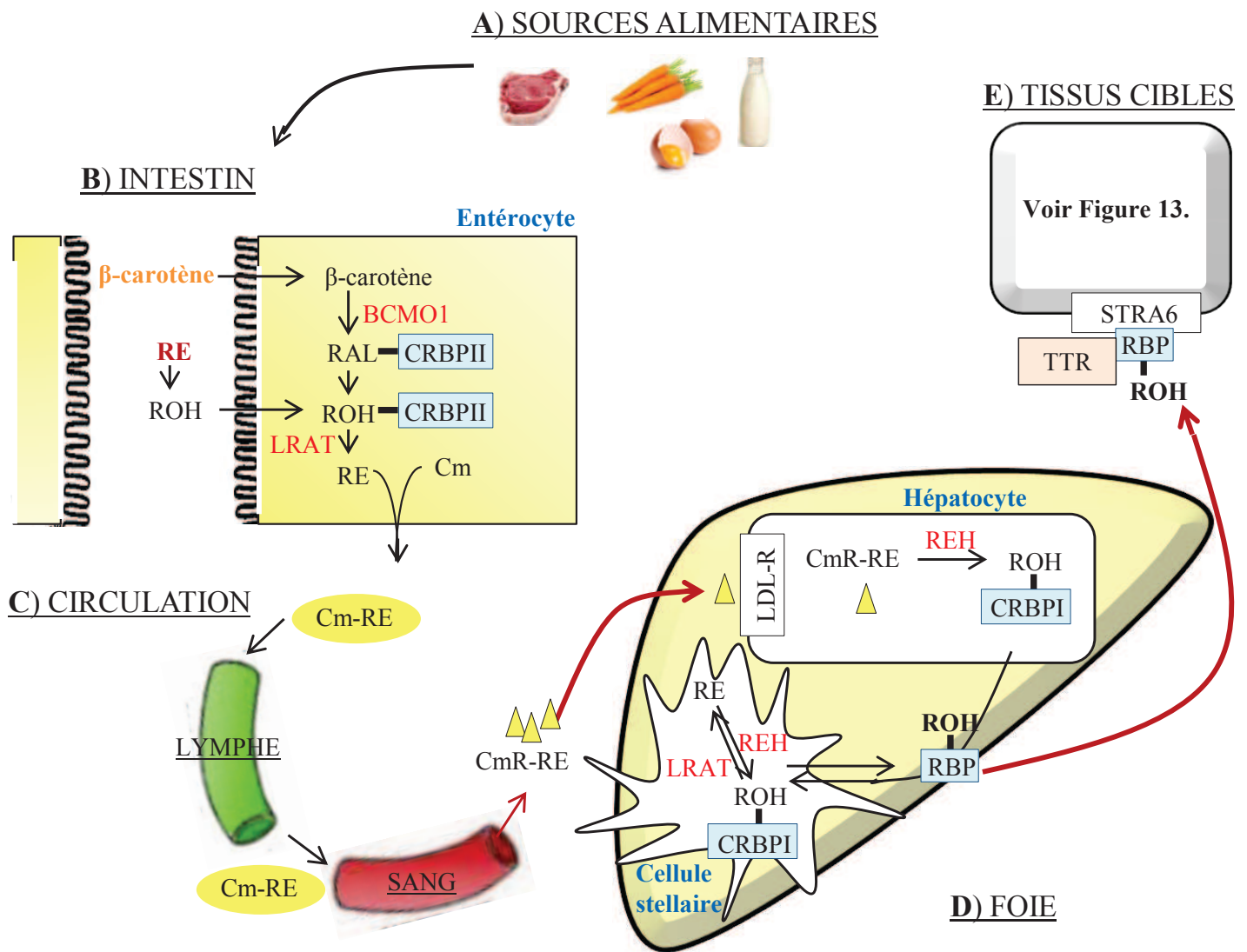
## **II- Métabolisme des rétinoïdes**

De nombreuses études réalisées notamment sur des modèles de souris déficientes pour les acteurs de la voie des rétinoïdes (enzymes, protéines de transport) ont permis une compréhension détaillée de leur métabolisme. Il faudra attendre les années 80 pour comprendre la voie de transduction du signal de l'acide rétinoïque (dérivé actif de la vitamine A) qui fut établie lors de la découverte des récepteurs nucléaires aux acides rétinoïques RAR et RXR.

Ainsi, les rétinoïdes présentent un métabolisme complexe hautement régulé, dont les acteurs sont de nos jours largement décrits dans la littérature.

### A) Du bol alimentaire au foie

L'intestin est le premier site du métabolisme des caroténoïdes apportés par l'alimentation. Ils sont pris en charge par les entérocytes, où ils sont soit convertis en rétinol, soit empaquetés directement dans des chylomicrons pour être relargués dans la circulation lymphatique (107). Les RE apportés par l'alimentation d'origine animale sont quant à eux hydrolysés en rétinol



**Figure 13:** Absorption intestinale et stockage hépatique des rétinoïdes.

Après ingestion (A), les précurseurs de la vitamine A sont absorbés et métabolisés dans les entérocytes (B) puis intégrés dans des chylomicrons qui seront relargués dans la circulation lymphatique. Ils passent ensuite dans le sang ou ils sont remodelés en chylomicrons remnants (C). Dans environ 75% des cas, ces derniers seront pris en charge par le foie pour y être stocké sous forme de rétinyl esters (D). Selon les besoins de l'organisme, le rétinol sera relargué par le foie et acheminé vers ses tissus cibles via la circulation sanguine (E). Dans le plasma, le rétinol est transporté grâce à la protéine RBP, elle-même associée à une autre protéine, la transthyrétine.

(D'après blomhoff et blomhoff, 2006) (98)

RE: rétinyl ester, RAL: rétinal, ROH: rétinol, CmR: Chylomicron remnants, BCMO1:  $\beta$ -carotène monooxygénase, LRAT:retinol acyl transferase, REH: retinyl ester hydrolase, CRBPI/II: cellular retinol binding protein type I/II, RBP: retinol binding protein, TTR: transthyrétine.

pour pouvoir être absorbés puis de nouveau convertis en RE au sein des entérocytes pour être eux aussi empaquetés dans des chylomicrons (Figure 13).

#### i) Absorption intestinale

L'absorption intestinale des caroténoïdes a longtemps été attribuée à une diffusion passive. Ce dogme a cependant été remis en cause ces dernières années, soulevant l'hypothèse de mécanismes plus complexes mettant en jeu des transporteurs spécifiques. Par exemple, un article paru en 2002 a démontré que l'absorption intestinale des caroténoïdes dépendait de leur concentration. Plus en détail, une augmentation d'apport en caroténoïdes entraînerait une diminution de leur absorption, probablement par un phénomène de saturation appuyant ainsi l'hypothèse d'une absorption médiée par des transporteurs spécifiques (108). Depuis, la protéine de transport clé impliquée dans l'absorption du  $\beta$ -carotène a été identifiée : SR-BI (109).

Les RE du bol alimentaire présents dans la lumière intestinale doivent quant à eux être hydrolysés en rétinol pour pouvoir être absorbés par les entérocytes. Cette étape est assurée soit par les enzymes PTL (pancreatic triglyceride lipase) et PLRP2 (pancreatic lipase-related protein 2), qui agissent en synergie dans la lumière intestinale, soit par une REH (rétinyl esters hydrolase) présente au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (109,110).

#### ii) Métabolisme dans les entérocytes

Une fois dans les entérocytes, une partie du  $\beta$ -carotène peut être directement intégrée dans des chylomicrons et transportée intacte vers les tissus cibles extra-intestinaux.

L'autre partie du  $\beta$ -carotène est convertie en rétinol par l'enzyme BCMO1 ( $\beta$ -carotène monooxygénase) (111). Il a été démontré que l'expression tissulaire de cette enzyme ne se limitait pas à l'intestin. Elle est également retrouvée dans d'autres organes tels que les



testicules, les poumons et le foie, permettant alors une absorption directe du  $\beta$ -carotène par ces autres tissus (104). Ne pouvant circuler dans un environnement aqueux, le rétinol est pris en charge par une protéine de liaison, CRBP II (cellular retinol binding protein type II), puis réduit en rétinol par une rétinol réductase intestinale.

Le rétinol formé dans les entérocytes (à partir des RE ou des caroténoïdes) est ensuite pris en charge par CRBP II puis converti en RE par les enzymes LRAT (lecithin : retinol acyl transferase) et ARAT (acyl-CoA: retinol acyl transferase). D'après une étude parue en 2005 utilisant un modèle de souris LRAT<sup>-/-</sup>, il semblerait que 90% de la conversion intestinale du rétinol en RE soit assuré par LRAT (112). Les RE sont ensuite intégrés dans des chylomicrons, composés d'agrégats de molécules de triacyl glycérol et de phospholipides, ou dans des gouttelettes lipidiques de basse densité (113).

### iii) Acheminement des chylomicrons

Ces composés passent d'abord dans la lymphe avant de rejoindre la circulation générale qui les acheminera soit vers le foie, soit directement vers les tissus cibles. Une fois dans la circulation générale, ils sont remodelés en chylomicrons remnants par hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase et par acquisition de l'apolipoprotéine E. Environ 3/4 des chylomicrons remnants seront pris en charge par le foie pour y être stockés. Les autres seront absorbés par des tissus extra-hépatiques tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, la rate, les reins, les muscles squelettiques ou par le placenta pendant la grossesse (114,115).

## B) Stockage hépatique

Les chylomicrons remnants sont tout d'abord séquestrés dans l'espace de Disse, situé entre les capillaires du foie et les hépatocytes, probablement grâce à leur liaison à des protéoglycanes héparine sulfate (PGHS) présents à la surface des hépatocytes. Leur internalisation par endocytose est ensuite assurée par deux types de récepteurs : le LDL-R (low density





lipoprotein-receptor), présentant une forte affinité pour l'apoE, semble être le récepteur majoritaire pour une absorption rapide, à l'inverse, le LRP (LDL receptor related protein) permettrait une internalisation plus lente du fait de sa plus faible affinité pour l'apoE (116).

Dans les hépatocytes, de nombreuses enzymes semblent capables de reconnaître les RE comme substrats et permettent ainsi leur conversion en rétinol au sein des endosomes précoces. Ces enzymes comprennent aussi bien des carboxylesterases que des lipases et sont regroupées sous le nom de rétinyl ester hydrolases (REH) (117).

Le rétinol synthétisé est ensuite pris en charge par CRBP1 puis transporté vers les cellules stellaires du foie pour y être stocké sous forme de RE. Historiquement, la protéine RBP était considérée comme le seul transporteur du rétinol des hépatocytes vers les cellules stellaires. Cependant, des études plus récentes tendent à contredire cette hypothèse et proposent même une implication de CRBP1 dans ce transport pourtant extracellulaire (118,119). En cas d'apport alimentaire insuffisant en vitamine A, le rétinol synthétisé dans les hépatocytes peut être directement transporté vers ses tissus cibles grâce à la protéine RBP produite et sécrétée par le foie.

Dans les cellules stellaires, le rétinol est ré-estérifié en RE par l'enzyme LRAT. Sa forme majoritaire de stockage est l'acide palmitique, mais les acides linoléiques et oléiques sont également retrouvés. Ces RE sont alors empaquetés dans des gouttelettes lipidiques dont le nombre et la taille dépendent de la quantité de rétinoïdes absorbés (120). Ils seront de nouveau hydrolysés en rétinol en cas de besoin de l'organisme pour être acheminés vers les cellules cibles.

De plus, il est intéressant de noter que la voie des rétinoïdes est également essentielle au foie lui-même. Ainsi, le rétinol peut être converti en acides rétinoïques au niveau des cellules



stellaires. Ces derniers pourront alors exercer leur fonction de régulateur transcriptionnel en se fixant à leurs récepteurs nucléaires présents au niveau du foie (121) (cf. II.D).

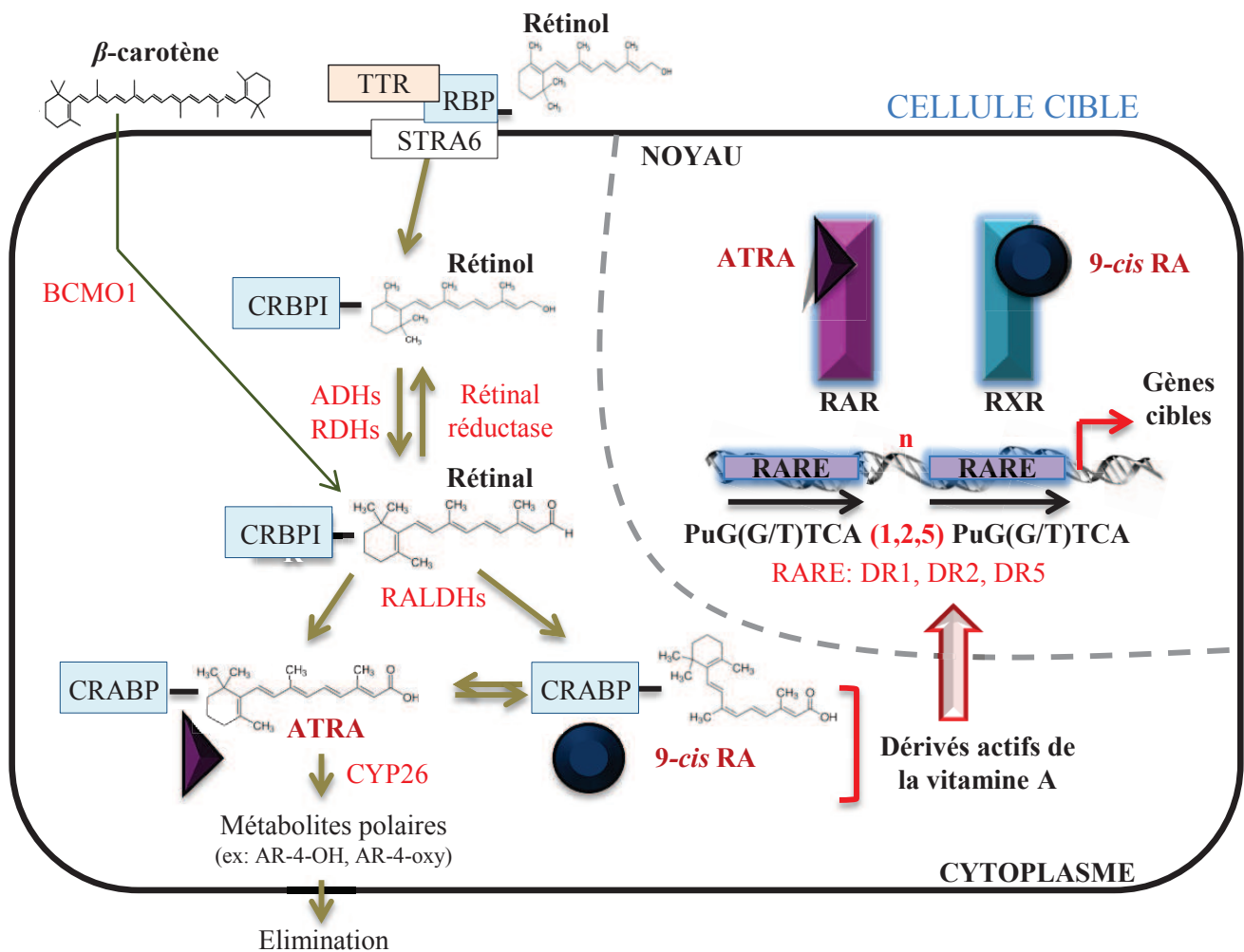
### C) Du foie aux cellules cibles

La mobilisation du rétinol par le foie est un mécanisme très contrôlé et dépendant des besoins de l'organisme. En effet, les rétinoïdes sont essentiels à de nombreux tissus et doivent y être acheminés en vue d'une absorption.

Le rétinol étant une vitamine liposoluble, il se déplace dans le sang grâce à sa liaison à la protéine de transport RBP (Retinol binding protein). Cette protéine comporte une poche hydrophobe capable de fixer et de protéger la molécule de rétinol de l'oxydation. Dans le sang, elle est associée à une autre protéine dans 95% des cas : la transthyrétine, ou pré-albumine. Cette dernière protège le complexe rétinol-RBP de la filtration glomérulaire et leur permet donc de rester dans le sang (122,123).

L'importance de RBP dans le transport du rétinol plasmatique a pu être démontrée grâce au modèle de souris RBP<sup>-/-</sup>. Ces dernières présentaient un taux très élevé de rétinol et de RE hépatiques alors que leur taux de rétinol plasmatique était anormalement bas du fait de leur incapacité à véhiculer le rétinol dans le sang (119).

L'absorption du rétinol par ses cellules cibles est réalisée par l'intermédiaire du récepteur membranaire STRA6. Ce récepteur est capable de fixer RBP, permettant ainsi le transfert du rétinol vers l'intérieur de la cellule. Conformément aux nombreuses fonctions de la vitamine A dans l'organisme, le récepteur membranaire STRA6 (stimulated by retinoic acid 6) est exprimé dans de très nombreux tissus aussi bien pendant la période embryonnaire et fœtale qu'à l'âge adulte (124,125).



**Figure 14:** Métabolisme des rétinoïdes au sein d'une cellule cible.

Le rétinol entre dans la cellule grâce à son récepteur membranaire STRA6. Il est ensuite métabolisé en rétinal qui subira une deuxième étape d'oxydation pour former les acides rétinoïques. Ces derniers seront alors transloqués dans le noyau où ils réguleront la transcription de leurs gènes cibles après fixation à leurs récepteurs nucléaires RAR et RXR.

(D'après Comptour et Rouzaire, publication n°1 en révision dans Cellular and Molecular Life Sciences)

RBP: retinol binding protein, TTR: transthyrétine, CRBPI/II: cellular retinol binding protein type I, CRABP: cellular retinoic acids binding protein, BCMO1: β-carotène monooxygénase, ADH/RDH/RALDH: alcool/rétinol/rétinal déshydrogénases, atRA: all-trans retinoic acid, 9-cisRA: 9-cis retinoic acid, RARE retinoic acid responsive element, DR: direct repeat.

## D) Synthèse des acides rétinoïques

Les acides rétinoïques sont les principaux métabolites actifs de la vitamine A. Ils sont capables de réguler la transcription de nombreux gènes cibles au sein des différents tissus de l'organisme. Ainsi, les acides rétinoïques sont les médiateurs des principales fonctions de la vitamine A.

Une fois internalisé dans une cellule cible, le rétinol est pris en charge par des protéines de liaison intracellulaire de haute affinité : les Cellular Retinol Binding Proteins (CRBPI, II et III). Il subira ensuite deux étapes d'oxydation pour être converti en rétinol puis en acides rétinoïques (Figure 14).

### i) Conversion du rétinol en rétinol

La première étape de la synthèse des acides rétinoïques est la conversion du rétinol en rétinol, ou rétinolaldéhyde. Cette première oxydation est catalysée par deux types d'enzymes : les alcools déshydrogénases (ADH) et les rétinols déshydrogénases (RDH) (126).

Les ADH appartiennent à la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne (MDRs). Les ADHs présentes chez l'Homme sont les ADH1, 2, 3 et 4. Cependant, seules les ADH3 et 4 semblent participer à la génération de rétinol au sein des tissus cibles. D'après des études cinétiques réalisées sur ces différentes ADHs, l'ADH4 est la plus active alors que l'ADH3 présente une efficacité moindre pour l'oxydation du rétinol. Les ADH1 et 2 sont quant à elles fortement exprimées dans le foie, où elles participent à la détoxification du rétinol et protègent ainsi les tissus de la toxicité du rétinol en le métabolisant en rétinol en cas d'excès (127).

Les RDH appartiennent quant à elles à la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs). Celle-ci se compose de nombreuses protéines très variées qui



participent aussi bien au métabolisme des rétinoïdes qu'à celui d'autres molécules telles que les stéroïdes, les prostaglandines, les alcools aliphatiques et les xénobiotiques (128). Ces enzymes ayant besoin d'un cofacteur pour exercer leur activité (NAD<sup>+</sup>/NADH ou NADP<sup>+</sup>/NADPH), elles sont généralement classées selon leur affinité pour ces derniers. Parmi les SDRs de hautes affinité pour NAD<sup>+</sup>/NADH, seules la rétinol déshydrogénase 4 (RoDH4) et la RoDH-like 3 $\alpha$ -hydroxysteroid deshydrogénase (RL-HSD) semblent capables de convertir le rétinol en rétinol, la RL-HSD présentant la plus grande efficacité (126,129). De même, seulement deux enzymes ont été démontrées comme capables d'oxyder le rétinol tout-trans en rétinol parmi les SDRs NADP<sup>+</sup>-dépendantes. Il s'agit des rétinol déshydrogénases 1 et 10 (RDH1 et RDH10) (130).

Cette première étape d'oxydation est réversible et assure ainsi un contrôle précis de la quantité de rétinol présent dans la cellule. La réaction inverse, qui permet donc la conversion du rétinol en rétinol, est assurée par un groupe d'enzymes cytosoliques appelées aldo-kéto réductases (131).

#### ii) Conversion du rétinol en acides rétinoïques

La conversion du rétinol en acides rétinoïques est une réaction d'oxydation irréversible. Elle est catalysée par les rétinol déshydrogénases (RALDH). Chez l'Homme, au moins trois de ces enzymes impliquées dans cette étape ont été mises en évidence : RALDH1, 2 et 3.

Historiquement, RALDH1 a d'abord été purifiée à partir du cytosol de foie de rat. Cette nouvelle enzyme était régulée à la fois par l'holo-CRBP1 (CRBP lié au rétinol ou au rétinol) et par l'atRA (132). Son importance dans la conversion du rétinol en acides rétinoïques a été mise en évidence peu après dans la rétine de souris (133). Les études réalisées par la suite ont permis de caractériser un profil d'expression très large de RALDH1, étendu à de nombreux tissus de l'organisme ainsi que de démontrer sa capacité à reconnaître le rétinol lié à CRBP1





comme substrat. Enfin, son activité est inhibée par la forme libre de CRBP1 (apo-CRBP1) (134).

Par la suite, et à partir de la séquence de RALDH1, d'autres RALDH ont été identifiées puis étudiées. Malgré un profil d'expression proche de celui de RALDH1, RALDH2 semble régulée différemment par la quantité d'atRA, reflétant la complexité de la régulation de la synthèse des acides rétinoïques (134). L'enzyme RALDH3, identifiée plus tardivement, présente également un rôle important dans la synthèse des acides rétinoïques (135).

A l'inverse des autres RALDHs, RALDH4 reconnaît uniquement le rétinol 9-cis comme substrat. Cette enzyme serait ainsi spécialisée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque 9-cis (9-cis RA), mais son rôle dans le métabolisme reste peu étudié pour l'instant (136).

#### E) Catabolisme

Le catabolisme des rétinoïdes a tout d'abord été étudié en analysant les métabolites du rétinol et des acides rétinoïques marqués dans les urines, la bile et les fèces. Ces études révèlent la présence de nombreux métabolites polaires tels que le 4-oxo RA, le 4-hydroxy RA et le 18-hydroxy RA ainsi que des formes conjuguées (notamment avec de la taurine). D'après ces études, le catabolisme aurait lieu aussi bien à partir du rétinol que des acides rétinoïques. La prédominance d'une des deux voies n'a pas été établie et les acteurs impliqués dans le catabolisme du rétinol ne sont que peu décrits dans la littérature (98).

La première enzyme impliquée dans le catabolisme des acides rétinoïques a été découverte chez le poisson zèbre par White et al. en 1997 (137). Il s'agit d'une hydroxylase appartenant à la famille des cytochromes P450, sous famille 26 : la CYP26A1. Par la suite, d'autres enzymes de la même famille ont été mises en évidence chez l'Homme : CYP26B1 et CYP26C1.



Ces enzymes sont indispensables pour maintenir l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des acides rétinoïques. Ainsi, cette régulation permet d'éviter une concentration trop élevée en AR, situation dangereuse notamment pendant l'embryogénèse où les AR présentent un risque tératogène élevé.

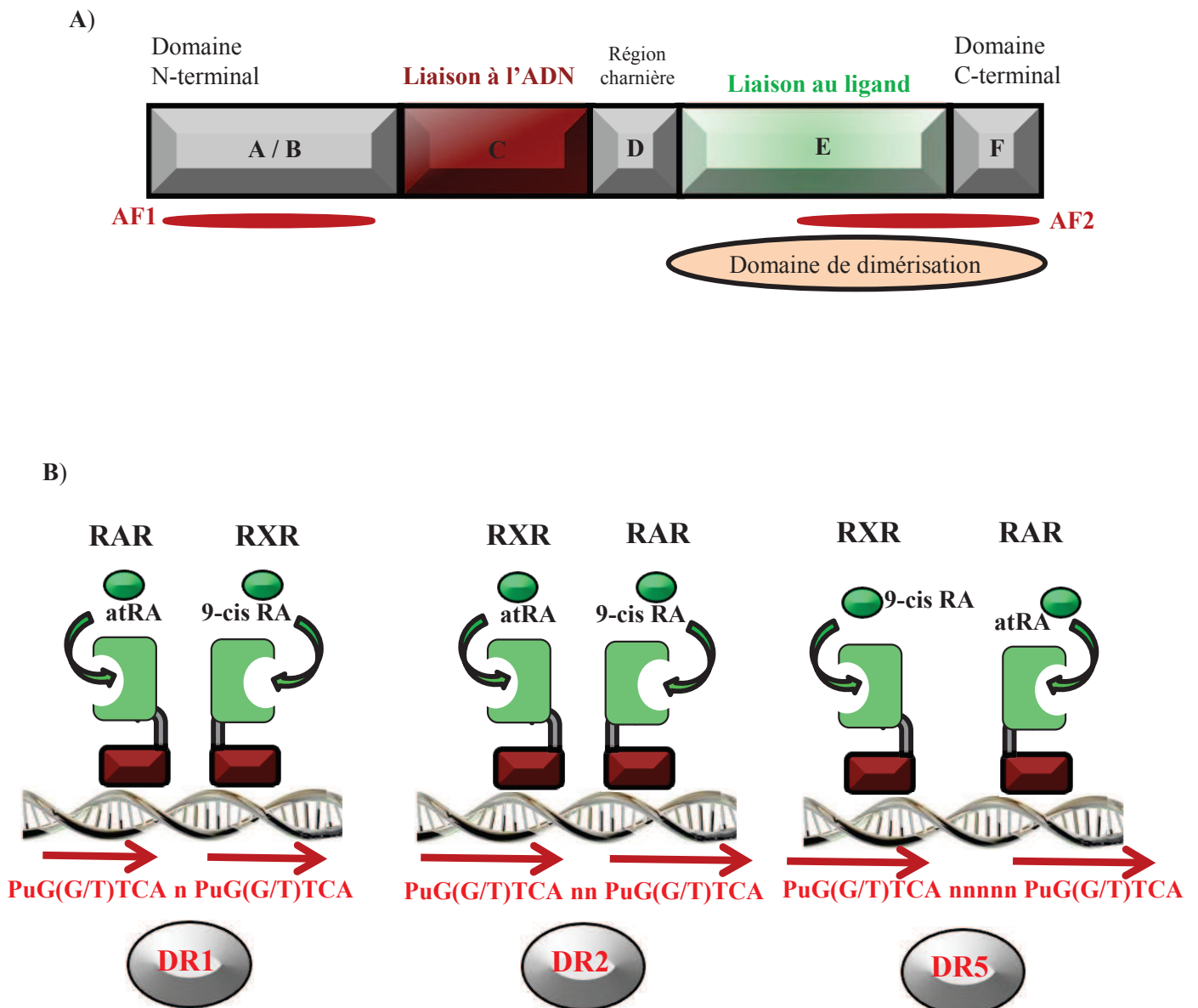
Cette dernière notion fut illustrée par le fait que les souris mutantes *CYP26A1*<sup>-/-</sup> meurent pendant la gestation à cause de défauts morphogénétiques dus à la tératogénicité des AR (138). Les souris *CYP26B1*<sup>-/-</sup> ne sont pas viables non plus et elles meurent de détresse respiratoire rapidement après la naissance et présentent de nombreuses malformations développementales (139). A l'inverse, les souris déficientes pour *CYP26C1*<sup>-/-</sup> sont viables et ne semblent pas présenter de défauts de développement probablement grâce à une compensation exercée par *CYP26A1* qui présente un profil d'expression similaire pendant l'embryogénèse (140).

### **III- Régulation de l'expression des gènes par les acides rétinoïques**

#### A) Récepteurs nucléaires des acides rétinoïques

##### i) Historique

Les effets pléiotropiques des acides rétinoïques sont médiés par leurs récepteurs RAR et RXR présents dans le noyau de leurs cellules cibles. Ces derniers appartiennent à la grande famille des récepteurs nucléaires qui regroupe de nombreuses protéines telles que le récepteur aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes, aux hormones thyroïdiennes ou encore à la vitamine D3. Ce sont tous des facteurs de transcription partageant des domaines spécifiques bien conservés, historiquement mis en évidence par des études de séquences puis de cristallographies. La plupart d'entre eux sont activables par leur ligand (par l'atRA dans le cas



**Figure 15:** Structure des récepteurs nucléaires et fixation aux RARE.

A) Illustration de la structure des récepteurs nucléaires.

B) Liaison des hétérodimères RAR/RXR à leurs éléments de réponses (RARE).

RAR et RXR reconnaissent le motif consensus 5'- Pu G (G/T)TCA- 3' séparé par 1(DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) nucléotides du motif suivant, constituant une répétition directe (DR).

(D'après Comptour et Rouzère, publication n°1 en révision dans Cellular and Molecular Life Sciences).

de RAR) mais certains ne présentent aucun ligand connu, ils sont alors appelés récepteurs orphelins (141).

Le récepteur RAR $\alpha$  est le premier récepteur aux acides rétinoïques à avoir été cloné. Il a été découvert simultanément par deux groupes de recherche en 1987 : l'équipe de Pierre Chambon (142) et de Ron Evans (143). Rapidement, deux autres isotypes de RAR ont été identifiés, RAR $\beta$  en 1988 (144) et RAR $\gamma$  en 1989 (145). Une nouvelle famille de récepteurs aux rétinoïdes a été découverte par la suite, il s'agit des récepteurs RXR (Retinoid X receptors), parmi lesquels trois isotypes ont été identifiés : RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (146).

## ii) Structure

Les récepteurs nucléaires aux rétinoïdes se composent de 6 domaines (A-F) conservés entre tous les récepteurs nucléaires (Figure 15). Cette organisation de structure leur confère la capacité à se lier spécifiquement à leurs éléments de réponse présents sur l'ADN, les RARE (retinoic acid responsive element) en permettant ainsi la fixation de leurs ligands, les acides rétinoïques.

### ❖ Le domaine A/B

Il s'agit de la partie N-terminale. Elle présente une grande variabilité de séquence et de longueur entre les différents récepteurs, conférant ainsi une identité propre à chacune des isoformes. Ces variations seraient dues à l'utilisation de promoteurs différentiels ainsi qu'à de l'épissage alternatif (147).

Cette région contient une fonction de transactivation indépendante du ligand (AF-1) capable d'interagir avec le domaine AF-2, présent à l'extrémité C-terminale, et de la moduler notamment en recrutant des protéines co-activatrices (148).



Des sites de phosphorylation ont également été mis en évidence dans cette partie N-terminale. Ils seraient la cible de nombreuses protéines kinases appartenant aux familles des CDK (cyclin dépendant kinase) et des MAP kinases (149), permettant une régulation de leur activité dépendante de ces voies de signalisation essentielles aux cellules.

Ce domaine jouerait ainsi un rôle capital dans la régulation de l'expression des gènes cibles, à la fois grâce à sa fonction AF-1 et aux modifications post-traductionnelles qu'il peut subir.

#### ❖ Le domaine C

Le domaine C, ou domaine de liaison à l'ADN présente une séquence très conservée entre les récepteurs nucléaires. Ainsi, plus de 90% de la séquence est conservée entre les 3 isotopes de RAR et de RXR dans cette région. Plus en détail, elle se compose de deux motifs de liaison en doigt de zinc responsables de la reconnaissance spécifique et de la fixation des récepteurs à leurs éléments de réponse, ou RAREs dans le cas des récepteurs aux acides rétinoïques (cf III.B) (147).

#### ❖ Le domaine D

C'est un domaine charnière entre le domaine de liaison à l'ADN (domaine C) et le domaine de liaison au ligand (domaine E). Il permet la rotation du domaine C par rapport au domaine E et permet ainsi de s'affranchir des problèmes d'encombrement stérique (150).

#### ❖ Le domaine E

Il s'agit du domaine de liaison du ligand. Deuxième région la plus conservée après le domaine C, il se compose d'un feuillet  $\beta$  et de 12 hélices  $\alpha$  (H1 à H12). Sa structure tridimensionnelle complexe permet notamment de fixer le ligand dans une poche de liaison formée par des résidus hydrophobes principalement présents dans les hélices H3, H5 et H7 et dans le feuillet  $\beta$  (151). Dans le cas des récepteurs aux acides rétinoïques, le 9-cis RA est capable de se lier à





la fois aux RXRs et aux RARs, mais avec une affinité moindre, alors que l'atRA se fixe exclusivement aux isotypes RARs.

Enfin, ce domaine contient une interface de dimérisation constituée à plus de 75% par les hélices H9 et H10, ainsi que la fonction de transactivation dépendante du ligand, AF-2. Cette dernière fonctionne en synergie avec AF-1 en permettant le recrutement de co-régulateurs (152). Des sites de phosphorylation sont également présents dans cette région et ciblés par des kinases différentes selon les récepteurs : la voie de la PKA (proteïn kinase A) pour les RARs et les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) pour RXR $\alpha$  (149), permettant une nouvelle fois un dialogue entre les récepteurs nucléaires et ces grandes voies de signalisation.

#### ❖ Le domaine F

C'est le domaine C-terminal des récepteurs nucléaires. Absent chez les récepteurs RXRs, il est présent dans les RARs avec une longueur variable entre les différents isotypes mais sa fonction n'est pas encore connue (147).

### B) Mécanisme d'action

Dans le cytoplasme, les deux isomères (atRA et 9cisRA) se fixent à des protéines de liaison appelées CRABP 1 et 2 (Cellular Retinoic Acid Biding Proteins 1/2). Ces dernières permettent leur translocation dans le noyau, où ils pourront alors se lier à leurs récepteurs nucléaires, RAR et RXR, afin de réguler la transcription de nombreux gènes dans l'organisme. Ces récepteurs agissent en hétérodimères et sont fixés de manière constitutive sur des éléments de réponse (RARE) retrouvés au sein des promoteurs de gènes cibles.

#### i) Fixation des récepteurs RARs et RXRs aux RAREs

Historiquement identifiés par des expériences de mutagénèse réalisées sur les promoteurs de gènes cibles bien connus de la vitamine A (RAR $\beta$ , CRABP, CYP26), les éléments de

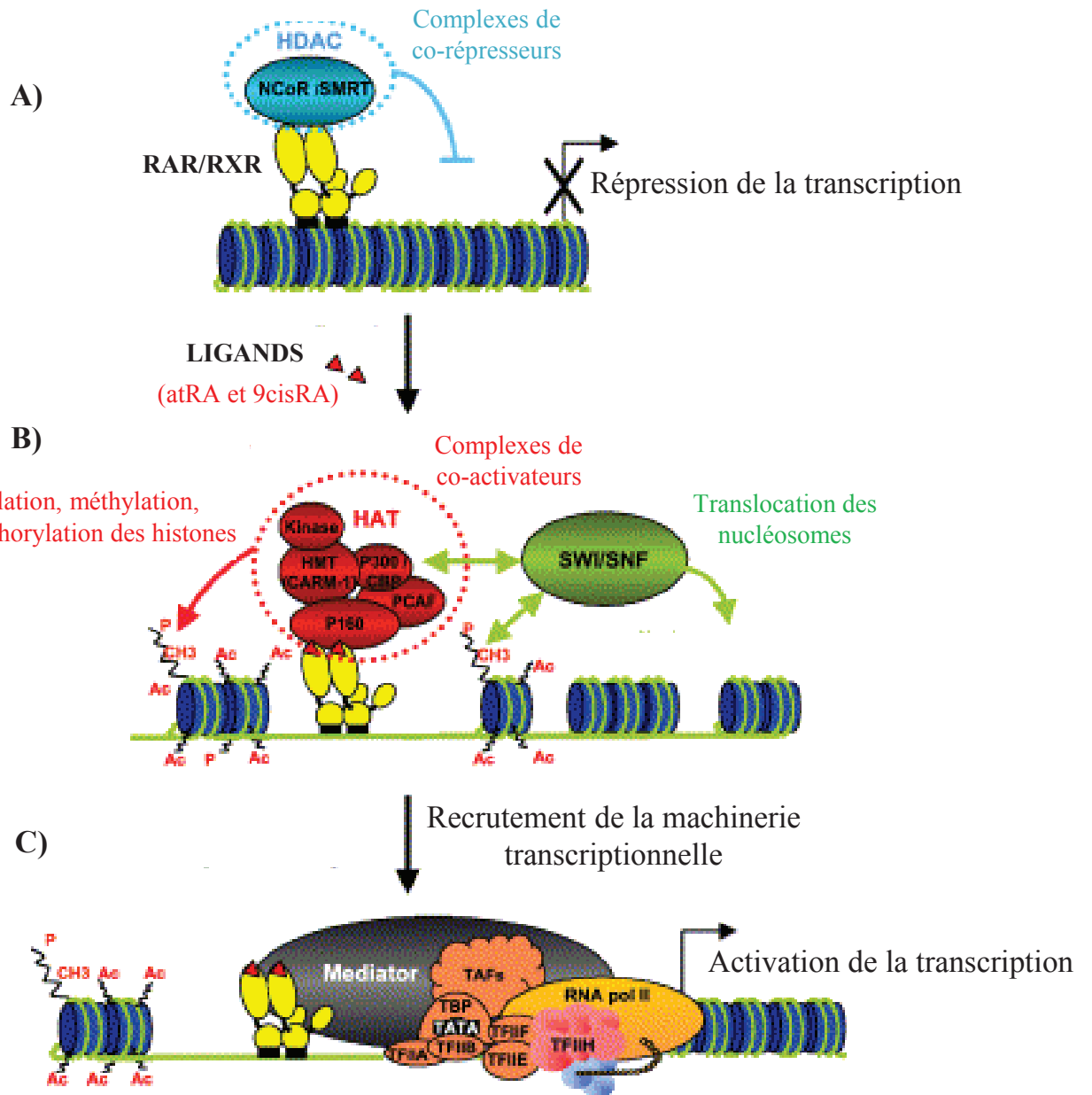


réponses aux acides rétinoïques, ou RAREs, ont par la suite été identifiés dans les promoteurs de très nombreux autres gènes. Le développement des études à grande échelle et des analyses bioinformatiques ont largement contribué à ces découvertes et ne cessent de faire augmenter le nombre de gènes cibles des acides rétinoïques (153).

Les RAREs sont composés de deux motifs hexamériques consensus PuG(G/T)TCA (Pu : purine) en répétition directe (DR : direct repeat). Classiquement, ces motifs sont séparés par 5 bases d'ADN, les RAREs prennent alors le nom de DR5. Cependant, on trouve également des RAREs composés de répétitions directes séparées par 1 (DR1) ou 2 (DR2) nucléotides. Selon le type de RARE considéré, les récepteurs vont adopter des configurations de liaison différentes:

- ❖ Les DR1 : Ils peuvent lier les homodimères RXR/RXR ainsi que les hétérodimères RAR/RXR avec le récepteur RAR situé à l'extrémité 5' et RXR en 3' du RARE. Il a été décrit que ce type de conformation pouvait être associé à un effet répresseur sur la transcription des gènes. Même si le mécanisme d'action impliqué dans la répression des gènes par les acides rétinoïques reste actuellement peu documenté, il a été mis en évidence que la position de RAR en 5' pouvait empêcher la fixation du ligand de RXR par encombrement stérique (154,155).
- ❖ Les DR2 et les DR5 : Ils lient exclusivement les hétérodimères RAR/RXR mais leur conformation est inversée par rapport à la fixation aux DR1. Ainsi, RXR occupe l'extrémité 5' alors que RAR se trouve en 3'. Ces RAREs sont très majoritairement décrits comme permettant l'activation de la transcription des gènes cibles en présence du ligand (147).

En absence de ligand, RAR et RXR sont principalement localisés dans le noyau et se lient spécifiquement à leurs RARE sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères (plus rarement),



**Figure 16:** Régulation transcriptionnelle des gènes cibles des rétinoïdes : mécanisme d'action.

(D'après Bastien J, Rochette-Egly C , 2004 )(149).

chaque récepteur se liant à un motif hexamérique via son domaine de liaison à l'ADN. Sous cette forme, les récepteurs répriment la transcription du gène cible tant que le ligand n'est pas recruté.

En plus de cette fixation constitutive de RAR et RXR sur leur RARE, des expériences de Chip-séq ont démontré que la présence du ligand (les acides rétinoïques) permettait d'augmenter le recrutement des hétérodimères sur leurs éléments de réponse. Toutefois, le mécanisme impliqué n'est pas encore connu (156).

## ii) Régulation transcriptionnelle des acides rétinoïques

Comme évoqué précédemment, les récepteurs RAR et RXR sont fixés à leurs éléments de réponse en cas d'absence de ligand. Sous cette forme, ils sont associés à des co-répresseurs tels que NCoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) capables de recruter des histones désacétylases (HDAC). Ces dernières augmentent la compaction de l'ADN en désacétylant les lysines présentes sur les queues N-terminale des histones. La transcription des gènes cibles des acides rétinoïques est ainsi maintenue réprimée en leur absence (Figure 16).

La liaison du ligand au sein de la poche de liaison de son récepteur va conduire à un changement de conformation favorisant l'interaction entre RAR et RXR et augmentant leur affinité pour l'ADN (157). De plus, ces modifications conformationnelles provoquent le départ des co-répresseurs et la formation d'une nouvelle fente hydrophobe entre les hélices H3, H4 et H12 permettant le recrutement de co-activateurs (151,158).

Parmi ces complexes co-activateurs, des acteurs favorisant la décompaction de l'ADN tels que des histones acétyltransférases (HAT), comme CBP/P300 (CREB binding protein) et P/CAF (P300/CBP associated factor), ou des histones méthyltransférases (HMT) comme CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) sont principalement retrouvés



(159,160). Ces co-activateurs partagent une caractéristique structurale commune ; il s'agit du motif conservé LxxLL (L : leucine, x : autre acide aminé) qui interagit avec le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires (161). De plus, le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF favorise l'activation de la transcription en repositionnant les nucléosomes au niveau du promoteur afin de libérer un accès à la machinerie transcriptionnelle (162).

L'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription peut alors commencer. Le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN pol II) fait suite au départ des co-activateurs occupant les récepteurs nucléaires. Un médiateur fixé à l'ARN pol II ainsi qu'au domaine AF-2 des récepteurs nucléaires permet alors le recrutement des facteurs généraux (TFII A, B, D, E, F et H) de la transcription qui vont venir s'assembler dans un ordre bien défini sur le promoteur. La formation de ce complexe de pré-initiation permet alors à l'ARN pol II de débiter la transcription du gène cible (163,164).

### C) Exemples de gènes régulés par la vitamine A

#### i) Gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes

La vitamine A est capable de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans son propre métabolisme, lui permettant notamment d'exercer un contrôle positif ou négatif sur la production et la dégradation des acides rétinoïques.

Par exemple, l'atRA peut activer la transcription de la protéine de transport CRBPI et de l'enzyme de conversion LRAT pour favoriser le stockage hépatique sous forme de REs en cas d'excès (165,166). L'atRA induit également l'expression du récepteur STRA6 dans les tissus extra-hépatiques afin d'augmenter l'entrée du rétinol dans les cellules (167). Enfin, les enzymes du catabolisme de la voie de la vitamine A (CYP26s) sont aussi induites par l'atRA qui favorise ainsi sa propre dégradation en cas d'excès (167,168).





Les acides rétinoïques peuvent également réprimer les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les deux étapes d'oxydation permettant la conversion de rétinol en rétinol puis en acides rétinoïques. Il a notamment été démontré que RALDH2 et RDH10 étaient réprimés par un traitement à l'atRA chez des embryons de xénopes (166,169,170).

Enfin, l'atRA induit la transcription de son propre récepteur (RAR) qui permettra à son tour la régulation de la transcription d'autres gènes cibles de manière indirecte. Par exemple, une étude menée sur les cellules lymphoïdes humaines démontre une rétino-induction de RAR $\alpha$ 2 et RAR $\beta$ 2 mais pas des autres isotypes. Ceci permettrait une régulation fine des effets de l'atRA notamment sur la synthèse de cytokines et d'immunoglobulines au sein de ces cellules (171). Le récepteur RAR $\beta$  est également induit par l'atRA dans les membranes fœtales humaines, permettant notamment une induction secondaire du gène cible PLAT (tissue-type plasminogen activator) impliqué dans la dynamique de la matrice extracellulaire de l'amnios (172).

#### ii) Gènes impliqués dans la structure de la matrice extracellulaire

Parmi les nombreuses grandes fonctions régulées par la vitamine A, son implication dans la dynamique des matrices extracellulaires (MEC) est essentielle au développement et présente un grand intérêt pharmacologique. En effet, la vitamine A intervient dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans la composition des MEC. Ces régulations apparaissent très complexes et dépendent du tissu considéré ainsi que des doses d'acides rétinoïques utilisées. Cependant, au regard des nombreuses études relatives à ce sujet, il semblerait que les acides rétinoïques tendent à favoriser la synthèse de la MEC, garantissant ainsi l'intégrité des différents tissus. Le rôle de la vitamine A dans la formation des matrices extracellulaires s'étend à tous les tissus de l'organisme. Ainsi, les modèles animaux déficients en vitamine A présentent des altérations fonctionnelles de nombreux organes explicables en partie par des



défauts de la MEC (173,174). Parmi les nombreux gènes impliqués dans la structuration de la MEC décrits comme étant régulés par les acides rétinoïques, quelques exemples sont cités ci-dessous :

- L'induction du gène codant pour le collagène X qui est spécifique de la MEC des cartilages (175).
- L'activation de la transcription de la sous unité  $\beta 1$  de la laminine, composant essentiel des membranes basales soutenant les épithéliums (176).
- La répression de la métalloprotéase MMP-1, dont le rôle est de dégrader les collagènes fibrillaires (177).
- L'induction du récepteur à l'acide hyaluronique ainsi que de la hyaluronate synthase (178,179), enzyme nécessaire à la synthèse de l'acide hyaluronique. Ce dernier est un constituant majeur des MEC présentant de nombreuses fonctions biologiques comme la stimulation de la migration des cellules épithéliales (180,181).

A l'inverse, la vitamine A peut aussi participer au renouvellement de la MEC en favorisant sa dégradation. Notre équipe a par exemple démontré qu'un traitement à l'atRA induisait l'expression du gène PLAT, acteur de la dégradation de la MEC, dans des cellules amniocytaires et des explants d'amnios. Une autre étude a également démontré une augmentation du ratio MMP-2/TIMP-2 dans des cellules mésenchymateuses après un traitement à l'atRA, confirmant le rôle de la vitamine A dans le remodelage de la matrice.

Les acides rétinoïques régulent donc l'expression d'un grand nombre de gènes indispensables à la dynamique des MEC, leur conférant un rôle essentiel au fonctionnement de tous les organes. Cela peut d'ores et déjà appuyer l'hypothèse de leur importance dans le maintien de l'intégrité des membranes fœtales (174).



## IV- Fonctions physiologiques et pharmacologiques de la vitamine A

### A) Rôles pléiotropiques de la Vitamine A, de la vie *in utero* à l'âge adulte

La vitamine A et ses dérivés actifs sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques parmi lesquelles la reproduction, le développement embryonnaire, la croissance, la vision, le maintien des épithéliums et l'immunité. Les études réalisées sur des modèles animaux déficients en vitamine A, puis sur des modèles KO (knock-out) pour les récepteurs nucléaires (RAR et RXR) ont largement contribué à leurs découvertes. Elles ont également permis de confirmer que les effets de la vitamine A étaient principalement médiés par l'atRA, dérivé du rétinol le plus actif, lui conférant la qualité de morphogène puissant pendant la vie *in utero*.

#### i) Reproduction

Le rôle de la vitamine A dans la spermatogenèse est connu depuis les années 1920. Les premières études réalisées chez des rats déficients en vitamine A ont mis en évidence un défaut de la spermatogenèse dû à une altération des épithéliums de l'épididyme, de la prostate et des vésicules séminales (97). Depuis, d'autres études ont confirmé ces résultats et ont démontré le rôle crucial de la vitamine A dans la différenciation des spermatogonies (182). En outre, les souris mâles  $RAR\alpha^{-/-}$  présentent une stérilité découlant de la dégénérescence de l'épithélium des tubes séminifères alors que les modèles KO  $RAR\beta$  sont fertiles (183–185).

Chez la femelle, la déficience en vitamine A affecte également la reproduction et en particulier l'implantation de l'œuf dans la caduque utérine (186). De plus, la voie de la vitamine A joue un rôle essentiel dans le développement des gonades et notamment dans l'initiation de la méiose (187,188).



## ii) Placentation

Bien que les implications morphogénétiques du rétinol au cours du développement embryonnaire soient déjà bien documentées dans la littérature (voir IV. A. iii), les recherches sur ses actions au niveau des tissus extra-embryonnaires comme le placenta et les membranes fœtales restent à l'heure actuelle moins décrites.

Le rôle des rétinoïdes dans la placentation a tout d'abord été suggéré par des études réalisées chez la souris. Dans le placenta, les protéines RBP, les STRA ainsi que les récepteurs RARs et RXRs présentent un profil d'expression spatio-temporel spécifique suggérant notamment un rôle de RAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  dans la formation du placenta définitif. De plus, l'importance de la voie des rétinoïdes dans la placentation a été démontrée à la fois chez des rats déficients en vitamine A (189) et chez des souris KO PPAR $\gamma$  (récepteur nucléaire s'hétérodimérisant avec RXR) (190), RXR $\alpha$  et RXR $\beta$ . Ces dernières présentent de graves défauts de placentation et plus particulièrement au niveau de la zone labyrinthique qui est une structure essentielle à la placentation chez la souris (191).

Chez l'Homme, la voie des rétinoïdes est présente et fonctionnelle dans le placenta (115,192). Des études suggèrent fortement leur implication dans la régulation de certaines hormones fondamentales au maintien de la grossesse comme par exemple l'hormone lactogène placentaire (hPL) (193,194) et l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) (195). En outre, il a été décrit que les rétinoïdes régulaient des étapes importantes de la placentation, telles que l'invasion trophoblastique, par l'intermédiaire de l'hétérodimère PPAR/RXR (196,197). Ainsi, des défauts de leur expression ou de leur activité ont été décrits dans des cas d'hématome rétroplacentaire et de naissance prématurée (197,198).

La fonctionnalité de la voie des rétinoïdes ainsi que son implication dans la physiopathologie ont également été démontrées au sein des membranes fœtales humaines (199). En effet, les



	SOURIS MUTANTES	VIABILITE / MORTALITE	PHENOTYPE	REFERENCES
RAR	$RAR\alpha^{-/-}$	Mortalité post-natale élevée	Défaut testiculaire et stérilité des mâles, retard de croissance, défaut du squelette et de la formation des alvéoles.	210
	$RAR\beta^{-/-}$	Viables	Défauts du squelette, d'apprentissage et de mémoire, retard de croissance, retard de croissance.	208, 212
	$RAR\gamma^{-/-}$		Stérilité des mâles, malformations congénitales, défauts de croissance.	211, 213
	$RAR\alpha^{-/-} / RAR\beta^{-/-}$	Mortalité embryonnaire ou post-natale	Malformations congénitales touchant de nombreux organes (retrouvés dans le syndrome VAD).	213-215
	$RAR\alpha^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$			
	$RAR\beta^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$			
RXR	$RXR\alpha^{-/-}$	Mortalité embryonnaire	Malformations cardiaques, oculaires et hépatiques. Altération des échanges foeto-maternelles.	216, 220
	$RXR\beta^{-/-}$	Mortalité embryonnaire dans 50% des cas	Stérilité des mâles et défauts comportementaux.	217
	$RXR\gamma^{-/-}$	Viables	Défauts comportementaux et métaboliques.	218
	$RXR\alpha^{-/-} / RXR\beta^{-/-}$	Mortalité embryonnaire	Nombreuses malformations, stérilité des mâles.	219
	$RXR\alpha^{-/-} / RXR\gamma^{-/-}$	Mortalité embryonnaire	Même phénotype que les simples KO $RXR\alpha$	218
	$RXR\beta^{-/-} / RXR\gamma^{-/-}$	Viables	Même phénotype que les simples KO $RXR\beta$	
	$RXR\alpha^{-/-} / RXR\beta^{-/-} / RXR\gamma^{-/-}$	Viables	Pas de malformations, retard de croissance. Stérilité des mâles (due à l'invalidation de $RXR\beta$ ).	218

**Figure 17: Principaux modèles de souris KO pour RAR et RXR.**

(D'après Mark et al., 2009) (184)

acides rétinoïques régulent de nombreux gènes cibles tels que l'aquaporine 3 (200), impliqué dans l'homéostasie du liquide amniotique, l'activateur tissulaire du plasminogène (PLAT) (172) et LOXL4 (Rouzair et al., soumis) impliqués dans la dynamique de la MEC.

### iii) Développement

Il a été clairement établi que la vitamine A est un composé essentiel à la conduite harmonieuse de la grossesse. L'apport en vitamine A au fœtus est assuré par le passage transplacentaire du rétinol provenant de l'alimentation maternelle. Chez l'Homme, le premier trimestre de la grossesse est une période critique où l'apport en vitamine A doit être finement régulé. En effet, une hypovitaminose (201) ou une hypervitaminose (186,202) sont associées à de nombreuses malformations fœtales touchant la plupart des organes du fœtus (notamment les yeux, le tractus génito-urinaire, les reins et le diaphragme). Dans le cas d'une carence, un apport en acides rétinoïques est capable de faire disparaître ces symptômes, confirmant ainsi leur importance (203–206).

Les modèles de souris KO des différents isotypes de RARs et RXRs ont permis d'identifier leurs fonctions précises dans le développement embryonnaire (Figure 17) (184). Il est intéressant de noter que les simples mutants (avec un seul isotype muté) présentent certains symptômes caractéristiques du syndrome de déficience en Vitamine A (VAD), à savoir des altérations pulmonaires, cardiovasculaires, diaphragmatiques, uro-génitales et oculaires (185,207–209). Malgré ces défauts de développement, la plupart des souris sont viables et présentent des dommages bien moins sévères que les doubles mutants, suggérant une redondance de fonction importante entre les isotypes (210–212). En effet, les souris KO pour RAR $\alpha$ / $\beta$ ; RAR $\alpha$ / $\gamma$  et RAR $\beta$ / $\gamma$  meurent *in utero* ou rapidement après la naissance (213–215). Parmi les récepteurs RXR, l'isotype RXR $\alpha$  semble être le plus impliqué *in vivo*, où il s'hétérodimérise avec les récepteurs RARs. Ainsi, les doubles mutants KO pour RXR  $\beta$  et  $\gamma$



ainsi que les triples mutants  $RXR\alpha^{+/-}$   $RXR\beta^{-/-}$  et  $RXR\gamma^{-/-}$  sont viables et ne présentent qu'une stérilité (chez les mâles seulement) et un défaut de croissance (Figure 17). Une seule copie de  $RXR\alpha$  est donc apparemment suffisante pour assurer la plupart des fonctions de ces récepteurs (216–220).

#### iv) Après la naissance

Comme évoqué précédemment, les apports en vitamine A restent vitaux pour l'organisme une fois la période fœtale achevée. Dans l'enfance puis dans la vie adulte, les rétinoïdes sont impliqués dans de grandes fonctions essentielles comme la croissance, la différenciation cellulaire, l'immunité et la vision.

De ce fait, la carence en vitamine A reste actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays en développement et en particulier en Asie du sud-est (Philippines, Inde, Bangladesh) et dans certains pays d'Afrique (Burkina Faso, Ethiopie, Zambie) (221). Les patients carencés présentent surtout des symptômes oculaires comme la xérophtalmie qui se caractérise par une sécheresse de l'œil pouvant aller jusqu'à la cécité. L'incidence de cette pathologie est très faible dans les pays occidentaux, où les rares cas sont retrouvés chez certains patients alcooliques du fait des atteintes hépatiques (222) et chez des personnes présentant des troubles de l'alimentation (223).

#### B) Vitamine A et cicatrisation : intérêt pharmacologique

De par ses actions pléiotropiques, la vitamine A présente des intérêts pharmacologiques divers (224). L'intérêt porté au métabolisme des rétinoïdes ces dernières décennies a permis une bonne connaissance de ses acteurs et a donné naissance au développement de nombreux agonistes et antagonistes de cette voie à des fins de recherche ou de thérapie (voir publication n°1).



Utilisée depuis longtemps en clinique, la vitamine A connaît des applications aussi bien en ophtalmologie (en cas de brûlure oculaire) (225) qu'en dermatologie (psoriasis, acné, vieillissement cutané du aux UV) (226–228) ainsi qu'en cancérologie (leucémie aigue promyélocytaire) (229). De plus, la littérature fait état des nombreuses études cliniques et expérimentales démontrant un rôle de la vitamine A dans les trois principales phases de la cicatrisation, que sont l'inflammation, la ré-épithélialisation et le remodelage tissulaire. Ces dernières font intervenir des mécanismes tissulaires - tels que la migration, la prolifération ou encore l'adhésion - assurés par de nombreux acteurs cellulaires (cellules inflammatoires, fibroblastes) et protéiques (protéines de la MEC, cytokines, facteurs de croissance) permettant la restitution d'un tissu fonctionnel après une blessure. Malgré toutes ces études démontrant les effets pro-cicatrisant de la vitamine A, aucune ne relate un lien direct entre la régulation d'un gène cible par l'atRA et ses effets potentialisateurs sur la cicatrisation.

#### i) Etudes sur modèle cellulaire

Comme évoqué précédemment (III.C. ii), la vitamine A, par ses dérivés actifs, régule plusieurs gènes impliqués dans la dynamique des MECs, processus essentiel au mécanisme de cicatrisation. Un grand nombre d'études *in vitro* ont souligné le rôle crucial des rétinoïdes dans ce remodelage tissulaire et ont ainsi permis de mieux comprendre les effets pro-cicatrisants de la vitamine A.

Au niveau de la peau par exemple, où la vitamine A connaît de nombreuses applications, l'atRA est capable de restaurer les dommages subis par les collagènes après une exposition aux UV-A en favorisant la ré-épithélialisation (230). Plus en détail, le vieillissement de la peau provoqué par les UV-A est dû à une diminution de synthèse des collagènes ainsi qu'à une altération de leur recyclage cellulaire (231). Des études réalisées sur des fibroblastes dermiques humains ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'atRA pour



contrer ces dommages induits par une exposition aux UV-A. D'une part, il semblerait que l'atRA régule directement l'expression de gènes codant pour les collagènes et les MMPs (en induisant le collagène 1 et en réprimant MMP-1) et d'autre part il favoriserait l'expression des deux acteurs impliqués dans la voie de recyclage des collagènes : la prolidase et le récepteur MRC2 (232).

Au niveau oculaire, une étude réalisée sur des cellules souches limbiques démontre que l'atRA stimule leur différenciation en cellules amplificatrices transitoires. Ces dernières permettent la ré-épithélialisation de la cornée suite à une blessure en migrant pour recouvrir la surface lésée (233).

En outre, quelques études ont tenté de mieux comprendre les effets de l'atRA en utilisant des tests de blessures sur cellules. Ces tests présentent des résultats variables en fonction des types cellulaires, mettant en évidence soit un effet prolifératif soit pro-migratoire de l'atRA, mais sans explication précise de son mécanisme d'action. Par exemple, un traitement à l'atRA sur des kératocytes de cornée humaine semble favoriser leur prolifération mais altérer leur migration lors des tests de blessures. Ces résultats sont associés à une augmentation de l'expression du collagène 1 et de nombreux protéoglycanes caractéristiques de ce type cellulaire (kératocane, lumicane, décorine) ainsi qu'à une répression des métalloprotéases MMP-1, 3 et 9 (234). A l'inverse, des tests de blessures réalisées sur les cellules épithéliales pulmonaires A549 démontrent un effet pro-migratoire de l'atRA faisant intervenir la voie de signalisation ERK (235).

## ii) Etudes sur modèle animal

Des études réalisées chez le rat ont démontré de nombreux effets bénéfiques des rétinoïdes sur la cicatrisation des blessures cutanées. Une supplémentation nutritionnelle en vitamine A favorise notamment la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce et augmente





l'afflux de macrophages au niveau de la lésion. De plus, la vascularisation est également augmentée ainsi que l'accumulation des collagènes, facilitant ainsi la restitution de l'intégrité du tissu lésé (236). Il a également été démontré qu'un traitement aux acides rétinoïques (par voie orale) était capable de restituer les effets négatifs dus à l'administration de glucocorticoïdes suite à une blessure. En effet, ils permettraient de restituer la phase d'inflammation précoce en augmentant le recrutement de macrophages et de neutrophiles au niveau du tissu lésé afin de le protéger contre des agents infectieux extérieurs (237).

Au niveau des yeux, de nombreuses études sur des souris, rats et lapins ont démontré les effets positifs de la vitamine A sur la cicatrisation et la ré-épithélialisation de cornées brûlées par bases (238–240). Par exemple, un traitement au rétinyl palmitate (ester du rétinol) sous forme de collyre permet d'améliorer la cicatrisation de la cornée des rats suite à une brûlure chimique. Les analyses d'immunofluorescence réalisées sur ces cornées montrent notamment une répression de l'expression de MMP-9, principale métalloprotéase impliquée dans la dégradation de la MEC lors d'une blessure au sein du groupe traité au rétinyl palmitate (240).

### iii) Etudes cliniques

Les rétinoïdes sont couramment utilisés en clinique pour leurs propriétés pro-cicatrisantes. Ils existent principalement sous forme de crème et de gel en dermatologie et sous forme de pommade ophtalmique dans les traitements de brûlures oculaires.

#### Dermatologie :

Le premier essai clinique testant l'effet de l'atRA (aussi appelé trétinoïne) sur le vieillissement cutané dû aux UV date des années 80 (226). Suite aux résultats très positifs de cette étude, qui proposait un traitement à base de crème contenant 0,05% de trétinoïne pendant 3 à 12 mois, les essais se sont multipliés pour confirmer cette efficacité clinique (241). Malgré les résultats



prometteurs obtenus avec d'autres formes telles que le rétinol et le rétinaldéhyde, l'atRA reste celui qui présente la meilleure efficacité bien qu'il provoque plus d'irritations.

#### Ophthalmologie :

A côté de l'utilisation courante du rétinol sous forme de pommade ophtalmique dans les traitements d'appoint des troubles de la cicatrisation cornéenne et en cas de xérophtalmie, son administration par voie orale présente également de bons résultats (242,243). Elle peut par exemple être utilisée pour améliorer la cicatrisation de la cornée suite à une procédure chirurgicale devenue très courante pour le traitement des myopies : la photokératectomie réfractive. Il a en effet été établi qu'une supplémentation en vitamine A et E permettait d'améliorer la ré-épithélialisation de la cornée suite à l'intervention, favorisant ainsi la disparition du voile cornéen, principal effet secondaire de cette procédure. De plus, les patients supplémentés semblent recouvrer plus rapidement une meilleure acuité visuelle (244).

Au regard de ces études démontrant un rôle positif des rétinoïdes sur la dynamique de la MEC et la cicatrisation et en accord avec les résultats déjà obtenus dans l'équipe, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au gène LOXL4 appartenant à la famille des lysyl oxydases (LOXs), enzymes indispensables à la formation des réseaux de collagènes.



# PARTIE 3 : Les lysyl oxydases

## **I- Structure et biosynthèse des LOXs**

A) Structure protéique

B) Biosynthèse

## **II- Diversité d'expression des LOXs**

A) Profil d'expression des LOXs

B) Expression des LOXs dans les membranes fœtales

## **III- Mécanisme d'action**

A) Mécanisme d'action extracellulaire

B) Mécanisme d'action intracellulaire

## **IV- Fonctions biologiques des LOXs**

A) Knock-out chez le modèle souris

B) Pathologies associées à une dérégulation de l'expression des LOXs

C) Fonctions biologiques des LOXs



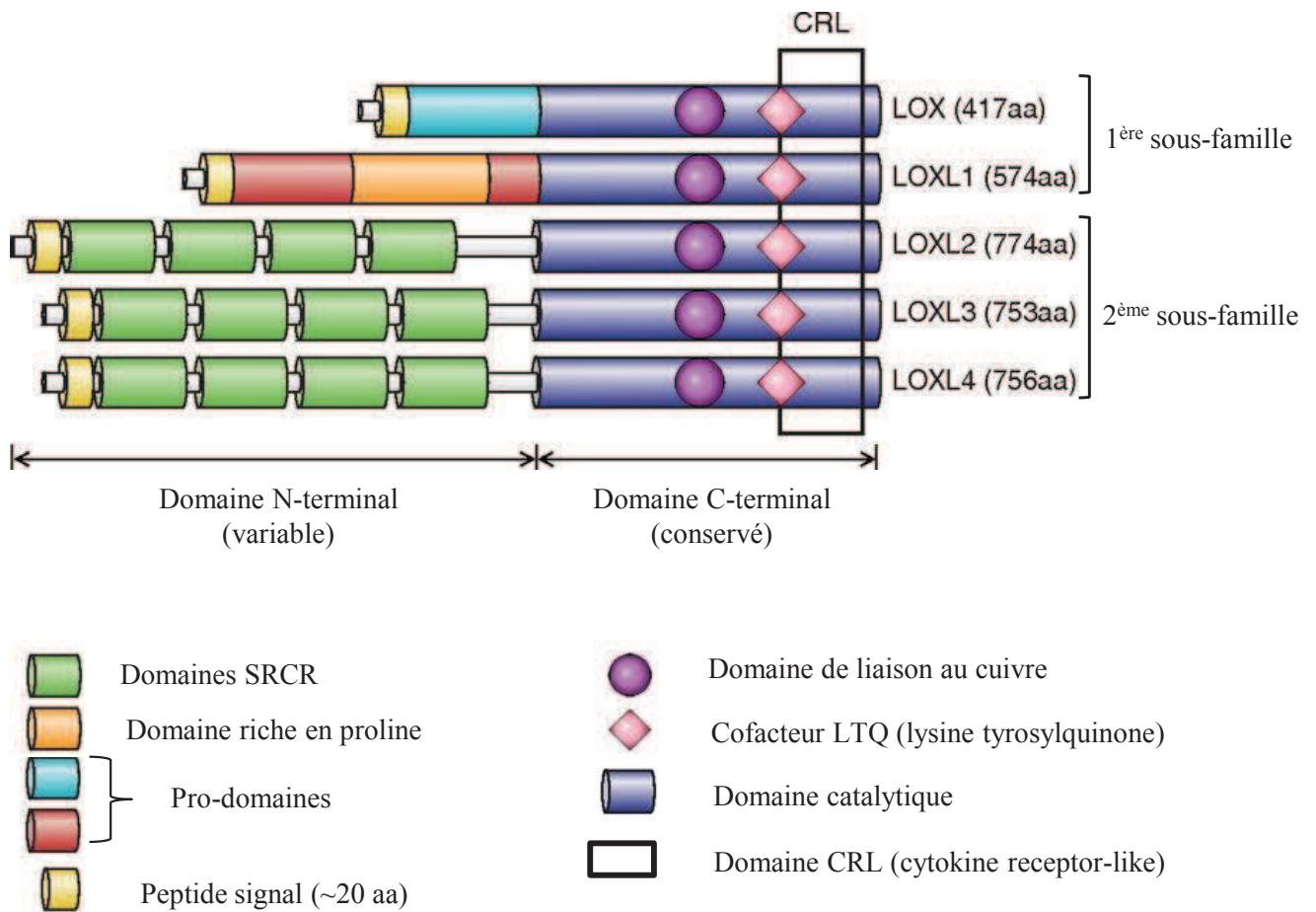
Comme présenté précédemment, les rétinoïdes sont capables de réguler un grand nombre de gènes impliqués dans la dynamique des MEC. Tous les composants de la matrice sont concernés, que ce soit les protéines solubles et les protéoglycanes constituant la substance fondamentale (l'acide hyaluronique par exemple), les protéines fibrillaires (collagènes), ou les enzymes impliqués dans leur synthèse et leur recyclage. Toutes ces molécules jouent un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation aussi bien en assurant le remodelage tissulaire qu'en favorisant la ré-épithélialisation. L'étude des lysyl oxydases, dont le rôle crucial dans la dynamique des MEC n'est plus à démontrer, apparaissait ainsi comme une piste prometteuse pour comprendre les mécanismes conférant aux rétinoïdes leur propriété pro-cicatrisante.

## **I- Structure et biosynthèse des LOXs**

Les lysyl oxydases appartiennent à la superfamille des amines oxydases dont le rôle est de catalyser l'oxydation d'une amine primaire en aldéhyde réactif. Ces enzymes sont classées en deux sous-groupes selon la nature de leur cofacteur. Le premier se compose des monoamine oxydases A et B (MAOA, B) et des polyamine oxydases (PAO), nécessitant le cofacteur FAD (dinucléotide flavine adénine) alors que le deuxième regroupe les amines oxydases qui utilisent le cuivre comme cofacteur. Ce deuxième groupe contient les diamine oxydases (DAO), les monoamine metabolizing semi-carbazide sensitive amine oxydases (SSAO) et les lysyl oxydases (LOXs).

La famille des LOXs se compose de cinq membres: LOX, premier membre identifié (245), ainsi que 4 paralogues appelés LOXL1 (246), LOXL2 (247), LOXL3 (248) et LOXL4 (249) (signifiant LOX-like protéine 1-4). Ces 5 membres sont codés par des gènes distincts localisés sur des chromosomes différents.





**Figure 18:** Structure des lysyl oxydases.

(D'après Cox et al, 2013) (254)

## A) Structure des LOXs

Initialement, les recherches sur la structure des lysyl oxydases ont été conduites en utilisant la séquence de l'ADNc de LOX, gène cloné à partir d'aortes de rats (250). Cette analyse a permis la prédiction d'une protéine de 46kDa contenant un peptide signal à son extrémité N-terminal suivi d'un domaine catalytique. Ces données structurales, d'abord confirmées dans des cellules vasculaires de rats (251,252), ont ensuite été étayées grâce à des études spectrométriques réalisées sur les différentes formes de LOX isolées à partir d'aortes de bovins. La forme mature de la protéine, migrant à 32kDa en SDS-PAGE, a ainsi pu être étudiée (253).

Ainsi, les cinq membres de la famille des LOXs comprennent un domaine C-terminal très conservé entre eux alors que le domaine N-terminal apparaît plus variable (Figure 18) (254).

### i) Le domaine C-terminal

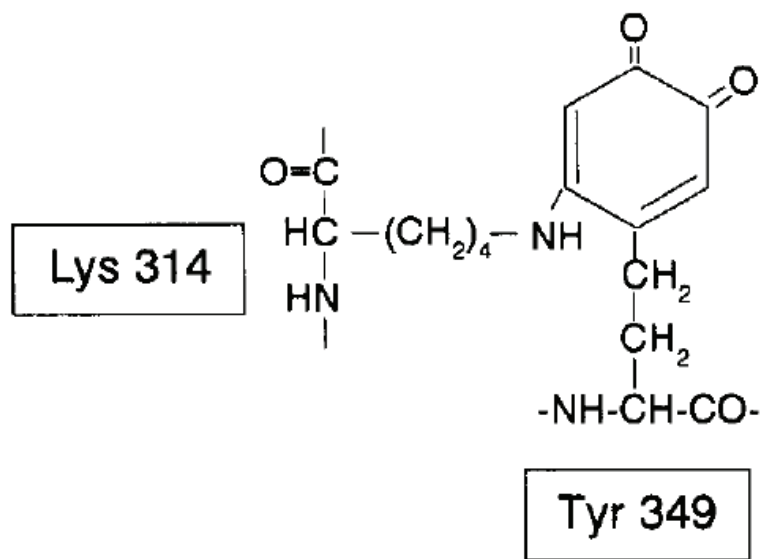
C'est le domaine catalytique des LOXs. Hautement conservé entre les différents paralogues qui partagent près de 95% d'homologie dans ce domaine (255), il présente également une bonne conservation inter-espèces (homme, rat, poulet, poisson, drosophile) (256).

Ce domaine comprend :

#### - Un domaine de liaison au cuivre

Le cuivre est un cofacteur métallique indispensable à l'activité de nombreuses enzymes parmi lesquelles les amines oxydases de la famille des DAO, des SSAO et des LOXs. Sa séquence de fixation présente toutefois une spécificité selon la famille d'enzyme considérée. Dans le cas des LOXs, l'atome de cuivre se fixe à la séquence d'acides aminés suivante: WEWHSCHQHYH (257,258).

#### - Un cofacteur LTQ (lysine tyrosylquinone).



**Figure 19:** Structure du cofacteur LTQ (Lysyl Tyrosyl Quinone) des LOXs.

La chaîne latérale de la lysine en position 314 se fixe au cycle aromatique de la tyrosine 349 formant ainsi le co-facteur LTQ indispensable à l'activité catalytique des LOXs.

(D'après Wang et al, 1996) (259)

La LTQ est un cofacteur organique directement formé sur l'enzyme pendant sa biosynthèse. Cette réaction autocatalytique implique la fixation de la chaîne latérale d'une lysine (en position 314) au cycle aromatique d'une tyrosine oxydée située ailleurs sur la chaîne protéique (en position 349) (Figure 19). Ce cofacteur est spécifique des LOXs et permettrait notamment de stabiliser l'ion cuivre et de le rendre disponible pour la réaction (256,259).

- Un domaine « cytokine receptor-like » (CRL).

Ce domaine inclut le site actif de l'enzyme (256). Comme son nom l'indique, il présente des homologies de séquence avec les récepteurs aux cytokines et plus particulièrement au niveau de la séquence consensus située dans la région N-terminale (comprenant 4 cystéines) (255).

ii) Le domaine N-terminal

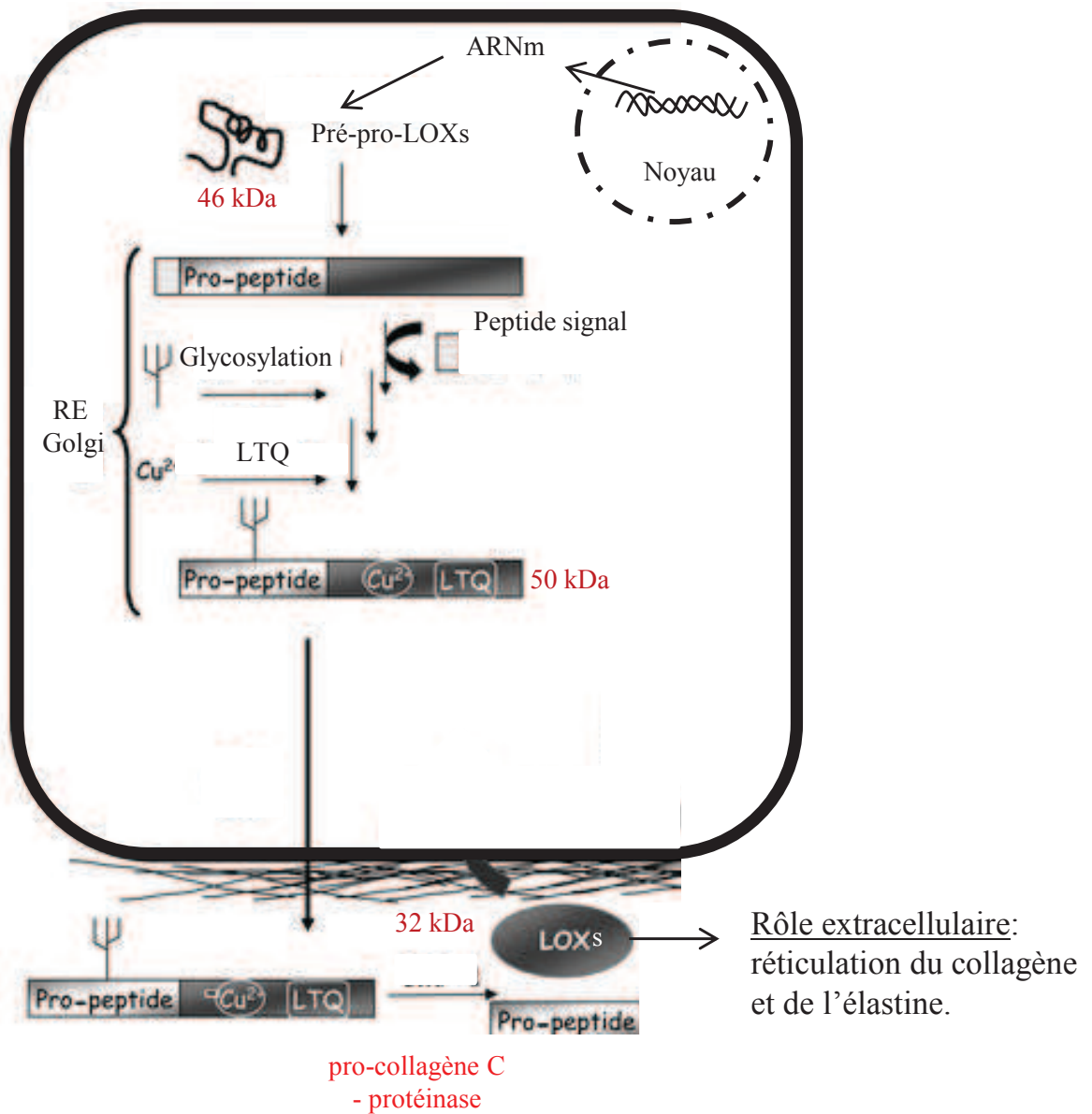
C'est un domaine très variable aussi bien par sa longueur que par sa séquence. Il confère une spécificité d'action propre à chacun des paralogues que l'on peut classer en deux sous-familles :

- LOX et LOXL1, qui possèdent un pro-domaine responsable de leur sécrétion extracellulaire sous forme inactive (pro-enzymes).

- LOXL2, LOXL3 et LOXL4, qui possèdent 4 domaines SRCR (scavenger receptor cystein-rich). La fonction de ces séquences riches en cystéine reste à définir mais elles pourraient être impliquées dans de nouvelles fonctions des LOXs comme par exemple l'adhésion et la croissance cellulaire (255).

B) Biosynthèse des LOXs

Tous les membres de la famille des LOXs sont synthétisés sous la forme de pré-pro-protéines (pré-pro LOXs) contenant un peptide signal à leur extrémité N-terminale (251). Ce peptide



**Figure 20:** Voie de biosynthèse des LOXs.

La traduction des ARNm des LOXs donne naissance à une pré-pro-protéine qui sera maturée dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi puis sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme quiescente. Elle sera alors activée par un clivage protéolytique assuré par la pro-collagène C-protéinase.

(D'après Rodriguez et al, 2008) (261)

signal, responsable de l'adressage des pré-pro-LOXs au réticulum endoplasmique, sera rapidement clivé. Ceci provoque un réarrangement de la pro-enzyme, permettant le repositionnement de l'atome de cuivre et des résidus tyrosine et lysine relativement proches pour initier la formation du LTQ par hydroxylation et oxydation autocatalytique dépendante du cuivre (260). D'autre part, les LOXs subiront deux modifications post-traductionnelles de type N-glycosylations, produisant une pro-protéine de 50kDa qui sera ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire (Figure 20) (261).

Les pro-LOXs étant sécrétées sous forme quiescente, l'activation de leur domaine catalytique nécessite un clivage protéolytique. Ce dernier a lieu entre la glycine 162 et l'asparagine 163 (sur la séquence de LOX chez le rat) et permet le relargage du pro-peptide portant les N-glycosylations. Il est assuré par une procollagène C - protéinase codée par le gène BMP-1 (252,262). D'autres protéases, telles que les mTLD (mammalian tolloid protease) et mTLL1/2 (mammalian tolloid-like-1 and 2 proteases), sont également capables de cliver les pro LOXs en ce même site mais moins efficacement (263). De plus, l'enzyme principale permettant l'activation des LOXs (la procollagène C protéinase) est également impliquée dans l'étape de maturation du procollagène en tropocollagène (substrat des LOXs) (Figure 20-21). Ainsi, la redondance des acteurs impliqués dans ces deux voies de biosynthèse (LOXs et collagènes) suggère une régulation synchrone de la réticulation des fibres de collagènes, phénomène indispensable à la résistance de la MEC (264,265).

## **II- Diversité d'expression des LOXs**

### A) Profil d'expression tissulaire des LOXs

Les enzymes LOX et LOXL1 sont présentes dans la plupart des tissus en quantité variable et présentent des profils d'expression relativement proches. LOX est fortement exprimé dans le cœur, les poumons et les reins alors que LOXL1 présente une expression très



élevée dans le cœur, le placenta, le pancréas et les muscles squelettiques (246,266). De plus, il a été démontré dans un modèle murin de fibrose hépatique que l'expression de LOX et LOXL1 était respectivement corrélée à l'expression des chaînes  $\alpha$  du collagène I et III, suggérant une régulation coordonnée entre les LOXs et leurs substrats (255).

Le profil d'expression des autres LOXs (LOXL2, LOXL3 et LOXL4) apparaît plus complexe et présente de fortes variabilités entre les tissus. L'expression de LOXL2 semble spécifique aux organes de la reproduction et du développement tels que la prostate, l'utérus, le placenta et les membranes fœtales. Il est à l'inverse très faiblement exprimé dans les tissus présentant une forte expression de LOX et LOXL1 comme le cœur, les poumons et les reins (267).

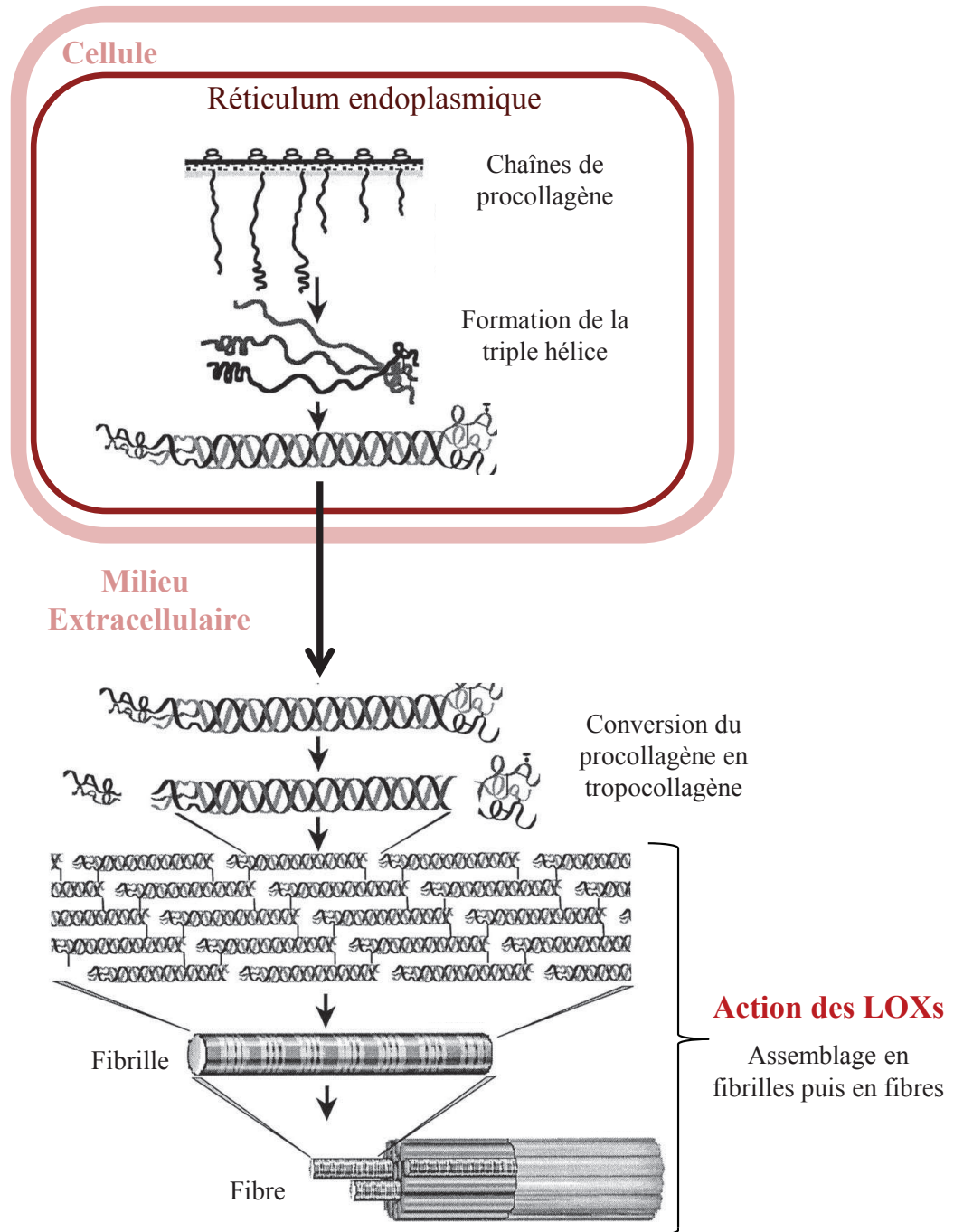
L'expression de LOXL3 apparaît quant à elle restreinte au système nerveux, aux leucocytes, à l'utérus et au cœur, où il est présent en grande quantité. Les études de northern-blot réalisées sur les autres tissus révèlent une expression permanente de LOXL3 mais en très faible quantité par rapport aux autres membres de la famille des LOXs (248).

Le gène LOXL4, qui fait l'objet de cette étude, est présent dans de nombreux tissus humains. Il est retrouvé préférentiellement dans le placenta, les poumons, les reins, le pancréas, les testicules et les ovaires (249,268). Il est intéressant de noter que ce profil d'expression diffère complètement de celui de son homologue murin, LOXC, dont l'expression se restreint aux chondrocytes différenciés (269).

#### B) Expression des LOXs dans les membranes fœtales

Les cinq LOXs sont exprimés dans les membranes fœtales humaines (270,271). Une étude réalisée sur des membranes à terme avant l'entrée en travail a comparé l'expression de LOX, LOXL1 et LOXL2 dans l'amnios, le chorion et le placenta. A l'inverse de LOXL1 qui est plus exprimé dans le placenta que dans les membranes fœtales, il semble que LOX soit très exprimé dans les membranes fœtales (et en particulier dans l'amnios) par rapport au placenta





**Figure 21:** Fonction biologique principale des LOXs : la biosynthèse du collagène.

Une fois sécrétées dans le milieu extra-cellulaire, les triples hélices de procollagènes sont maturées en tropocollagènes. Les LOXs permettent alors leurs réticulations aboutissant à la formation des fibres de collagène qui s'organiseront ensuite en faisceaux.

(D'après: <http://ptjournal.apta.org/content/79/3/308>)

où il est à peine détectable au niveau protéique. Le gène LOXL2 présente un profil d'expression plus atypique puisqu'il est très fortement exprimé dans le chorion alors qu'il est peu présent dans le feuillet amniotique (270). Plus récemment, une autre étude d'immunohistochimie a démontré la présence de LOXL3 et LOXL4 dans les membranes fœtales à terme (271). Alors que LOXL4 est présent dans les deux feuillets, la protéine LOXL3 n'a été quant à elle détectée que dans le chorion.

Enfin, il est intéressant de noter que l'expression des LOXs varie tout au long de la grossesse, suggérant leur implication dans la physiologie de la rupture qui met en jeu des modifications de la MEC. L'activité lysyl oxydase a notamment été mesurée dans l'amnios à différents stades gestationnels. Elle est maximale dans les stades précoces (12 SA) alors qu'une diminution graduelle a été montrée tout au long de la grossesse pour atteindre un seuil minimal à partir de la 22<sup>ème</sup> SA (272). De plus, il a été démontré que l'expression de LOX est réprimée par un acteur essentiel à la mise en place de la rupture des membranes en fin de grossesse : la prostaglandine E2 (44,273).

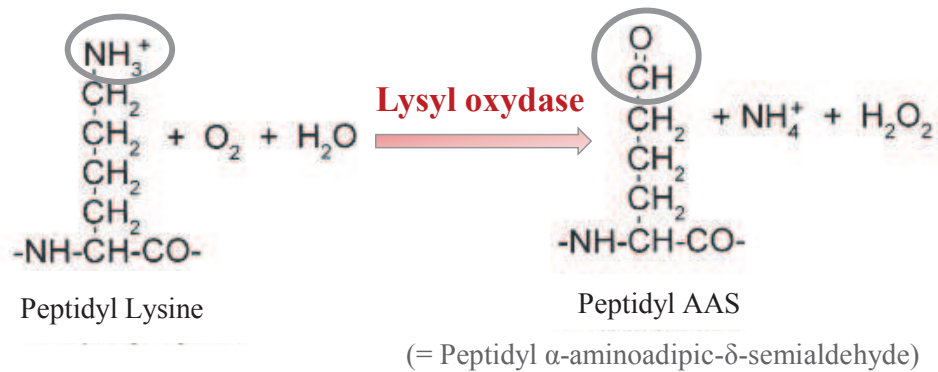
### **III- Mécanisme d'action**

Les LOXs sont des protéines sécrétées qui exercent leur fonction principale dans le milieu extracellulaire où elles assurent le pontage des molécules de collagène et d'élastine présentes dans la MEC (Figure 20-21). En outre, des études plus récentes ont démontré la présence de la forme active de certains LOXs dans le noyau où elles auraient une fonction de régulateur de l'expression des gènes.

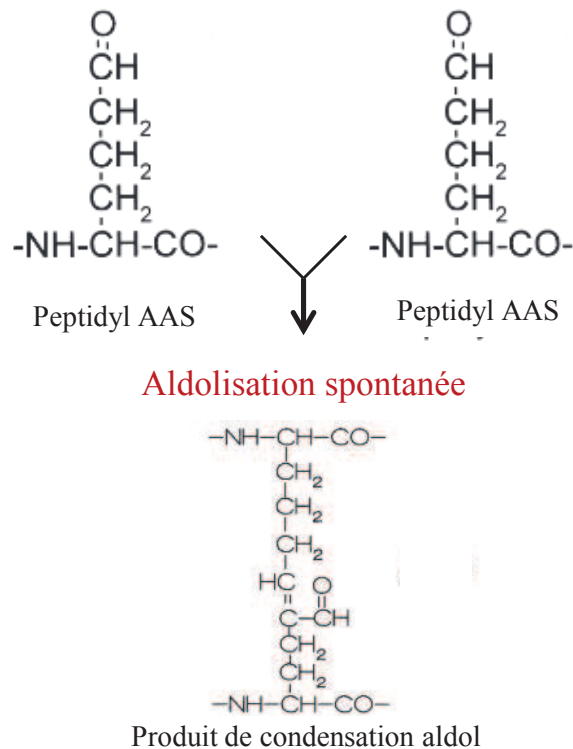
#### A) Mécanisme d'action extracellulaire

La démonstration de l'activité extracellulaire des LOXs date de 1968. Une enzyme présente dans un extrait d'os de poulet était capable d'augmenter la conversion de peptidyl lysine en

A)



B)



**Figure 22:** Mécanisme d'action extracellulaire des LOXs.

A) Les LOXs catalysent l'oxydation des groupements amines présents sur les lysines des molécules de collagènes et d'élastine.

B) Les formes aldéhydes générées par l'action des LOXs (peptidyl AAS) se condensent spontanément pour former de fortes liaisons covalentes essentielles à la résistance des matrices extracellulaires.

(D'après Lucero et al., 2006) (264)

peptidyl  $\alpha$ -aminoadipic- $\delta$ -semialdehyde (AAS), étape initiale du pontage des fibres de collagènes et d'élastine. De plus, l'action de cette enzyme était inhibée par le  $\beta$  aminopropionitrile ( $\beta$ APN) dont le rôle d'inhibiteur de cette étape était déjà connu (245). La purification de la protéine LOX peu de temps après a permis d'étayer la caractérisation de son activité extracellulaire (274).

Sécrétées sous forme inactive dans le milieu extracellulaire, les LOXs y subiront un clivage protéolytique permettant de les activer (comme décrit précédemment). Elles reconnaissent alors les molécules de tropoélastine et de tropocollagène comme substrats et exercent leur activité catalytique portée par leur extrémité C-terminale. Elles vont ainsi catalyser l'oxydation des groupements amines présents sur les résidus peptidyl lysine du collagène et de l'élastine, générant leur forme aldéhyde (ASS) ainsi que du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'ammoniac ( $NH_3$ ). Les résidus ASS néosynthétisés pourront alors se lier spontanément les uns aux autres par aldolisation, générant de fortes liaisons covalentes intra- et inter-peptides (264) (Figure 22). C'est ainsi que l'activité extracellulaire des LOXs permet le pontage des molécules de collagène et d'élastine, produisant d'abord des fibrilles, des fibres, puis des réseaux fibrillaires organisés en faisceaux indispensables à l'intégrité mécanique des MEC (Figure 21).

#### B) Mécanisme d'action intracellulaire

A côté du rôle extracellulaire des LOXs, il a été démontré que certains membres (LOX, LOXL1 et LOXL2) étaient aussi présents au niveau du noyau, soulevant la question de la fonction nucléaire des LOXs qui reste actuellement moins décrite. Ne possédant pas de signal de localisation nucléaire, les LOXs seraient transloquées dans le noyau grâce à l'intervention de protéines chaperonnes. Il a d'ailleurs été établi que LOX interagissait avec la protéine p66 $\beta$  qui favoriserait son accumulation dans le noyau (275). Plusieurs études *in vitro* ont démontré



que ces LOXs intra-cellulaires étaient capables d'interagir avec de nombreuses protéines nucléaires telles que les histones, impliquées dans l'état de compaction de la chromatine, ou des facteurs de transcription (264,275). Ainsi, ces dernières données suggèrent aussi que les LOXs nucléaires pourraient être impliquées plus ou moins directement dans la régulation de l'expression des gènes. Par exemple, il a été établi que les histones H1 et H2 étaient des substrats de LOX *in vitro* (276,277). De plus, la protéine LOX nucléaire serait capable de réguler certains gènes impliqués dans la prolifération et la transformation épithélio-mésenchymateuse de cellules cancéreuses (278,279). Enfin, LOX et LOXL2 semblent avoir un rôle dans l'évolution des cancers épithéliaux où ils pourraient constituer une cible thérapeutique. En effet, une étude démontre qu'ils seraient induits par l'hypoxie et réprimerait l'expression de l'E-cadhérine, augmentant ainsi l'agressivité de la tumeur (280). A l'inverse de LOX, LOXL2 agirait plutôt sur l'histone H3 (281). Son interaction avec le facteur de transcription snail a également été démontrée dans des cellules de cancer du sein MCF-7, où elle le stabiliserait et permettrait ainsi d'augmenter l'invasion cellulaire (282).

## **IV- Fonctions biologiques des LOXs**

### A) Knock-out chez le modèle souris

Des modèles de souris KO de LOX et LOXL1 ont été réalisés dans le but de mieux appréhender leurs fonctions lors du développement.

Les souris LOX<sup>-/-</sup> meurent d'anévrisme dès la naissance à cause de malformations cardiovasculaires et respiratoires. Elles présentent également des défauts au niveau des fibres de collagène et d'élastine des MEC (283). Ainsi, l'invalidation de LOX ne semble pas compensée par les autres membres de la famille des LOXs dans ce modèle, confirmant un rôle propre à chacun des LOXs durant le développement.



Les souris invalidées pour LOXL1 sont viables mais présentent de lourdes altérations dans la formation des fibres d'élastine, générant une accumulation de molécules de tropoélastine au niveau de la peau, de l'utérus, des poumons et des artères qui présentent de ce fait une perte de résistance et une élasticité accrue (284).

## B) Pathologies associées à une dérégulation de l'expression des LOXs

### i) Les cancers

La littérature fait état de l'implication des LOXs dans le développement d'un grand nombre de cancers. Paradoxalement, les LOXs exerceraient soit un rôle de suppresseur de tumeur, soit de facteur oncogène selon les tissus considérés (285).

Une diminution de l'expression de LOX a par exemple été observée dans des lignées cellulaires de fibrosarcome, de choriocarcinome et de rhabdomyosarcome (286). De plus, les régions chromosomiques 5q25 et 8p21, correspondant aux gènes LOX et LOXL2, présentent des mutations très fréquentes dans le cancer du colon et de l'œsophage, où leur délétion pourrait participer au développement de ces cancers (255). Enfin, la transfection stable de LOX dans des cellules cancéreuses gastriques empêcherait le développement de tumeurs chez les souris nude en inhibant la prolifération de ces cellules, conférant à LOX une propriété de suppresseur de tumeur (287). A l'inverse, les LOXs sont décrits comme des facteurs oncogènes dans les cancers de la tête, du cou, de la prostate, du rein, du colon et du sein, où leur expression serait corrélée à la progression des tumeurs et favoriserait l'invasion cellulaire (285,288).





## ii) Pathologies associées à une surexpression des LOXs

Un grand nombre d'études démontrent une augmentation de l'expression et/ou de l'activité des LOXs dans des pathologies fibrotiques pouvant affecter de nombreux organes tels que le cœur (289), les artères (290), les poumons (291), le foie (292–294) ou encore la peau (295). La mise en place d'une fibrose survient généralement en réponse à une lésion ou une inflammation chronique. Les tissus affectés subissent alors un remodelage important du tissu conjonctif impliquant notamment une synthèse accrue de collagène. Ainsi, les LOXs participeraient à la mise en place du processus fibrotique en augmentant la réticulation des fibres de collagènes, renforçant ainsi la rigidité de la MEC caractéristique des fibroses (296). Des études permettent actuellement d'envisager LOX comme un biomarqueur pertinent pour prédire l'état de gravité de ce type de pathologies (295) mais aussi comme une cible thérapeutique prometteuse dont l'inhibition pourrait empêcher le développement de fibroses (294,297,298).

L'expression des LOXs a également été étudiée au sein de membranes fœtales issues de RPM, où le gène LOX est le seul membre de la famille à être surexprimé par rapport aux membranes à terme. Au vu des nombreux processus de remodelage de la matrice survenant en cas de RPM, cette augmentation de LOX pourrait s'expliquer par un mécanisme compensatoire en réponse à la destruction des fibres de collagènes et à la fragilisation des membranes survenant en cas de RPM (271,299).

## iii) Pathologies associées à une diminution des LOXs

A l'inverse, une diminution de l'expression et/ou de l'activité des LOXs a été retrouvée dans de nombreuses pathologies caractérisées par des altérations des tissus conjonctifs.

- le syndrome de Menkes



Il s'agit d'une pathologie héréditaire récessive et létale, caractérisée par une dégénérescence cérébrale causée par des altérations des fibres d'élastine notamment au niveau des artères. La mutation causale de ce syndrome touche un gène impliqué dans le transport du cuivre, entraînant sa séquestration à l'intérieur des cellules (300). De nombreuses protéines dépendantes du cuivre sont alors gravement affectées lors de ce syndrome. Parmi celles-ci, les LOXs présentent une activité largement diminuée, comme démontré dans une étude comparant des milieux cellulaires de fibroblastes « sains » à des fibroblastes de peau provenant d'une biopsie d'un fœtus affecté par ce syndrome (301). En plus de ce défaut d'activité lysyl oxydase, les transcrits de LOX semblent eux aussi diminués dans des lignées de fibroblastes cutanés issus de patients affectés par rapport à des lignées contrôles (302).

- le syndrome d'Ehler-Danlos

Ce syndrome regroupe des affections génétiques rares présentant des symptômes cliniques différents mais toutes caractérisées par une désorganisation des tissus conjonctifs. Les patients présentent une hyper fragilité et une hyper élasticité de la peau mais aussi une mobilité des articulations excessive ainsi que des ecchymoses fréquentes (303). Dix sous-types de syndromes d'Ehler-Danlos sont actuellement répertoriés parmi lesquels le syndrome de type IX qui est associé à une diminution de l'activité lysyl oxydase (304,305).

- le kératocône

C'est une pathologie oculaire caractérisée par une cornée en forme de cône due à un remodelage anormal de la MEC entraînant un amincissement du stroma (306). Il a été établi que l'expression de la protéine LOX était diminuée dans le stroma de patients atteints par cette pathologie. L'activité lysyl oxydase est également altérée dans des cultures de fibroblastes de patients (307).

- la rétinopathie proliférative diabétique.



Une diminution de l'activité lysyl oxidase a été démontrée dans le corps vitré de patients atteints de rétinopathie proliférative diabétique (308). Il s'agit d'une complication oculaire fréquente chez les patients diabétiques. Elle se caractérise par une néovascularisation et une ischémie de la rétine et se traduit par un épaissement de la lame basale dû à une production excessive de MEC (309).

### C) Fonctions biologiques des LOXs

Au regard des multiples mécanismes d'actions attribués aux LOXs, il n'est pas surprenant de les retrouver impliqués dans de nombreuses grandes fonctions biologiques telles que la stabilisation des MEC, la migration, l'adhésion cellulaire ou encore le remodelage tissulaire.

Comme décrit précédemment, toutes les protéines LOXs possèdent une activité amine oxydase portée par leur extrémité C-terminale et participent ainsi à la biogenèse des MEC des tissus conjonctifs (264). A côté de ce rôle avéré dans la stabilisation et la résistance des matrices, les LOXs ont aussi été décrits comme des chemoattractants puissants favorisant la migration de différents types cellulaires tels que les monocytes, les fibroblastes et les cellules de muscles lisses vasculaires, lors d'essais *in vitro* (310–312). Dans cette dernière étude, il a été démontré que LOX favorisait la migration cellulaire tout en augmentant la formation d'adhésions focales et la polymérisation des microfilaments d'actine. Ces mécanismes sont inhibés par le  $\beta$ -APN, mais aussi par un traitement à la catalase - enzyme dégradant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - mettant en évidence l'importance du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relargué suite à l'action enzymatique des LOXs dans cette propriété chemoattractive (312). Un rôle des LOXs a également été décrit dans le placenta, où ils participeraient à la régulation de l'invasion des cytotrophoblastes via le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (313).

En outre, l'implication des LOXs dans le remodelage tissulaire a également été documenté et notamment au niveau cardiovasculaire. En effet, une étude a récemment démontré que LOX



était capable de réguler le remodelage vasculaire sur un modèle de souris transgénique dans lequel LOX était surexprimé au niveau des cellules des muscles lisses vasculaires (314). Il a également été établi que l'expression de LOX et l'activité lysyl oxydase étaient augmentées dans des modèles de blessures réalisées sur du tissu cardiaque *in vitro* ou *in vivo*, suggérant un rôle important des LOXs dans le remodelage tissulaire nécessaire à la cicatrisation suite à une lésion (315,316). Pour finir, une étude réalisée *in vitro* sur des fibroblastes dermiques, puis *in vivo* sur un modèle de blessure cutanée chez le rat, a établi qu'une surexpression locale de LOX permettait de renforcer la résistance mécanique du tissu lésé (317). L'ensemble de ces études mettent en exergue de nombreuses nouvelles fonctions des LOXs qui apparaissent dès lors comme des acteurs importants du processus de cicatrisation potentiellement extrapolable aux membranes fœtales.





# **OBJECTIFS**



S'inscrivant pleinement dans la thématique de recherche de l'équipe, mon travail a tout d'abord consisté à décrire les rôles des rétinoïdes dans la reproduction et le développement confirmant qu'ils sont essentiels tout au long de la grossesse (publication n°1, Comptour *et al.* en révision dans Cellular and Molecular Life Sciences). Ces rôles, tout d'abord démontrés par les malformations congénitales observées lors de cas de déficience ou d'excès en vitamine A, ont été largement documentés dans la littérature par la suite et compilés dans cet article. Il en est de même pour la description de leur voie métabolique dont la connaissance a permis de développer l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs RARs et RXRs à des fins de clinique ou de recherche.

Mon travail s'est ensuite porté de manière plus focalisée sur le rôle des rétinoïdes au sein des membranes fœtales, organe transitoire mais indispensable au développement et à la parturition. A côté de l'aspect pro-cicatrisant de l'atRA au sein des membranes fœtales, il a permis de démontrer que le tabac, sous la forme de condensé de fumée de cigarette, était un perturbateur de la voie des rétinoïdes au sein de ce tissu (annexe n°2, Rouzaire *et al.*, en préparation). De plus, ce travail a aussi conduit l'équipe à amorcer une nouvelle collaboration internationale avec une équipe de Portland dans le but d'étayer encore l'hypothèse de la capacité des rétinoïdes à réguler des gènes impliqués dans l'homéostasie du liquide amniotique (annexe n°3, communication affichée SRI2015 et Cheung *et al.*, en préparation).

Parallèlement à tout cela, ma thématique principale de recherche visait à étudier les effets positifs des rétinoïdes sur la cicatrisation des membranes fœtales humaines et ceci en lien avec les intérêts cliniques qu'ils pourraient revêtir dans la prise en charge des ruptures prématurées des membranes (publication n°2, Rouzaire *et al.*, en révision dans International Journal of Biochemistry and Cell Biology). Ce travail a été mené de concert avec une autre étudiante en thèse de l'équipe qui s'intéressait, elle, à la cicatrisation de l'épithélium cornéen après brûlures chimiques par base (annexe n°1, Comptour *et al.*, en révision dans Scientific



reports). Partant des résultats d'un transcriptome sur des cellules épithéliales amniotiques traitées par l'atRA, ces deux sujets de recherche ont permis de mettre en évidence un lien direct entre la régulation de la transcription du gène LOXL4 par les rétinoïdes et son importance dans le phénomène de cicatrisation.

Premier gène important mis en évidence lors de cette thèse pour le phénomène de cicatrisation des membranes fœtales promu par les dérivés actifs de la vitamine A, LOXL4 ouvre la voie à de futurs travaux qui se baseront sur la liste des autres gènes sortis de l'étude transcriptomique et qui sont eux aussi ressortis comme essentiels à la dynamique et à la structure de la MEC.



# **RESULTATS**





# Publication n°1

(En révision dans: *Cellular and Molecular Life Sciences*)

## « **Nuclear retinoids receptors and pregnancy: Placental transfer, functions and pharmacological aspects** »

**Aurélie Comptour #, Marion Rouzair #, Corinne Belville, Damien  
Bouvier, Denis Gallot, Loïc Blanchon and Vincent Sapin**

(# : Co-auteurs)



**Nuclear retinoids receptors and pregnancy:  
placental transfer, functions and pharmacological aspects**

Aurélie Comptour <sup>#1</sup>, Marion Rouzairé <sup>#1</sup>, Corinne Belville <sup>1,2</sup>, Geoffroy Marceau <sup>1,3</sup>,  
Damien Bouvier <sup>1,3</sup>, Denis Gallot <sup>1,4</sup>, Loïc Blanchon <sup>1</sup> and Vincent Sapin<sup>1,3</sup>

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

2] Clermont Université, Université d'Auvergne, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

3] CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

4] CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>#</sup>: These authors contribute equally to this work

**Running Title:** Retinoids receptors and placenta

**Corresponding author and reprint request:** Professor Vincent Sapin, 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: [vincent.sapin@udamail.fr](mailto:vincent.sapin@udamail.fr)



**ABSTRACT (150 to 250 words):**

Vitamin A deficiency animal models highlighted its crucial role in reproduction and placentation whereas excess of retinoids can cause toxic and teratogenic effects on the mother and fetus, especially in the first trimester of human pregnancy. Furthermore, Knock Out experimental strategy targeting retinoid nuclear receptors RAR and RXR permitted to confirm that the effects of vitamin A are mediated by retinoic acid (especially all-trans-retinoic acid) and that such vitamin is essential for the developmental process. All these data highlighted that the vitamin A pathway and metabolism is as important for the well-being of the fetus as during the adulthood. Consequently, during this last decade, extensive researches on the retinoid metabolism allowed a detailed knowledge on each actors of this pathway and permitted the development of several antagonist and agonists for therapeutic and researches applications. So, natural and synthetic retinoids are currently used in clinic more commonly on the skin for the treatment of acne and as anti-oncogenic actors in the case of acute promyelocytic leukemia. Nevertheless, because of toxicity and teratogenicity of retinoid during pregnancy, their use as pharmacological targets remains controversial.

**KEYWORDS:** vitamin A, placentation, retinoids receptors, agonists, antagonists



## **INTRODUCTION**

Since the demonstration by Hale (in 1933), that a vitamin A deficiency (VAD) leads to congenital ocular malformations [1]; the absolute requirement of vitamin A and its active derivatives, the retinoic acids (RAs) in a wide range of developmental and physiological phenomenon was largely documented. In fact, vertebrate placentation, morphogenesis, cellular proliferation, differentiation and apoptosis for few examples were demonstrated to be under the influence of this canonical signalling pathway. This one acts through the activation of ligand dependant nuclear receptors called retinoic acid receptors (RAR)  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  and Retinoid X receptors (RXR)  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . In this review, mammal's placentation and general vitamin A mechanisms of action will be shortly described. Then, its importance during mammalian pregnancy, particularly linked to the human one will be extensively studied with a particular attention for the pharmacological/pathological side of this signalling cascade during this *in-utero* part of life.

## **I] PLACENTATION AMONG SPECIES**

Placenta is a transient but essential organ for the maintenance and the success of gestation among mammals [2-3]. As an autonomous organ, it permits the harmonious development of the embryo/foetus till the term birth. According to species, the establishment and the type of placentation are different and principally defined by morphological and histological characteristics. Morphologically, placenta can be diffuse (pig and horse), cotyledons (ruminants) or disk-shaped (human, rodent). Histologically, different types of placenta are classed depending on the nature and the number of tissue layers separating maternal and fetal bloods. There are four different types: epitheliochorial (equine), synepitheliochorial (ruminant), endotheliochorial (carnivore) and hemochorial (human, rodent), which is the most invasive type of placenta [4-6]. As the placental functions are always the same among species, a lot of different animal models are currently studied in order to better understand the "importance" of this organ. For example, sheep, rabbit and especially mouse are widely used because they shared some developmental common phenomenon [7]. The first essential function of the placenta is to physically connect the fetus to the uterine wall and allowing the formation of an exchange surface between the mother and the fetus. Beside this anatomical function, placenta ensures fetal growth especially by providing nutrients and metabolites required for fetal development [8]. For this, maternal blood which is rich in nutrient and oxygen enters in the intervillous space through the spiral endometrial arteries, passes into the fetal circulation through the capillary system of the villi and reaches the fetus via the umbilical vein. Then, metabolic waste products return to the intervillous space *via* two umbilical arteries. [9]. Thus, these nutrient exchanges are well controlled within the fetomaternal interface which becomes a "selective filter". This latter is also an imperfect barrier against many pathogens, drugs and toxics principally by the syncytial actin cytoskeleton as it was described in human and mice [10-11]. Finally, but not in an exhaustive goal of the placental functions, this "organ" is an endocrine organ essential for the maintenance of pregnancy, fetal maturation and parturition. For example, it secretes several important gestational hormones into both the maternal and fetal circulation (such as progesterone and prostaglandins) [12].

Through all these functions, the placenta could normally ensure the healthy growth and development of the fetus, but if we considered only the human reproduction, this vital process is unfortunately inefficient as 50 to 60% of human embryo die before birth [13-14]. Indeed, placental abnormalities could induce obstetrical pathologies as spontaneous abortion, intra-uterine growth retardation or preeclampsia. In order to better





understand what could be the placental implications of these numerous pregnancy loss and problems, the most widely used strategy is the gene inactivation in the mouse model, due to the similarity of human and mouse placentation and the potential extrapolation. Such mutations could result in embryonic and fetal lethality *in utero* principally by affecting implantation, choriovitelline or chorioallantoic placentation, in correlation with the defect timing during gestation [15]. Among all essential genes for placentation demonstrated by the KO strategies, those coding for nuclear receptors are absolutely essentials.

## **II] NUCLEAR RECEPTORS and PLACENTATION**

### **General considerations**

Nuclear receptors belong to the “huge” transcription factor family and are activated by their cognate ligands. First complete coding sequences isolated were the glucocorticoids [16] and estrogen [17] receptors. The comparison of these first discovered sequences and their crystallographic studies [18] allowed highlighting conserved domains, giving rise to the nuclear receptor superfamily.

Briefly, nuclear receptors share a common structure composed by 6 conserved domains named A to F [for supplementary information see 19] (Figure 1). The most important, the A/B region contains a ligand independent transactivation function (AF-1) and constitutes the only variable domain of the nuclear receptor, conferring them their own identity and specificity. Moreover, this domain is often subjected to post-translational modifications. Besides this one, the DBD (or C-region) is highly conserved and confers to the nuclear receptor its specific DNA recognition property and its ability to regulate the transcription of target genes. In details, this domain is composed of two zinc finger motifs with a spatial structure composed by two  $\alpha$ -helices and a COOH-terminal extension (CTE) [20]. Nuclear receptors are classified in 3 subgroups depending on their fixation to DNA and the consensus DNA sequence involved. For steroid receptor, as for example glucocorticoid, estrogens, progesterone and androgen receptors, they act as homodimer form and fix themselves on response element configured as palindrome (inverted repeat of two hexameric sequences separated by 3 nucleotide spacers) [21]. Non-steroid receptors (for example Retinoic Acid Receptors / RARs, Vitamin D Receptor / VDR, Liver X Receptors / LXRs, Thyroid Receptors / TRs, Peroxisome Proliferator Activated Receptors / PPARs...) are characterized by their ability to heterodimerize themselves with the retinoid X receptors (RXRs) and in contrast to steroid receptor, their response elements are in direct repetition separated by a variable number of bases depending on each nuclear receptor considered [22-24]. Finally, orphan receptors (for example, steroidogenic factor 1 or SF1, Estrogen Receptor Relative receptor 2 or ERR2) function as monomer and fix themselves to a consensus sequence of six base pairs core motif preceded by three nucleotides (for example, Estrogen Related Receptor alpha / ERR $\alpha$  recognizes TCAAGGTCA) [25]. The DNA binding domain (DBD) is connected to the ligand binding domain (LBD) by the hinge region (noted D-region). The LBD, noted the E-region, mainly contains a “ligand pocket”, composed by hydrophobic residues responsible for the specific and unique ligand recognition of each receptor [26]. This domain also contains the dimerization domain and the ligand dependant transactivation function (AF-2). Both AF-1, described earlier, and AF-2 constitute real interaction interfaces able to recruit many co-regulators (repressors and activators) partners in order to mediate the transcriptional response [27].



### Nuclear receptors and placentation

It's already well known that this superfamily of nuclear receptor is required for the regulation and the homeostasis of several physiological mechanisms such as metabolism, inflammation, placentation, development and also parturition [28-30]. Concerning placentation and development, the gene inactivation strategy in mice demonstrated that the inactivation of the orphan receptor  $ERR\beta$  is required for the early placentation. In fact, embryo mutants exhibit placenta malformations (abnormal chorion and trophoblast) and died at 10.5 days post coitum (dpc) [31]. Furthermore, it was also demonstrated that the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) is essential for the differentiation and the invasion of trophoblasts, the decidualization and the implantation [32-33]. Particularly,  $PPAR\gamma$  null embryos died due to an abnormal differentiation and vascularization of the placenta [34]. All these results were completed in human, by direct relations between the expression level of this nuclear receptor and the appearance of well-known pregnancy pathologies. In fact,  $PPAR\alpha$  and  $\gamma$  are down-regulated in placenta of women with gestational diabetes whereas in contrast, these receptors are up-regulated in placenta of women with preeclampsia or intrauterine growth restriction [35]. It's also the case for LXR (liver X receptor) which seems to be important for the development of placenta. Indeed, at transcriptional and protein levels  $LXR\alpha$  and  $LXR\beta$  were significantly decreased in placental tissues from mothers with preeclampsia [36]. Partner of both previous nuclear receptors (PPAR and LXR), RXR is also the heterodimer partner of RAR, two receptors families stimulated by active derivatives of vitamin A. The importance of RXRs in mammalian placentation and development was quickly demonstrated and a harmonious pregnancy could not be conducted without a well-controlled supplied and transformed vitamin A.

### **III] RETINOIDS and REPRODUCTION**

#### RAR/RXR and their partners

Two different groups discovered the first retinoid acid receptor called  $RAR\alpha$  in 1987 [37-38]. Few years after, isoforms called  $RAR\beta$  and  $RAR\gamma$  were also identified [39-42]. Finally, retinoid X receptor alpha, the non-exclusive partner of RARs was also characterized [43], quickly joined by two other isoforms logically named  $RXR\beta$  and  $RXR\gamma$  [44]. RARs and RXRs are highly conserved among mammals and have specific patterns of expression especially during embryogenesis, highlighting their important and specific functions during mammal's development [45]. Briefly,  $RAR\alpha$ ,  $RXR\alpha$  and  $RXR\beta$  are ubiquitously expressed in embryonic and adult tissues, whereas  $RAR\beta$ ,  $RAR\gamma$  and  $RXR\gamma$  expression is more restricted and depends on the tissue specificity [46]. It was demonstrated that all RXRs and RARs (to a lesser extend) isoforms could bind the 9-*cis* retinoic acid (9cisRA) form ligand whereas the all-*trans* retinoic acid (atRA) form could only enter in the ligand pocket of the RARs isoforms. Contrary to RARs, RXRs are not specific to the retinoic pathway and can be involved in other signaling by binding either, orphan nuclear receptors (LXR and Farnesyl X Receptor /FXR), or other ligand-dependent nuclear receptors such as TRs, VDR or PPARs. As described in the previous paragraph, among these nuclear receptors, the PPAR family is particularly interesting because it is firstly involved in RA signaling pathway developing a heterodimer with RXR, binding 9cisRA ligand. Moreover, the subtype  $PPAR\beta/\delta$  has been described for binding RA and permits to discover new RA functions in regulation of energy homeostasis and insulin response [47].



RXR can either act as homodimer or heterodimer (with RARs) [48]. In the second case, regulation of genes transcription was achieved by the binding of the heterodimer RAR/RXR to specific promoter sequence called RAREs (Retinoid Acid Response Elements) composed classically by two direct repeats of a hexameric motif [49]. The most classical RARE motif is commonly called DR5, where the direct repeats were spaced by 5 base pairs. But, it could be also a DR1 or DR2 where the direct repeats are only separated by 1 or 2 bp respectively (Figure 2). These RAREs have been now experimentally verified or identified (by using bio-informatics studies) in promoters of a large (continuously growing) number of retinoid-target genes implicated in numerous different physiological functions as it was particularly done for the DR5 type [50].

### Vitamin A and development

Retinol (vitamin A) and its active derivatives could lead to many physiological functions (morphogenesis, growth, reproduction, immunity, vision) by the transduction of their signal using retinoic acids receptors [51]. Even if the identification of vitamin A dates back to 1913 by Mc Collum and Davis [52], vitamin A signalling pathway and actions are very complex and remain to be deepened. The retinoids pathway is critical for a harmonious mammal gestation (normal embryonic, fetal, neonatal development) as demonstrated in many nutritional studies in animal models [53]. Furthermore, the embryo is unable to synthesize the retinol and is strongly dependent on the maternal delivery of retinol itself or precursors (retinyl esters and carotenoids) through a transplacental transfer. As the fetus grows quickly in the third trimester, he needs vitamin A throughout pregnancy [54]. Consequently, both deficiency and excess of vitamin A lead to serious damages during prenatal and postnatal development and during adult life. Indeed, nutritional and clinical studies on animals and human models have shown that a vitamin A deficiency leads to VAD syndrome characterized by a number of developmental defects including ocular defects, infectious diseases, growth delay, respiratory and urogenital system and heart defects and iron deficiency anemia [55-56]. Moreover, it has been proposed, that the high incidence of heart malformations in developing countries could be mostly explained by a low availability of retinol due to vitamin A deficiency in diet [57]. It also has been proved on rat model where mating can induced a failure of reproduction, fetal resorption and prolonged gestation. Interestingly, an administration of retinoic acid can reverse the deleterious effects of VAD diet. Conversely an excess of vitamin A diet leads to toxicity of many organs like liver, central nervous system, internal organs and skin. Moreover, high level of retinol during the pregnancy is teratogenic for the fetus, especially during the first trimester [58-61]. All of these vitamin A amount deregulations show that this signaling pathway have to be highly regulated, particularly for the bioavailability of active forms, to perfectly insure these pleiotropic roles during development.

### Vitamin A regulation pathway

Retinol homeostasis is dependent on several levels of regulation from the dietary uptake, passing by the storage, considering the distribution to each tissue including at the end the production/degradation of active forms. These different regulation steps involved a lot of proteins and enzymes (simplified representation described in Figure 3). First of all, vitamin A cannot be synthesized *de novo* by mammals and comes exclusively from the diet as  $\beta$ -carotene (plants sources) or retinyl esters (animal sources). Conversions by key enzymes are required to synthesize vitamin A active forms [62]. Retinol is stocked in the liver as retinyl esters or distributed into the blood to target tissues. Because retinol is highly hydrophobic, a carrier protein RBP (Retinol



binding protein) is required for its circulation and its recognition by a receptor called STRA6 [63]. This latter is present at the cell surface and allows the retinol to enter into the cells, where it's carried majorly by cytoplasmic CRBP1 (cellular retinol binding protein 1). To be biologically active, retinol must be first oxidized to retinaldehyde and then to retinoic acid. The first reversible oxidation is catalyzed by cytosolic alcohol dehydrogenases (ADH) and microsomal retinol dehydrogenase (RDH), and then the retinaldehyde is irreversibly oxidized into retinoic acid by several retinal dehydrogenases (RALDH) [64-65]. As described before, pleiotropic effects of retinoids are mediated by the two main endogenous active forms of vitamin A: atRA and 9cisRA, specific ligands of the RAR/RXR heterodimer. In this pathway, catabolism and regulation feed-back of atRA and 9cisRA are important mechanisms for controlling RA endogenous levels. For that, catabolism of retinoic acid is under the control of the cytochrome p450 superfamily and especially CYP26 proteins (CYP26A1, B1 and C1 for mammalian species). This subfamily allows the transformation of atRA in polar metabolites [66-67]. Furthermore, some of the components of the RA biosynthesis are controlled by atRA via a negative feed-back. Indeed, atRA induces its own catabolism by inducing the CYP26 enzymes gene transcription allowing the degradation of atRA excess. At the opposite, atRA can also regulate its biosynthesis by a positive feed-back by up-regulating the expression of some of RA biosynthesis components such as RBP4, CRBP1, STRA6 [68-69].

#### Vitamin A pathways in development and placentation

Studies of KO members of vitamin A pathway especially for RARs and RXRs in mutant mice demonstrated their crucial role in function like development and reproduction mediated by vitamin A. Postnatal and fetal damages, equivalent to those found in VAD syndrome, were found in RAR or RXR single mutant but defects are less severe, suggesting a high degree of functional redundancy among these receptors [70-71]. Indeed, the absence of one receptor can be partly compensated by another nuclear receptor expressed in the same tissue. More precisely, RAR $\alpha$  null mutants died before the age of two months due to severe malformations; and males are sterile by the degeneration of the seminiferous epithelium. RAR $\beta$  mutants are growth-deficient, present behavioral and eyes defects; but are fertile and have a normal longevity. RAR $\gamma$  null mice exhibit fetal malformations due to skeletal and epithelial defects, leading to extensive postnatal lethality [72-73]. RAR double mutants (RAR $\alpha/\beta$ ; RAR $\alpha/\gamma$  and RAR $\beta/\gamma$  null mutants) died *in utero* or shortly after birth highlighting the essential role of RARs in vertebrate development [74-75]. Such genetic studies have also been made on the other heterodimeric partner: RXR. The mice model knock-out of RXR $\alpha$  and RXR $\beta$  are lethal during embryogenesis or shortly after birth. RXR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice exhibit eyes defect and their lethality is due to severe heart damages (myocardium defect), suggesting a role of RXR $\alpha$  in myocardial growth and eye morphogenesis [76]. RXR $\beta$  males are sterile because of an abnormal spermatogenesis and present behavioral defects. Finally, RXR $\gamma$  null mice survive and do not present developmental defects but fertility defects. Defects in double RXR mutants are similar than those of RAR double mutants. For example, the double knock-out RXR $\beta$  and RXR $\gamma$ , and the triple mutant RXR $\alpha$ <sup>+/-</sup> RXR $\beta$ <sup>-/-</sup> and RXR $\gamma$ <sup>-/-</sup> are viable but have growth defects and male are sterile. A single copy of RXR $\alpha$  is sufficient to rescue most of the functions of RXRs.

Beside the many roles of retinoids described and well studied in vertebrate development [77], the molecular role of retinoid signaling during placentation remain not fully understood. Several studies realized on the mouse model demonstrate an involvement of the retinoids pathway in placentation. First, retinoid-binding proteins (RBP) and retinoic acid receptors (RARs, RXRs) have been demonstrated to be expressed in placental





tissues among a specific spatio-temporal expression pattern [78]. In particular, RAR $\gamma$  expression is increased after 15.5 dpc, whereas it is only weakly expressed during early placentation. A strong expression of RXR $\alpha$  has also been demonstrated at late stages of placentation and persists until birth. Expression patterns of these two receptors suggest their involvement in the formation and function of the definitive placenta. In addition to this specific expression pattern of retinoids pathway components, retinoic acid-inducible (STRA) genes have also been demonstrated to exhibit a specific expression in mouse placenta, depending on tissue specificity and placentation stages [79]. Briefly, they are expressed in two major placental components depending on the placental stage: the regions of maternal-embryonic exchanges (yolk sac and labyrinthine zone) and the trophoblastic giant cells. For example, from mid-late gestation until birth *Strat6* was no more expressed in the yolk sac membrane, but its expression was detected in the labyrinthine zone of the chorioallantoic placenta. Such spatio-temporal patterns of expression are observed for most of the studied genes during both yolk sac (primitive placenta) and chorioallantoic (definitive placenta) placentation. The way how the expression of these retinoic acid-inducible genes is controlled during placentation remains still unknown but the important role of the retinoid pathway for normal placentation has well been demonstrated in mice. Indeed, a VAD in rats [80], and PPAR $\gamma$  [81], RXR $\alpha$  and  $\beta$  [82-83] knock-out in mice led to chorioallantoic placentation defects resulting in embryonic death. More in details, all these receptors knock-out contribute to the same defect. They alter the formation of the labyrinth, which is a crucial structure for mice placentation allowing gas and nutrient exchange between the mother and the fetus in the placenta. In heterozygous phenotype, the labyrinth was not totally affected, resulting into the reduction of transfers between mother and conceptus and an intra-uterine growth retardation. When the placental defect is total in the homozygous situation, the transfers are quite abolished, leading to an *in utero* death.

In human, retinoids pathway was described as present in placenta and in fetal membranes. Several studies made on human placenta indicate its ability to isomerize and oxidize retinoids [84-85]. Moreover, studies strongly suggest the contribution of retinoids in the regulation of human placental lactogen (hPL) and other hormones or target genes fundamental for the maintenance of pregnancy [86-87]. It's the case for example for Chorionic Gonadotropin Hormon [88], Epidermal Growth Factor Receptor [89], apolipoprotein A-II [90], the thyroid hormone receptor Mct8 [91] or leptin [92]. By the heterodimer PPAR/RXR, retinoids regulate some important placental phenomenon as trophoblast invasion [93] and the processes of human term parturition [94]. Logically, their abnormal expression or activities are described in spontaneous abortion [95], in preterm labor and infection-complicated preterm deliveries [96]. In addition, an abnormal activation of RXR by the tributyltin (an environmental contaminant) could alter human placental functions [97]. In the fetal membranes, the functionality of the retinoid pathway [98] and its role in the physiopathology have been demonstrated. Indeed, retinoids regulate the expression of genes involved both in the amniotic fluid homeostasis [Prat et al., unpublished data] and in the extracellular matrix dynamics [99].

#### **IV. PHARMACEUTICAL ASPECTS**

##### **Agonist/antagonist of vitamin A pathway and examples of clinical applications.**

For a better understanding of these nuclear receptors (specific biological responses of retinoid receptors isotypes) and for therapeutic applications in several diseases (acne, psoriasis, cancer, acute promyelocytic leukemia (APL), photo-aging...), retinoid receptors become new targets for the development of several synthetic



agonists (mimicking the action of endogenous ligands) and antagonists (blocking the action of endogenous ligands) of retinoids [100-102]. The major problem of such strategy is that generating synthetic ligands specifically targeting one isotype of RARs or RXRs, is extremely difficult due to the closed LBD domain between the different subtypes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . As an illustration of that, only one residue in the ligand binding pocket (LBP) differs between RAR $\beta$  and RAR $\alpha$  and two between RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  (Figure 4). This major problem was able to be bypassed using crystallographic studies of the empty ligand-binding domain (apo-receptor) compared to the filled receptor (holo-receptor) and allowed to better understand the binding mechanism to develop synthetic agonists or antagonists of nuclear receptors [103-104]. In a cellular environment, in the absence of endogenous ligands (natural agonists, such as *atRA*) or in the presence of certain antagonists, RAR-RXR heterodimers recruit corepressors (CoRs) complexes, associated with histone deacetylases (HDACs), which cause transcriptional silencing through chromatin condensation [105]. Thus, the ligand binding leads to a conformational change of the nuclear receptor LBD domain [106]. This allosteric change alters the ability of the receptor surface to interact with CoRs and allows the recruitment of coactivators (CoAs) complexes on the LBD domain, which contain histone acetyltransferases (HATs) and consequently result in active transcription through chromatin decondensation. More precisely, the ligand binding really modulates the communication between the nuclear receptor and its intracellular environment (interaction receptor-protein, receptor-DNA, receptor-chromatin) [107]. To focus on synthetic compounds, there are actually different classes of agonists and antagonists according to their mechanism of action (Figure 5) [108]. Whereas, stilbene-based retinoid TTNPB (4-[(E)-2-(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid) and CD3254 are examples of RARs and RXRs agonists respectively; “partial agonists” are considered as weaker agonists than the endogenous ligands and can act as antagonists. For their classification, the “neutral” or “classical” one prevents the recruitment of CoAs and maintains the receptor in an inactive state (such as for example BSM614) whereas “inverse agonists” (such as BMS493) exert their antagonist action by strengthening the interaction of receptors with CoRs [109].

In the clinical and pharmaceutical point of view, the generation of new synthetic ligands for RARs and RXRs is highly developed for “retinoid therapies” in order to optimize already demonstrated beneficial effects and to particularly eliminate or minimize the side effects of such drugs. Indeed, retinoids used in therapies are powerful tools to improve cell differentiation, decrease cell proliferation and promote cell death. Nevertheless, retinoids can also exhibit teratogenicity (see below) and side effects in patients (as for example mucocutaneous toxicity characterized by irritated and dry skin as it was particularly demonstrated for RAR $\gamma$  targets) [110]. All these negative clinical effects added to biological ones (thrombopenia or blood lipid homeostasis abnormalities) constitute the “retinoic acid syndrome” potentially present after chronic retinoid administration. Nevertheless, several ligands of retinoids were developed and used for the treatment of psoriasis. Etretinate shows pro-differentiation and anti-inflammatory effects and after a treatment of 8 months decreases the psoriatic plaque by a mean of 64% [111]. Furthermore, acitretin is the treatment of choice for pustular psoriasis and it can be used in combination with another treatment to improve efficacy for psoriatic plaque. Moreover, it is well tolerated at low doses and it is not immunosuppressive [112-113]. Finally, clinical studies also showed that TTNPB, a pan-RAR agonist, was a good candidate for the treatment of psoriasis but had mucocutaneous side effects [114]. Besides psoriasis, in cancer research, retinoids are a major target because of their antiproliferative and cancer-preventive properties. In fact, RAR $\beta$  was already demonstrated to be the “major actor” in anticancer action of retinoids as it presents some tumor suppressive properties [115]. Indeed, it has been proved that RAR $\beta$  was reduced or absent



during cancer progression (breast cancer, head and neck tumors, oral leukoplakia) [116-117], and that the restoration of normal RAR $\beta$  expression could inhibit through retinoids action, the cancer progression and thus constitutes a new therapy. For example, use of isotretinoin in the treatment of oral leukoplakia allows restoring a normal RAR $\beta$  expression [118]. Retinoic acids (all-trans and 13 cis forms) was also known for the therapeutic revolution that they gave on the Acute Promyelocytic Leukemia. By the destabilization of the haemopoietic cells presenting the chromosomal abnormalities “PML-RARalpha”, the retinoic acids induce the differentiation of cancer cells and cure this leukemia previously known as very pejorative affection in terms of survey [119]. Finally, dermatology application of isotretinoin (13cisRA) is the first and main drug used in the treatment of severe and recalcitrant acne and rates of success are  $\geq 60\%$  following an oral dose of isotretinoin during 3-4 months [120]. Because of common side effects (eye irritation, serum lipid alterations, mucocutaneous reactions from ATRA syndrome), this drug should be reserved for patients with severe conditions and unresponsive to conventional therapy [121]. Consequently, Adapalene<sup>®</sup> (differin), a naphthoic acid derivative with retinoids-like activity, is also used as anti-acne drug. Indeed, several studies have shown that adapalene 0, 1% gel has the same efficiency than tretinoin (atRA) 0,025% gel but a better tolerability than isotretinoin (13-cisRA) [122].

#### Retinoid placental transfer and toxicity.

In 1982, the first scientific published works established the dynamics of the transfer of retinol between fetuses and their mother through placenta in rat [123] and sheep [124]. Few years after, the placental transfer of retinoic acid and retinyl acetate was also demonstrated in pregnant rat [125]. It's now well established that the uptake of dietary retinoids at the maternal-fetal barrier involves two pathways: the RBP-retinol complex through the STR6 and the retinyl esters bound to lipoproteins modified by lipoprotein lipase [126]. The human placenta is also able to esterify the retinol and to converted retinol into retinoic acid [127]. A decrease in placental transfer of retinol was proposed to explain the IUGR restrictions [128]. In a toxic model of congenital diaphragmatic hernia (fetal lung abnormalities), the mobilization of retinol from placenta to fetal circulation was disturbed [129].

The use of RARs agonists/antagonists as therapeutics during pregnancy is widely discussed and highly depends on the stage of pregnancy. Indeed, toxicity of retinoids has been well demonstrated during the first trimester [130], but more controversial at later stages (2<sup>nd</sup> and third trimester). Later during pregnancy, several studies on animal model show that teratogenic consequences are highly dependent on the chemical structure of the retinoid analog. Such differences are partly due to their binding affinity for both cellular retinoic-acid binding proteins (CRABPs) and later on the pathway for the nuclear receptors themselves. For example, placental transfer of 13-cisRA, which does not bind to CRABP, is less efficient than for atRA, which rapidly passes through the placenta and reaches the developing embryo causing teratogenicity from low concentration [131-132]. Such pharmacokinetic differences between isomers are the first explanation of why an agonist could be less toxic than another (as it's the case for 13-cisRA compared to atRA). It seems that this explanation could be extended to all the cis isoforms of retinoids, as also 9cis [133]. Nevertheless, continuous isomerization of cis isoforms (for example 13-cis into *all-trans* RA) during placental transfer could explain that even if these isoforms are not properly teratogenic, their conversion could generate some compounds toxic for the embryo [134]. Note that, another explanation of different negative effects of retinoids during organogenesis is the frequency of the administration. Indeed, it's clearly demonstrated that a multiple administration of all-trans



retinoic inducing its own elimination pathways (via Cyp26 degradation enzymes) results in substantially lowered blood levels in embryo and teratogenicity [135]. The synthetic agonist CD394, which is not able to bind CRABP either, has a pharmacokinetic close to the 13-cisRA [136]. The Ro 23-9223, a highly lipophilic aromatic retinoid present a reduced placental transfer and is established as 4-fold lower teratogenic than 13 cis RA for the same orally administrated quantity [137]. On the contrary, some agonists do not present correlation between their toxicity potency and their ability to bind the binding proteins and/or receptors. For example, the synthetic agonist TTNPB binds to RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and CRABP with a lower affinity than atRA [138] whereas its teratogenic potency is 700 fold higher than atRA in mice [139]. This is possibly due to a lower metabolic degradation of some synthetic ligands compare to the natural retinoids [140]. Another point in terms of potential teratogenicity had to be considered, i.e. the receptor binding affinity. This was demonstrated using three RARS agonist: CD336, CD2019, CD437 for alpha, beta and gamma isoforms respectively. The teratogenic potential of these 3 RARs agonist s was clearly established as the result of the placental transfer properties added with the receptor binding activities linked with the tissue regioselectivity of each compound [141].

In all the cases, it is difficult to predict drug teratogenesis in human from these animal studies because it remains a lot of differences of drug pharmacokinetics between species highly depending on the placentation type [142-143]. Indeed, teratogenesis studies have been made on a wide range of animal models and thus far, none of the testing animals constitute a reliable model to predict the teratogenesis in human. For example, rats, which were historically the most studied model, exhibit a low teratogenicity for cortisone [144], thalidomide and trimethadione [145], which are highly teratogenic for humans. Regarding the non-rodents species, rabbits have been routinely used for teratogenic studies but in the same way, some important human teratogens, such as alcohol, exhibit a poor teratogenic response in the rabbit model [146]. Surprisingly, these differences with human are also observed for primates' models; for example, methotrexate is poorly teratogenic in macaque and rhesus monkey models whereas it has been demonstrated to lead to serious teratogenicity at low concentration in human and rats [147]. Owing to these differences between species, the identification of teratogens in human remains difficult and is unfortunately mostly provided after deleterious consequences by clinical reports and observation of individual cases. The most serious adverse outcomes were described for the isotretinoin drug (*13-cis retinoic acid or accutane*). This one, which was approved in 1982 for the treatment of severe recalcitrant nodular acne, was responsible for 29 cases of adverse reproductive outcomes within the first year of its commercialization for pregnant women treated by isotretinoin during the first trimester of gestation [148]. In fact, it was related that this chemical product induced abortion and several fetal malformations including cardiovascular, central nervous system and craniofacial defects known as the retinoid acid embryopathy [149]. As a consequence of this deleterious observation, women were invited to take contraception in association with the treatment of isotretinoin or to stop such treatment if they would like to be pregnant. Such recommendations come also from results obtained concerning the half life of isotretinoin (between 10 and 20 hours) and its metabolite, 4-oxo- isotretinoin (between 17 and 50 hours), which are quite short. Thus, it is recommended to wait five times the half life (namely 1 month) for a safe conception in order to return to the baseline of this drug and its metabolite [150-151].





### Which possibilities of treatment during pregnancy?

As describe before, beside the toxicity of RARs agonists during pregnancy, and especially during the first trimester, the use of such agonists remain possible in some clinical cases of emergency during the second and the third trimester [152]. This is the case of women diagnosed for acute promyelocytic leukemia (APL) during pregnancy. The standard treatment of APL for newly diagnosed patients in non-pregnant state consists on the administration of atRA combined to an anthracycline-based chemotherapy. This therapeutic protocol exhibits a high efficiency with 90% to 95% of complete remission [153]. Considering the fact that APL diagnosis is a medical emergency, its management becomes a real clinical challenge when it occurs during the first trimester of pregnancy. Indeed, given the high teratogenic potency of RAR agonists at this stage (demonstrated for the 13-cisRA), the usual APL treatment with atRA administration could not be conducted without a termination of pregnancy decided by the patient. But, if the diagnosis is made at later stages of pregnancy, the current therapeutics with atRA administration become possible and present only a low teratogenic risk. Indeed, to this date, no malformations relative to retinoids embryopathies were reported for mother treated with atRA at the second and at the third trimester [154], illustrating in this case a possible use of RARs agonists during later stages of pregnancy. Due to the important implications of the RXR-PPARs in the obstretical pathology, the preeclampsia, some questions are raised to use RXR agonists to modulate the activation of this heterodimer. Indeed due to the interdiction of PPARs agonists during the pregnancy, the use of RXR agonists should be an interesting opportunity. Same questions could be addressed to cure some specific aspects of chorioamniotitis where partners of RARs and RXRs are also described.

### CONCLUSIVE REMARKS

The retinoids are strongly involved during the mammalian development of embryo and fetus. The nuclear retinoids signaling pathway is very complex in terms of metabolic and molecular aspects, with the implications of other nuclear receptors, when RXRs are present. Pharmacological properties of natural and/or synthetic retinoids were difficult to modelize during gestation, due to complex links with placentation. All together, these points highlight the difficulties to use such natural compounds or synthetic ligands during the pregnancy in the case of obstetrical pathologies or treatment of maternal diseases already present before conceptions.

### ACKNOWLEDGEMENTS

A.C. was supported by a THEA laboratories grant.

M.R. was supported by a thesis grant for the French ministry of Education and Research (MENRT).



- [1] Hale F (1933) Pigs born without eyeballs. *J. heredity* 24:105.
- [2] Deligdish L (1992) Pathology of the placenta. In: *Hormone and fetal pathophysiology* (ed) Pasqualini JRT and Scholler R, Marcel Dekker Inc. pp 203-249.
- [3] Rinkenberger JL, Cross JC, Werb Z (1997) Molecular genetics of implantation in the mouse. *Dev Genet* 21:6-20.
- [4] Kaufmann P, Burton G (1994) Anatomy and genesis of the placenta. In: *The physiology of reproduction, second edition*, (ed) Knobil E and Neill JD Raven press, Ltd, New York. 1994; pp 441-484.
- [5] Enders AC, Blankenship TN (2012) Interstitial trophoblast cells: an enigmatic and variable component of the developing macaque placenta. *Placenta* 9:672-6.
- [6] Enders AC, Carter AM (2012) The evolving placenta: convergent evolution of variations in the endotheliochorial relationship. *Placenta* 5:319-26.
- [7] Carter AM, Croy BA, Dantzer V, Enders AC, Hayakawa S, Mess A, Soma H (2007) Comparative aspects of placental evolution: a workshop report. *Placenta* 129-32.
- [8] Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman, PD (1998) Fetal growth and placental function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140:115–120.
- [9] Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* 114:397-407.
- [10] Zeldovich VB, Clausen CH, Bradford E, Fletcher DA, Maltepe E, Robbins JR, Bakardjiev AI (2013) Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *PLoS Pathog* 9:12.
- [11] Caserta D, Graziano A, Monte G.L, Bordi G, Moscarini, M (2013) Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 17:2198–2206.
- [12] Evain-Brion D, Malassine A (2003) Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res* 13:34-7.
- [13] Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 4:447-53.
- [14] Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG (1996) Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 3:503-9.
- [15] Sapin V, Blanchon L, Serre AF, Lémercy D, Dastugue B, Ward SW (2001) Use of transgenic mice model for understanding the placentation: towards clinical applications in human obstetrical pathologies ? *Transgenic Research* 10:377-398.
- [16] Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635-41.



- [17] Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-9.
- [18] Khan SH, Arnott JA, Kumar R (2011) Naturally occurring osmolyte, trehalose induces functional conformation in an intrinsically disordered activation domain of glucocorticoid receptor. *PLoS One* 6:e19689.
- [19] Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328:1-16.
- [20] Zechel C, Shen XQ, Chambon P, Gronemeyer H (1994) Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* 13:1414-24.
- [21] Beato M. (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *Faseb J* 5:2044-51.
- [22] Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375:203-11.
- [23] Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR, Moore DD (1987) Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 84:5670-4.
- [24] Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65:1255-66.
- [25] Sladek R, Bader JA, Giguère V (1997) The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 17:5400-9.
- [26] Klaholz BP, Renaud JP, Mitschler A, Zusi C, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1998) Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat Struct Biol* 5:199-202.
- [27] Lavery DN, McEwan IJ (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* 391:449-64.
- [28] Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1537-56.
- [29] Borel V, Gallot D, Marceau G, Sapin V, Blanchon L (2008) Placental implications of peroxisome proliferator-activated receptors in gestation and parturition. *PPAR Res* 2008:758562.
- [30] Serpente P, Tümpel S, Ghyselinck NB, Niederreither K, Wiedemann LM, Dollé P, Chambon P, Krumlauf R, Gould AP (2005) Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development* 132:503-13.
- [31] Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguère V (1997) Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature*



388:778-82.

[32] Ding NZ, Teng CB, Ma H, Ni H, Ma XH, Xu LB, Yang ZM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor delta expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Mol Reprod Dev* 66:218-24.

[33] Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T (2001) PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5017-24.

[34] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-95.

[35] Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, Lappas M (2010) Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta* 31:222-9.

[36] Weedon-Fekjær MS, Johnsen GM, Anthonisen EH, Sugulle M, Nebb HI, Duttaroy AK, Staff AC (2010) Expression of liver X receptors in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta*. 31: 818-24.

[37] Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987) Human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330(6147):444-50.

[38] Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330(6149):624-9.

[39] Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A (1988) Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332(6167):850-3.

[40] Benbrook D, Lernhardt E, Pfahl M. (1988) A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333(6174):669-72.

[41] Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P (1989) Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* 339(6227):714-7.

[42] Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P (1989) A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci* 86(14):5310-4.

[43] Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345(6272):224-9.

[44] Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10(9):940-54.

[45] Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub M.-P, LeMeur M, Chambon P (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:7225-7229.





- [46] Dollé P (2009) Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal*. 7:e006.
- [47] Berry D.C, Noy N (2009) All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor / and Retinoic Acid Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 29:3286–3296.
- [48] Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83(6):841-50.
- [49] Leid M, Kastner P, Chambon P (1992) Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci*. 17(10):427-33.
- [50] Lalevee S, Anno YN., Chatagnon A, Samarut E, Poch O, Laudet V, Benoit G, Lecompte O, Rochette-Egly C (2011) Genome-wide in Silico Identification of New Conserved and Functional Retinoic Acid Receptor Response Elements (Direct Repeats Separated by 5 bp). *J Biol Chem* 286:33322-34.
- [51] Clagett-Dame M, DeLuca HF (2002) The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr*. 22:347-81.
- [52] McCollum EV, Davis M (1913) The necessity of certain lipids in the diet during growth. *Journal of Biological Chemistry* 15:167-75.
- [53] Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology* 66:606–630.
- [54] Venkatachalam PS, Belavady B, Gopalan C (1962) Studies on vitamin A nutritional status of mothers and infants in poor communities of India. *J Pediatr* 61:262-8.
- [55] Wilson JG, Roth CB, Warkany J (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*. 92:189-217.
- [56] Mason KE (1935) Fetal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A-deficiency. *American Journal of Anatomy* 57:303-349.
- [57] Sommer A, Tarwotjo I, Djunaedi E, West KP Jr, Loeden AA, Tilden R, Mele L (1986) Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet* 1:1169-73.
- [58] Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews* 80:1021–1054.
- [59] Cohlan SQ (1953) Excessive Intake of Vitamin A as a Cause of Congenital Anomalies in the Rat. *Science* 535-536.
- [60] Durston AJ, Timmermans JP, Hage WJ, Hendriks HF, de Vries NJ, Heideveld M, Nieuwkoop PD (1989) Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340(6229):140-4.
- [61] Avantaggiato V, Acampora D, Tuorto F, Simeone A (1996) Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. *Dev Biol* 175(2):347-57.



- [62] D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011) Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3:63-103.
- [63] Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315: 820-5.
- [64] Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 65:3936-49.
- [65] Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21:444-8.
- [66] Chithalen JV1, Luu L, Petkovich M, Jones G (2002) HPLC-MS/MS analysis of the products generated from all-trans-retinoic acid using recombinant human CYP26A. *J Lipid Res.* 43:1133-42.
- [67] Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M (2005) The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285: 224-37.
- [68] Wu L, Ross A.C. Acidic retinoids synergize with vitamin A to enhance retinol uptake and STRA6, LRAT, and CYP26B1 expression in neonatal lung (2010) *The Journal of Lipid Research* 51:378–387.
- [69] Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Décimo D, Dollé P, Chambon P (1997) Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* 63:173-86.
- [70] Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83: 859-69.
- [71] Mark M, Chambon P (2003) Functions of RARs and RXRs in vivo: Genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Pure and Applied Chemistry* 1709–32.
- [72] Mark M, Ghyselinck N, Chambon P (2009) Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Journal of the nuclear receptors signaling atlas* 7:e002. doi: 10.1621/nrs.07002.
- [73] Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006) International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors. *Pharmacological Reviews* 58:712–725.
- [74] Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723–2748.
- [75] Luo J, Sucov HM, Bader JA, Evans RM, Giguère V (1996) Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms. *Mech Dev* 55:33-44.



- [76] Kastner P, Grondona J M, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dolle P and Chambon P (1994) Genetic analysis of RXR  $\alpha$  developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78:987-1003.
- [77] Conlon RA (1995) Retinoic acid and pattern formation in vertebrates *Trends Genet* 314–319.
- [78] Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dollé P (1997) Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev. Dyn* 199–210.
- [79] Sapin V, Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Dastugue B, Chambon P, Dollé P (2000) Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation. *Mech Dev* 92:295-9.
- [80] Howell McC, Thompson N, Pitt G (1964) Histology of the lesions produced in the reproductive tract of animals fed a diet deficient in vitamin A alcohol but containing vitamin A acid. *J.reprod.fertil* 7:251-258.
- [81] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585-95.
- [82] Wendling O, Chambon P, Mark M (1999) RXRs are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 547–551.
- [83] Sapin V, Dollé P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P (1997) Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXR $\alpha$  null fetuses. *Dev. Biol* 29–41.
- [84] Datta K, Kulkarni AP (1996) Co-oxidation of all-trans retinol acetate by human term placental lipoxygenase and soybean lipoxygenase. *Reprod Toxicol* 10:105–112.
- [85] Sapin V, Chaïb S, Blanchon L, Alexandre-Gouabau MC, Lémery D, Charbonne F, Gallot D, Jacquetin B, Dastugue B and Azais-Braesco V (2000) Esterification of Vitamin A by the Human Placenta Involves Villous Mesenchymal Fibroblasts. *Pediatric research* 48(4):565-72.
- [86] Stephanou A, Handwerger S (1995) Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* 136(3):933-8.
- [87] Stephanou A, Handwerger S (1995) Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 112(1):123-9.
- [88] Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D (1998) Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab.*4:1384-7.
- [89] Roulier S, Rochette-Egly C, Rebut-Bonneton C, Porquet D, Evain-Brion D (1994) Nuclear retinoic acid receptor characterization in cultured human trophoblast cells: effect of retinoic acid on epidermal growth factor receptor expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2:165-73.



- [90] Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Heyman RA, Staels B, Auwerx J (1996) Retinoids increase human apolipoprotein A-11 expression through activation of the retinoid X receptor but not the retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol.* 7: 3350-60.
- [91] Kogai T, Liu YY, Richter LL, Mody K, Kagechika H, Brent GA (2010) Retinoic acid induces expression of the thyroid hormone transporter, monocarboxylate transporter 8 (Mct8). *J Biol Chem.* 35:27279-88.
- [92] Hollung K, Rise CP, Drevon CA, Reseland JE (2004) Tissue-specific regulation of leptin expression and secretion by all-trans retinoic acid. *J Cell Biochem.*92(2):307-15.
- [93] Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T (2001) PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(10):5017-24.
- [94] Holdsworth-Carson SJ, Permezel M, Riley C, Rice GE, Lappas M (2009) Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor-alpha in term human gestational tissues: tissue specific and labour-associated changes. *Placenta.* 30(2):176-86.
- [95] Wang Y, Lin Q, Wang X, Lu P, Sheng Z, Ding C, Hong Y, Li W (2002) Expression of lethal gene mRNA on placenta villi in patients with spontaneous abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 37(9):542-5.
- [96] Holdsworth-Carson SJ, Permezel M, Rice GE, Lappas M (2009) Preterm and infection-driven preterm labor: the role of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor. *Reproduction.* 137(6):1007-15.
- [97] Nakanishi T, Nishikawa J, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Takasuga S, Ishizaki J, Watanabe M, Isa S, Utoguchi N, Itoh N, Kohno Y, Nishihara T, Tanaka K (2005) Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. *Mol Endocrinol.* 19(10):2502-16.
- [98] Marceau G, Gallot D, Borel V, Lémery D, Dastugue B, Dechelotte P, Sapin V (2006) Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 346(4):1207-16.
- [99] Borel V, Marceau G, Gallot D, Blanchon L, Sapin V (2010) Retinoids regulate human amniotic tissue-type plasminogen activator gene by a two-step mechanism. *J Cell Mol Med.* (6B):1793-805.
- [100] Chen Y, Reese D (2013) A Screen for Disruptors of the Retinol (Vitamin A) signaling pathway. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 98: 276–282.
- [101] Dawson MI, Xia Z (2012) The retinoid X receptors and their ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821:21–56.
- [102] Thacher SM, Vasudevan J, Chandraratna RA (2000) Therapeutic Applications for Ligands of Retinoid Receptors. *Curr Pharm Des* 6(1):25-58.
- [103] Germain P, Kammerer S, Pérez E, Peluso-Iltis C, Tortolani D, Zusi FC, Starrett J, Lapointe P, Daris JP, Marinier A (2004) Rational design of RAR-selective ligands revealed by RAR $\beta$  crystal structure. *EMBO Reports* 5:877–882.





- [104] Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 21, pp 381-388.
- [105] Dilworth FJ, Chambon P (2001) Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20:3047–3054.
- [106] Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal structure of RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *14;378(6558):681-9*.
- [107] de Lera AR, Bourguet W, Altucci L, Gronemeyer H (2007) Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov* 6(10):811-20.
- [108] Maire A, Alvarez S, Shankaranarayanan P, Lera AR, Bourguet W, Gronemeyer H (2012) Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators. *Curr Top Med Chem* 12(6):505-27.
- [109] Germain P, Gaudon C, Pogenberg V, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Royer CA, Lazar MA, Bourguet W, Gronemeyer H (2009) Differential action on coregulator interaction defines inverse retinoid agonists and neutral antagonists. *Chem Biol* 16(5):479-89.
- [110] Elias PM (1987) Retinoid effects on the epidermis. *Dermatologica* 1:28-36.
- [111] Gottlieb S, Hayes E, Gilleaudeau P, Cardinale I, Gottlieb AB, Krueger JG (1996) Cellular actions of etretinate in psoriasis enhanced epidermal differentiation and reduced cell-mediated inflammation are unexpected outcomes. *J Cutan Pathol* 23(5):404-18.
- [112] Gisondi P, Del Giglio M, Cotena C, Girolomoni G (2008) Combining etanercept and acitretin in the therapy of chronic plaque psoriasis: a 24-week, randomized, controlled, investigator-blinded pilot trial. *Br J Dermatol* 158(6):1345-9.
- [113] Lee CS, Li K (2009) A review of acitretin for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Saf* 8(6):769-79.
- [114] Mérot Y, Camenzind M, Geiger JM, Saurat JH (1987) Arotinoid ethyl ester (Ro 13-6298): a long term pilot study in various dermatoses. *Acta Derm Venereol* 67(3):237-42.
- [115] Altucci L and Gronemeyer H (2001) The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1(3):181-93.
- [116] Widschwendter M, Berger J, Müller HM, Zeimet AG, Marth C (2001) Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(2):193-201.
- [117] Xu XC, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK, Lotan R (1994) Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res* 54(13):3580-7.
- [118] Lotan R1, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK (1995) Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin.



N Engl J Med 25;332(21):1405-10.

[119] Ablain J, de Thé H (2014) Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer*. 135(10):2262-72.

[120] Shalita AR, Armstrong RB, Leyden JJ, Pochi PE, Strauss JS (1988) Isotretinoin revisited. *Cutis* 29;42(6A):1-19.

[121] Perry MD and McEvoy GK (1983) Isotretinoin : new therapy for severe acne. *Clin Pharm* 2(1):12-9.

[122] Brogden RN, Goa KE (1997) Adapalene : a review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of mild to moderate acne. *Drugs* 53(3):511-9.

[123] Ismadi SD, Olson JA (1982) Dynamics of the fetal distribution and transfer of Vitamin A between rat fetuses and their mother. *Int J Vitam Nutr Res*. 52(2):112-9.

[124] Donoghue S, Richardson DW, Sklan D, Kronfeld DS (1982) Placental transport of retinol in sheep. *J Nutr*. 112(11):2197-203.

[125] Shukla RR, Kumar V, Banerjee R, Misra UK (1986) Placental transfer and fetal distribution of 3H-retinoic acid in rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 56(1):29-33.

[126] Wassef L and Quadro L (2011) Uptake of dietary retinoids at the maternal-fetal barrier: in vivo evidence for the role of lipoprotein lipase and alternative pathways. *J Biol Chem* 286(37):32198-207.

[127] Marceau G, Gallot D, Lemery D, Sapin V (2007) Metabolism of retinol during mammalian placental and embryonic development. *Vitam Horm*. 75:97-115.

[128] Ortega-Senovilla H1, Alvino G, Taricco E, Cetin I, Herrera E (2009) Enhanced circulating retinol and non-esterified fatty acids in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond)*. 118(5):351-8.

[129] Kutasy B, Pes L, Friedmacher F, Paradisi F, Puri P (2014) Nitrofen increases total retinol levels in placenta during lung morphogenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 30(10):1017-22.

[130] Sulik KK, Dehart DB, Rogers JM, Chernoff N (1995) Teratogenicity of low doses of all-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. *Teratology* 51(6):398-403.

[131] Creech Kraft J, Kochhar DM., Scott WJ Jr and Nau H (1987) Low Teratogenicity of 13-cis- retinoic acid (isotretinoin) in the mouse corresponds to low embryo concentrations during organogenesis: comparison to the all-trans isomer. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 87: 474-482.

[132] Nau H (2001) Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45(5):S183-7.

[133] Kochhar DM, Jiang H, Penner JD, Heyman RA (1995) Placental transfer and developmental effects of 9-cis retinoic acid in mice. *Teratology*.51(4):257-65.

[134] Nau H (2001) Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol*. 45(5):S183-7.



- [135] Collins MD, Tzimas G, Bürgin H, Hummler H, Nau H (1995) Single versus multiple dose administration of all-trans-retinoic acid during organogenesis: differential metabolism and transplacental kinetics in rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 130(1):9-18.
- [136] Sass JO, Hartmann J, Chahoud I, Shroot B, Nau H (1995) Transplacental pharmacokinetics of a synthetic retinoid which is not bound by mouse embryonic cellular retinoic acid-binding protein. *Toxicol Lett* 75(1-3):159-68.
- [137] Willhite CC, Lovey A, Eckhoff C (2000) Distribution, teratogenicity, and embryonic delivered dose of retinoid Ro 23-9223. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164(2):171-5.
- [138] Crettaz M, Baron A, Siegenthaler G, Hunziker W (1990) Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR alpha and RAR beta. *Biochem J* 1;272(2):391-7.
- [139] Kochhar DM and Penner JD (1992) Analysis of high dysmorphogenic activity of Ro 13-6307, a tetramethylated tetralin analog of retinoic acid. *Teratology*45(6):637-45.
- [140] Loeliger P, Bollag W, Mayer H (1980) Arotinoids, a new class of highly active retinoids. *European journal of medicinal chemistry* 15:9-15.
- [141] Arafa HM, Elmazar MM, Hamada FM, Reichert U, Shroot B, Nau H (2000). Selective agonists of retinoic acid receptors: comparative toxicokinetics and embryonic exposure. *Arch Toxicol.* 73(10-11):547-56.
- [142] Brown NA, Fabro S. The value of animal teratogenicity testing for predicting human risk. *Clin Obstet Gynecol* 26(2):467-77.
- [143] Schardein JL, Schwetz BA, Kenel MF (1985) Species sensitivities and prediction of teratogenic potential. *Environ Health Perspect* 61:55-67.
- [144] Buresh JJ, Urban TJ (1970) Palatal abnormalities induced by cortisone and corticosterone in the rat. *J Acad Gen Dent* 18(2):34-7.
- [145] Buttar HS, Dupuis I, Khera KS (1976) Fetotoxicity of trimethadione and paramethadione in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 37: 126.
- [146] Schwetz BA, Smith FA, Staples RE (1978) Teratogenic potential of ethanol in mice, rats and rabbits. *Teratology* 18: 385-392.
- [147] Neubert D, Merker HJ, Nau H and Langman J (1978) Role of pharmacokinetics in prenatal and perinatal toxicology: third Symposium on Prenatal Development, Berlin, pp. 499-506.
- [148] Centers for Disease Control (1984) Isotretinoin - a newly recognized human teratogen. *Morb Mortal Wkly Rep* 33:171-173.
- [149] Loureiro KD, Kao KK, Jones KL, Alvarado S, Chavez C, Dick L, Felix R, Johnson D, Chambers CD (2005) Minor malformations characteristic of the retinoic acid embryopathy and other birth outcomes in children of women exposed to topical tretinoin during early pregnancy. *Am J Med Genet A* 136(2):117-21.
- [150] Pugashetti R, Shinkai K (2013) Treatment of acne vulgaris in pregnant woman. *Dermatol Ther* 26(4):302-11.



[151] Nulman I, Berkovitch M, Klein J, Pastuszak A, Lester RS, Shear N, Koren G (1998) Steady-state pharmacokinetics of isotretinoin and its 4-oxo metabolite: implications for fetal safety. *J Clin Pharmacol* 38(10):926-30.

[152] Yang D and Hladnik L (2009) Treatment of acute promyelocytic leukemia during pregnancy. *Pharmacotherapy* 29(6):709-24.

[153] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F (2009) Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 113(9):1875-91.

[154] Culligan DJ, Merriman L, Kell J, Parker J, Jovanovic JV, Smith N, Grimwade D (2007) The management of acute promyelocytic leucemia presenting during pregnancy. *Clin Leukemia*. 1:183-191.





## **Figures and legends**

### **Figure 1.**

A) Structural organization of nuclear receptors.

The N-terminal domain contains the transactivation ligand-independent domain AF1. The DNA binding domain (DBD) recognizes a specific sequence on the DNA called hormone responsive element (HRE). The ligand binding domain, allowing the binding of the ligand(s), also contains the activation function 2 (AF2) and contributes to the dimerization interface.

B) Binding of nuclear receptors to the hormones responsive elements (HRE).

Nuclear receptors bind as homodimer or heterodimer on specific sequences present on the DNA. HRE are composed of a repeat of one core motif that can be direct (DR), everted (ER) or inverted (IR), depending on the of nuclear receptor subtype.

**Figure 2:** Binding of the heterodimers RAR/RXR to the retinoic acid responsive elements (RARE).

RAR and RXR heterodimerize and recognize the direct repeat of the motif 5'- Pu G (G/T)TCA spaced by 1 (DR1), 2 (DR2) or 5 (DR5) nucleotides located in target gene promoters.

**Figure 3.** Simplified version of the retinoid pathway.

Retinol (combined with retinol binding protein-RBP) passes through the cellular membrane using the stimulated by retinoic acid 6 receptor (STRA6), is carried by the cellular retinol binding protein (CRBPs), and transformed into retinaldehyde (Ral) by alcohol dehydrogenase (ADH) or retinol dehydrogenase (RDH).  $\beta$ -carotene after its entry into the cells is directly transformed into Ral, which is then transformed into retinoic acids (RAs) by retinaldehyde dehydrogenase. RAs are then bound to cellular retinoic acid binding protein (CRABPs) and enter the nucleus.

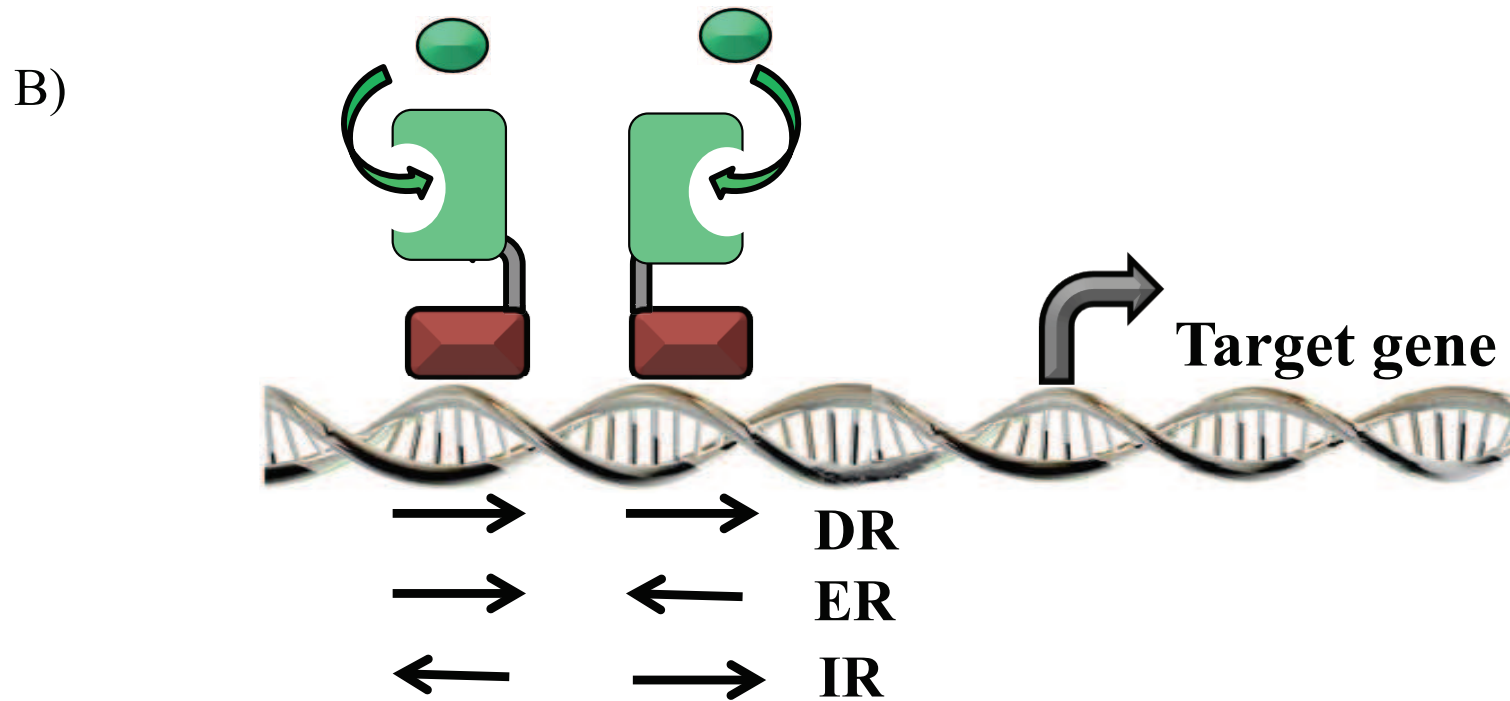
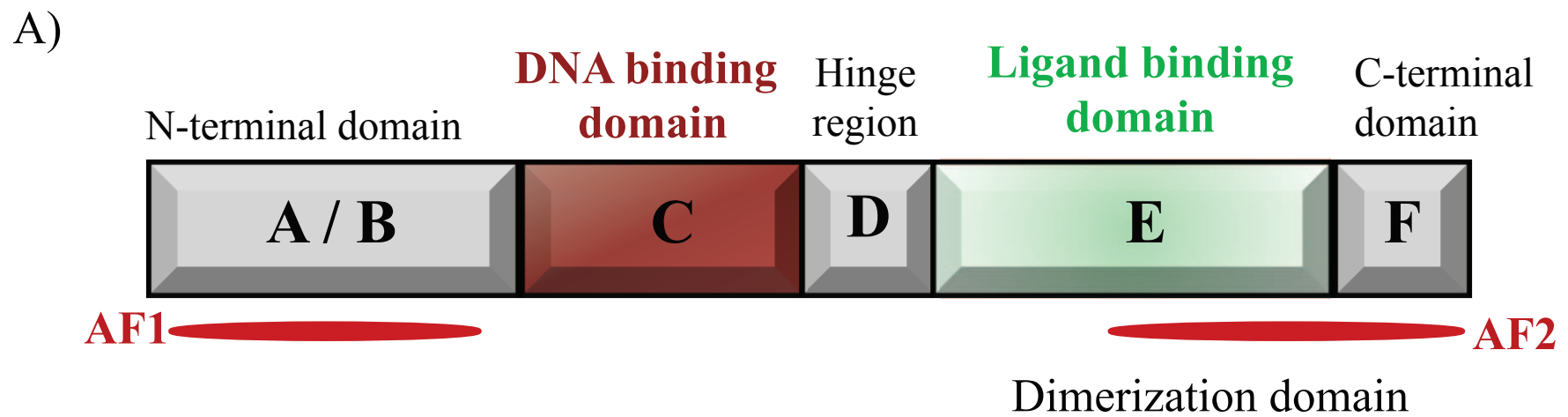
**Figure 4.** Sequence alignment of LBD regions of RAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ .

These regions contain the three divergent amino acid residues responsible for the retinoic acid receptor isotype specificity. These residues belong to the helix 3, 5 and 11 within the ligand binding pocket, which is composed of 12  $\alpha$ -helix units arranged in a 3D conformation and separated by  $\beta$ -sheets.

**Figure 5.** Examples of agonists/antagonists of RARs and RXRs.

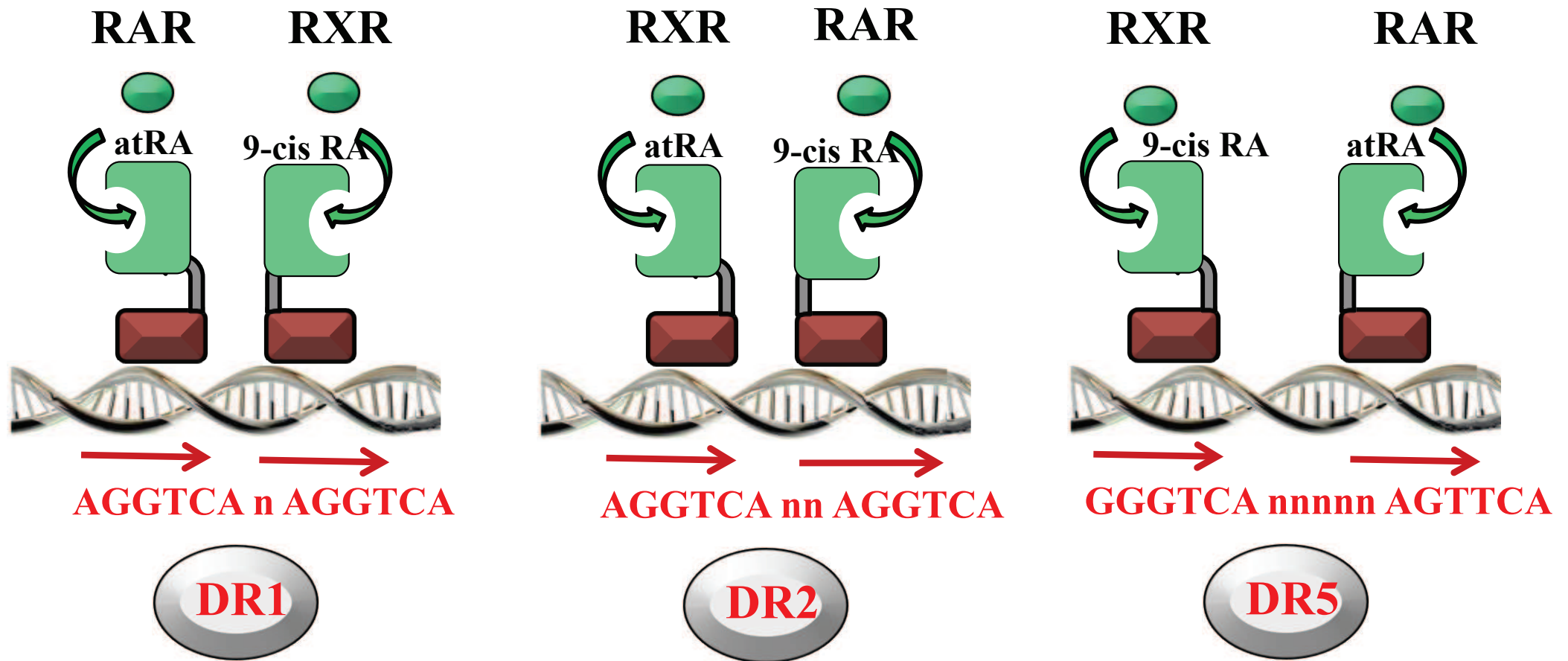
AtRA and 9cisRA are the natural agonists of RAR and RXR respectively: these endogenous ligands exert a physiological agonist action on the receptors. Synthetic agonists/antagonists are shown in blue; different classes of agonists and antagonists are presented and illustrated by one example.





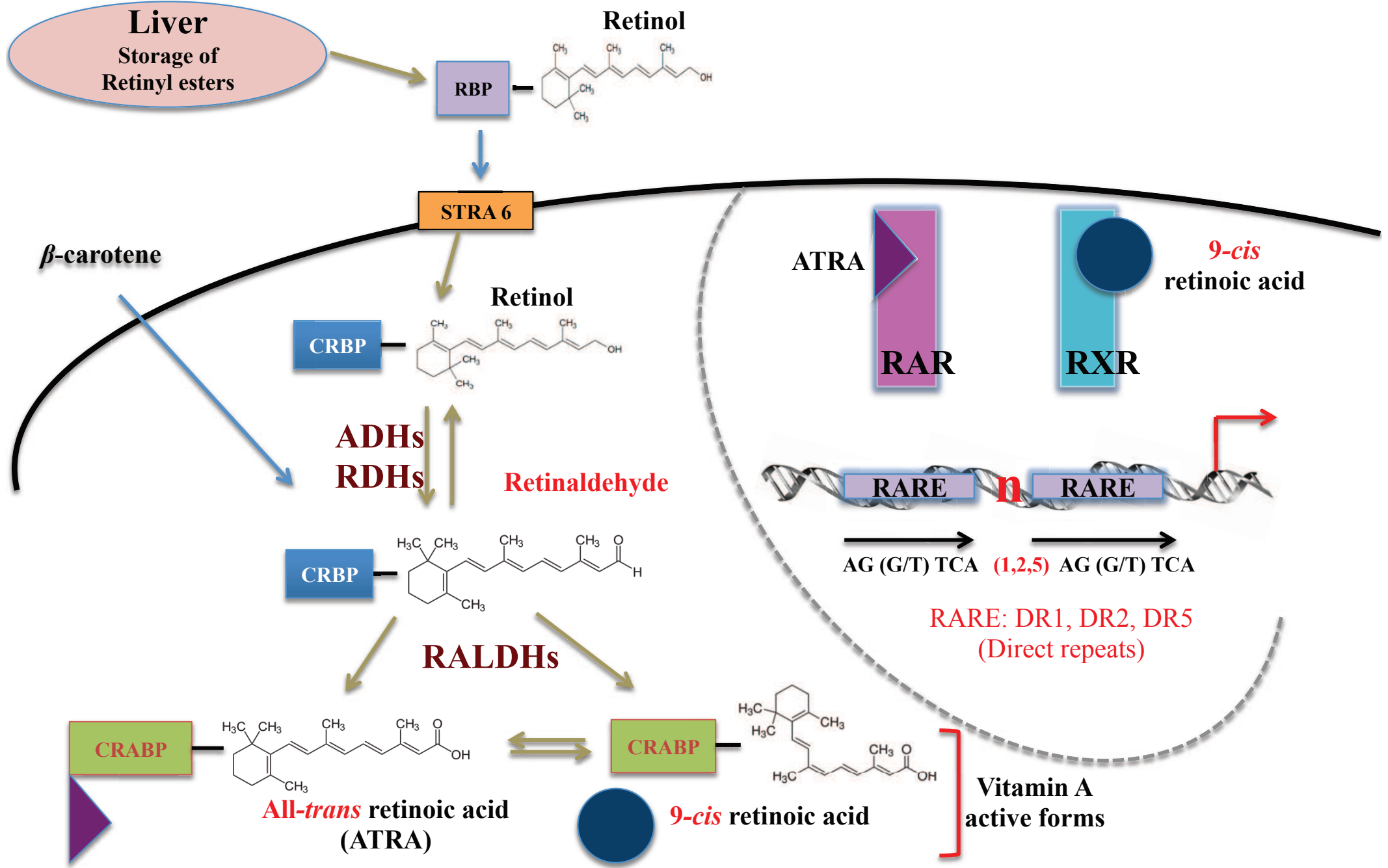
**Figure 1.** A) Structural organization of nuclear receptors.  
 B) Binding of nuclear receptors to the hormones responsive elements (HRE).





**Figure 2.** Binding of the heterodimers RAR/RXR to the retinoic acid responsive elements (RARE).





**Figure 3.** Simplified version of the retinoid pathway.





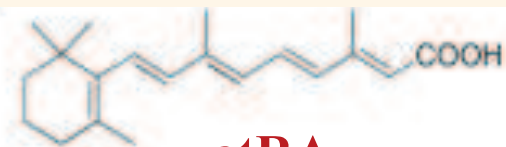
Receptor	Helix		
	H3	H5	H11
hRAR $\alpha$	KFSEL <b>S</b> TKCIK	ACLDIL <b>I</b> LRICT	GAER <b>V</b> ITLKME
hRAR $\beta$	KFSEL <b>A</b> TKCIK	ACLDIL <b>I</b> LRICT	GAER <b>V</b> ITLKME
hRAR $\gamma$	KFSEL <b>A</b> TKCIK	ACLDIL <b>M</b> LRICT	GAER <b>A</b> ITLKME

**Figure 4.** Sequence alignment of LBD regions of RAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ .

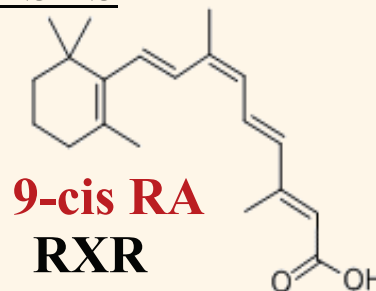


**Figure 5.** Examples of agonists / antagonists of RARs and RXRs.

### NATURAL AGONISTS

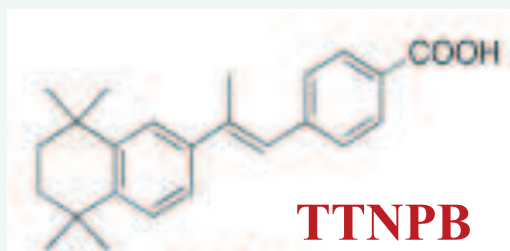


**atRA**  
**RAR**

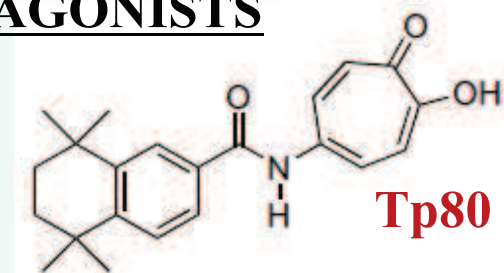


**9-cis RA**  
**RXR**

### SYNTHETIC AGONISTS

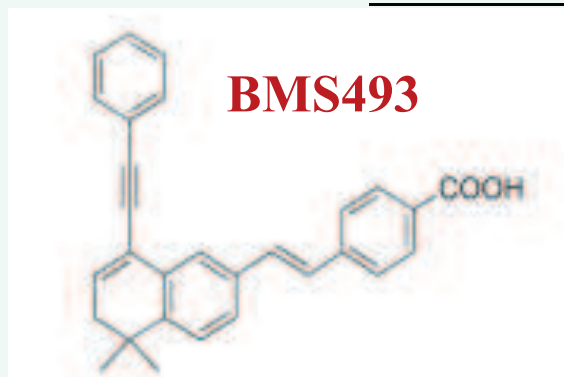


**TTNPB**  
**RAR Agonist**



**Tp80**  
**RAR Partial agonist**  
- RAR $\alpha$  selective agonist  
- RXR antagonist

### SYNTHETIC ANTAGONISTS



**BMS493**  
**RAR Inverse agonist**



**BMS614**  
**RAR Classical antagonist**



Le premier objectif de ce travail était de mettre en évidence l'importance de la voie des rétinoïdes dans la reproduction et le développement des mammifères et en particulier dans la grossesse humaine. En effet, depuis la démonstration des effets oculaires graves causés par une déficience en vitamine A, son rôle crucial dans le développement a été largement documenté, notamment grâce à des études réalisées sur des modèles animaux déficients en vitamine A. Son implication dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire ainsi que dans la placentation et la morphogénèse a été établie, faisant de la voie des rétinoïdes une cascade de régulation centrale des différents acteurs de la vie *in utero*.

Les études réalisées sur des modèles animaux KO pour les récepteurs aux acides rétinoïques RARs et/ou RXRs ont permis de démontrer que les effets de la vitamine A étaient médiés par la fixation de ses dérivés actifs, les acides rétinoïques, sur leurs récepteurs nucléaires. De plus, le rôle clé de l'hétérodimère RXR $\alpha$ /RAR dans la transduction du signal de la vitamine A a été confirmé par le modèle murin invalidé pour RXR $\alpha$ /RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ), qui présente des défauts similaires à ceux observés dans le syndrome de déficience à la vitamine A (VAD).

Le placenta est une annexe extra-embryonnaire essentielle pour le développement de l'embryon puis du fœtus. C'est une véritable interface d'échange assurant l'élimination des déchets ainsi que l'apport en nutriments, en métabolites et en oxygène nécessaire à la vie et au développement fœtal. En outre, le placenta agit comme un filtre sélectif en contrôlant les molécules transitant vers la circulation fœtale, même si cette barrière peut se révéler perméable pour certaines substances.

Au regard des rôles clés du placenta et des rétinoïdes dans le développement, la compréhension du métabolisme de la voie de la vitamine A et des mécanismes moléculaires impliqués dans ses fonctions au sein des annexes extra-embryonnaires apparaît essentielle



pour la santé du fœtus mais aussi afin de pouvoir envisager son « contrôle » pharmacologique lors de la grossesse. De plus, un excès d'apport en vitamine A (ou d'acides rétinoïques) pouvant provoquer de graves malformations congénitales chez le fœtus, son utilisation clinique pendant la grossesse reste encore aujourd'hui largement discutée. Ces effets tératogènes sont toutefois difficiles à prédire dans l'espèce humaine à partir des études sur modèles animaux du fait des grandes différences pharmacocinétiques des rétinoïdes en fonction du type de placentation. Chez l'Homme, ces effets délétères sur le développement sont uniquement démontrés au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse, rendant l'utilisation pharmacologique des rétinoïdes envisageable au cours du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre.

Ainsi, l'intérêt porté à la connaissance des acteurs de la voie des rétinoïdes lors de ces dernières décennies a permis le développement de nombreux agonistes et antagonistes naturels ou synthétiques utilisables en recherche et/ou en clinique. C'est pourquoi au jour d'aujourd'hui, la vitamine A et ses dérivés actifs connaissent déjà un large panel d'applications thérapeutiques au vu de leur implication dans de nombreux processus physiologiques. Ils sont par exemple utilisés en dermatologie dans le traitement de l'acné et du psoriasis, en ophtalmologie dans le traitement des ulcères cornéens et des sécheresses oculaires mais aussi en cancérologie dans le cas des leucémies aiguës promyélocytaires.





## Publication n°2

En révision dans :

*The International Journal of Biochemistry & Cell biology*

**« All-trans retinoic acid promotes wound  
healing of primary amniocytes  
through the induction of LOXL4, a member  
of the lysyl oxidase family.»**

**Marion ROUZAIRE, Aurélie COMPTOUR, Corinne BELVILLE,  
Damien BOUVIER, Gaël CLAIREFOND, Flora PONELLE, Vincent  
SAPIN, Denis GALLOT and Loïc BLANCHON**



**All-trans retinoic acid promotes wound healing of primary amniocytes  
through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family.**

Marion ROUZAIRE <sup>a</sup>, Aurélie COMPTOUR <sup>a</sup>, Corinne BELVILLE <sup>a, b</sup>, Damien BOUVIER <sup>a, c</sup>, Gaël CLAIREFOND <sup>a</sup>, Flora PONELLE <sup>a</sup>, Vincent SAPIN <sup>a, c</sup>, Denis GALLOT <sup>a, d</sup> and Loïc BLANCHON <sup>a</sup>

a] Clermont Université, Auvergne University, EA7281- Retinoids, Reproduction, Developmental Diseases, Medicine School, 63000 CLERMONT-FERRAND, France.

b] Clermont Université, Auvergne University, GReD, 63000 CLERMONT-FERRAND, France.

c] CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, 63000 CLERMONT-FERRAND, France.

d] CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, 63000 CLERMONT-FERRAND, France.

Corresponding author and reprint requests: Professor Vincent Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 place Henri-Dunant, BP38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France, Tel: +33 4 73 17 81 74, Fax: +33 4 73 27 61 32, e-mail: [vincent.sapin@udamail.fr](mailto:vincent.sapin@udamail.fr)



**ABSTRACT** (electronic wordcount: 159 words)

Thirty percent of preterm births directly result from preterm premature rupture of fetal membranes (PPROM). Clinical management currently could propose using a collagen plug to mechanically stop loss of amniotic fluid. Vitamin A and its active metabolite (retinoic acid) have well-known pro-healing properties and could thus make good candidates as a proposable adjuvant to this mechanical approach. Here we investigate the molecular mechanisms involved in the pro-healing properties of all-trans retinoic acid (atRA) in fetal membranes via an approach using an *in vitro* primary amniocyte wound model and transcriptomics. The results demonstrate that atRA promotes migration in primary amniocytes, improving wound healing *in vitro* by up to 90% of. This effect is mediated by the induction of LOXL4, which plays a crucial role in the dynamics of the extracellular matrix by regulating collagen reticulation. This new insight into how atRA exerts its pro-healing properties prompts us to propose using atRA as a candidate strategy to help prevent future PPRM.

**KEYWORDS:** wound healing, fetal membranes, retinoid, lysyl oxidase.



## **1. INTRODUCTION**

Human fetal membranes are composed of two distinct layers: the amnion (the internal layer), which lines the amniotic fluid, and the underlying chorion, which lines the maternal decidua (Parry and Strauss, 1998). Both are essential structures that specifically maintain healthy pregnancy through their numerous functions, including regulation of amniotic fluid homeostasis (Prat et al., 2012), paracrine actions [Denison et al., 1998; Riley et al., 1999], protection against pathogens and mechanical resistance to internal and external pressure. Physiologically, at term, the rupture of the membranes occurs during labor via a step-by-step mechanism ending with fracture of the amnion, which is generally identified as the stronger layer (Méhats et al., 2011; Bryant-Greenwood, 1998; El Khwad et al., 2005; Moore et al., 2006). This phenomenon results from two main processes: dramatic increase in internal pressures due to uterine contractions and fetal movements, and a weakening of fetal membranes composition and strength enabling the rupture. This programmed weakening process is mainly due to modifications in extracellular matrix (ECM) dynamics (Strauss, 2013). Indeed, the balance between ECM production and enzymatic degradation is altered at the end of pregnancy, resulting in a degradation of the ECM formed essentially by a strong collagen network. Human fetal membranes approach full term show a characteristic increase in MMP8 and MMP 9 and decrease in TIMP1 and TIMP3 (Vadillo-Ortega et al., 1995; Arechavaleta-Velasco et al., 2004; Kummar et al., 2006).

The most common pathology involving fetal membranes is premature rupture (PROM), defined as a rupture taking place before the onset of the labor. PROM can occur at term (called TPROM), with no risk to fetus, or preterm (called PPRM) when it occurs before 37 weeks of gestation. PPRM is responsible for 1/3 of preterm births and can lead to perinatal mortality in the most severe cases (Simhan, and Canavan, 2005; Moutquin, 2003). Several factors have been associated with chronic PPRM (Hadley et al., 1990; Caughey et al., 2008), including choriodecidua infection (Bendon et al., 1999), pollutant exposure (Dadvand et al., 2013) and smoking (England et al., 2013). Besides these environmental causes, surgical procedures that challenge membrane integrity, such as amniocentesis and fetoscopy, are also reported as major risk factors for PPRM (Papanna et al., 2010a), potentially causing iatrogenic PPRM (iPPROM). Clinical management options for PPRM remain limited, mainly due to the fact that fetal membranes are very slow to heal (Gratacós et al., 2006; Devlieger et al., 2006). Current preventive treatment therefore revolves around prolonging pregnancy by preventing infection (Blanchon et al., 2013). Nevertheless, several therapeutic strategies to delay rupture have been studied, the most widely tested to date being attempting to seal iatrogenic wounds via a 'mechanical' approach using a collagen plug. However, despite promising results in animal models (Gratacós et al., 2000), this mechanical technique





shows little efficacy in humans. Several studies have been led to improve plug-use by optimizing its healing capacities, mainly by focusing on its ability to promote amnion re-epithelialization, with various degrees of success. A long list of adjuvants to this inert matrix plug have already been tested, ranging from fibrinogen, plasma, platelets and amniotic fluid to mussel-mimetic glue, and also simply primary amniotic cells (Mallik et al., 2007; Engels et al., 2013; Liekens et al., 2008; Papadopulos et al., 2010; Kivelio et al., 2013).

Given the various complementation strategies already tested, vitamin A and its active metabolite (retinoic acid), which are already well described and used in clinical practice to promote wound healing (Thielitz and Gollnick, 2008; Johansen et al., 1998), could be promising candidates as adjuvants to help improve the efficacy of collagen plugs. Furthermore, their effects on wound healing (Abdelmalek and Spencer, 2006; Lee and Tong, 1970; Hattori et al., 2012) and ECM dynamics (Fisher et al., 1996; Barber et al., 2014) have been well documented, mainly in skin, eyes and developing organs (lung and heart). In fetal membranes, the presence and functionality of the retinoid pathway has been already demonstrated (Marceau et al., 2006) but its effect on gene regulation remains poorly studied (Blanchon et al., 2011). However, *all trans* retinoic acid (atRA), the active metabolite of vitamin A, has been shown to regulate the expression of genes involved in both amniotic fluid homeostasis (Prat et al., 2015) and, more interestingly, the ECM dynamics of the membranes (Borel et al., 2010).

As part of this study to further investigate the global effects of atRA on human fetal membranes, we generated a large-scale transcriptome dataset and identified a list of genes regulated by the retinoid pathway in fetal membranes, more specifically in the amnion and primary amniocytes. These findings highlight the potential importance of members of the lysyl oxidase (LOX) family, which are key enzymes of ECM dynamics but also permit the oxidation of amine chemical functions localized on collagen lysines and elastin precursors, thus allowing the fibers to crosslink (Kagan et al., 1995; Smith-Mungo and Kagan, 1998). Lysyl oxidases thus emerge as the main actors in the reticulation of collagen and maintenance of the tensile strength of collagen fibrils in several tissues (Molnar et al., 2003; Mäki, 2009). The LOX family is composed of five members that share the same catalytic activity (C-terminal) but different N-terminal domains that confer new functions to the lysyl oxidase. Three of these LOX (LOX, LOXL1 and LOXL2) are already known to be expressed in placenta, maternal decidua and human fetal membranes (Hein et al., 2001). Note too that LOX activity has been shown to decrease in the amnion throughout pregnancy but more strongly at late gestational age, thus pointing to the potential importance of LOXs for ECM integrity in fetal membrane tissue (Casey and MacDonald, 1997).



Our atRA transcriptomics results were used here to investigate the wound healing properties of vitamin A by *in-vitro* scratch assay on primary amniocytes. We demonstrated ECM dynamics of one of the most important of all the various pathways regulated by atRA. Finally, and for the first time, we provide evidence of a direct link between a retino-induced LOX gene and the pro-healing properties of atRA on amniotic cells.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemicals**

All-trans retinoic acid (atRA), dimethyl sulfoxide (DMSO), trypsin,  $\beta$ -amino propionitrile ( $\beta$ APN) and cycloheximide (CHX) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Cell culture media were obtained from Gibco<sup>®</sup> Life Technologies (Carlsbad, CA). Fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (streptomycin and penicillin) were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Collagen I was obtained from Stemcell (Grenoble, France). The Superscript III First-Strand-Synthesis System for RT-PCR, taq polymerase and lipofectamine 3000 reagent were obtained from Life Technologies.

### **2.2 Sample collection**

Full-term fetal membranes were collected from healthy pregnancies after cesarean births (University Hospital - Estaing, Clermont-Ferrand, France) with informed consent from the mother. The research protocol was approved by the hospital centre's IRB. Amnion was dissociated from the chorion and used for both tissue explants and culture of primary amniocytes.

### **2.3 Cell and tissue culture**

Cells and tissues were cultivated under standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air, 37°C). Human amnion-like Wistar Institute Susan Hayflick (WISH) cell line was grown in Modified Eagle's Medium (MEM) supplemented with 10% FBS, 200 nM glutamine, 50 mg/mL streptomycin and 50 IU/mL penicillin. Amnion explants, primary amniocytes and amnion-derived AV-3 cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 nutrient mixture (DMEM-F12 + GlutaMAX<sup>™</sup>-I) supplemented with 10% FBS, 50 mg/mL streptomycin and 50 IU/mL penicillin. Amnion explants were prepared by cutting of 1 cm<sup>2</sup> squares just before incubation. Primary amniotic epithelial cells were isolated as follows. After repeat washes in PBS, the amnion was cut into squares and incubated in 5 mL of a solution of 0.25% trypsin for 1 0min at 37°C. The trypsin was removed and replaced by 7 mL of fresh trypsin solution for 20 min. Then, the trypsinated cells were collected in



complete media and centrifuged for 5 min at 1000 rpm. Finally, the remaining amnion was incubated for 30 min in a third bath of trypsin (7 mL) collected in complete media after scraping the amnion epithelia. This solution was filtered to remove the collagen, then centrifuged for 5 min at 1000 rpm. Cells from the second and third trypsinization steps were pooled and grown on culture dishes coated with collagen I (BioCoat™, Spectralab, Markham, Canada) in complete media.

## **2.4 Transcriptomics study**

The transcriptomics study was performed on primary amniotic epithelial cells, amnion and chorion, treated with atRA or DMSO (as atRA vehicle) for 24 h (n=12). Explants and cells were frozen at -80°C after treatment. RNA was extracted and quality-controlled using the Agilent RNA 6000 Nano Kit. Samples with a RNA integrity number (RIN) higher than 6 were integrated into the transcriptomics study. cDNA was then obtained using the Superscript III First-Strand-Synthesis System for RT-PCR. Retino-induction of membranes was controlled by RAR $\beta$  RT-qPCR quantification. The cDNA was then hybridized on a Human genome 8X60K transcriptomics chip (Agilent, Santa Clara, CA) by a local lab (Hybrigenics, Saint-Beauzire, France). Genes were classified according to fold change and biological pathway using the Genomatix<sup>®</sup> pathway system (GePS).

## **2.5 Scratch assay experiments**

Primary amniocytes were grown to 100% confluence on 4-well collagen I-coated plates and a wound was made using a pipette tip to scratch the cell layer. The cells were then treated with either atRA (1  $\mu$ M) or DMSO (as atRA vehicle) in equal quantity, with atRA (1  $\mu$ M) and  $\beta$ APN (500  $\mu$ M) or with DMSO and  $\beta$ APN (500  $\mu$ M). Treatments were repeated at 24 h. The wounds were photographed at 24 h and 48 h under microscope using a 100x objective. Wound areas were measured using ImageJ software and normalized to initial area (t0). The experiment was repeated four times (four independent areas per scratch were quantified).

## **2.6 Cell proliferation assay**

At the end of a scratch assay experiment, cell proliferation was assessed using the 5-bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche, Lyon, France) with BrdU labeled as per manufacturer's protocol. Briefly, cells were incubated for 45 min in a BrdU solution (10  $\mu$ M), washed three times in PBS, then fixed in an ethanol solution (ethanol 70% in 50 mM glycine, pH=2) for 20 min at -20°C. Cells were then incubated for 1 h with an anti-BrdU antibody (1/25) and a further 1 h with an anti-mouse-Ig-alkaline phosphatase (1/25) enabling



colorimetric detection of BrDU after addition of the substrate. Primary amniocytes were photographed under a light microscope with a 100x objective, and proliferation was expressed as ratio of BrDU-positive cells to total cell number. This experiment was repeated three times (four independent areas per scratch were quantified).

## **2.7 Cell migration assay**

Cell migration assays were performed on primary amniotic epithelial cells after a scratch assay experiment (48 h) using the CytoSelect™ 24-Well Cell migration assay (8 µm, Fluorometric format) (Biolabs, London, England). Cells were placed in suspension in the upper chamber in a serum-free media containing the same treatments as for the scratch assay experiments (atRA, DMSO, atRA + βAPN and DMSO + βAPN). A chemoattractant media (complete media) was added below the insert, allowing migratory cells to pass through the polycarbonate membrane. After a 24 h incubation (37°C), these cells were collected using a detachment solution, stained with CyQuant® GR Dye (Life Technologies, Carlsbad, CA), and quantified by measuring fluorescence at 480nm/520nm. The experiment was repeated three times (each condition in duplicate).

## **2.8 RT-PCR and quantitative RT-PCR**

Total RNA was extracted from human amnion with the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit and primary amniocytes with the RNeasyMini Kit, both from QIAGEN (Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed from 1 µg of RNA using a Superscript III First-Strand-Synthesis System for RT-PCR. LOX expression in amnion and primary amniocytes was assessed by RT-PCR using a TAQ DNA polymerase. RARβ and LOXL4 induction by atRA were assessed at transcriptomic level by quantitative RT-PCR performed using sensifast™SYBR (Bioline, Paris France) and LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Lyon, France). Transcript quantification was carried out three times on at least 4 independent experiments. Results were normalized to the housekeeping genes (acidic ribosomal phosphoprotein P0; RPLP0 and ribosomal protein S17; RPS17). The primer sequences are detailed in Table 1. All the steps followed the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009).

## **2.9 LOXL4 Immunocytochemistry**

Primary amniotic epithelial cells were grown on a collagen I-coated coverslip and treated with atRA or DMSO for 48 h, then fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min and incubated overnight with a rabbit polyclonal anti-LOXL4 antibody (ab88186; Abcam) diluted in a permeabilization buffer (1/200). After three washes in this buffer, the cells were incubated for 2 h with a donkey anti-rabbit antibody conjugated with cyanine 3 (Jackson).





Then, nuclei were stained with Hoechst (bisBenzimide H 33258) (Sigma-Aldrich, Lyon) (1/10000) for 10 min and coverslips were placed over the microscope slides after three more washes in PBS. Slides were observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot) and the images were analyzed using ImageJ software. This experiment was repeated four times (six independent areas per slide were quantified). The experiments conducted to test the epithelial-mesenchymal transition were conducted as described above using the following primary antibodies: a rat monoclonal anti-E-cadherin (13-1900; ThermoFisher), a mouse monoclonal anti-cytokeratin 18 (MAB7619; R&D systems) and a mouse monoclonal anti-vimentin (090M4817; Sigma-Aldrich). Anti-rat (A21208; Life Technology) and anti-mouse (A21202; Life Technology) antibodies conjugated with Alexa488 were used as secondary antibodies.

### **2.10 LOXL4 depletion in the scratch assay experiments**

A wound was made on primary amniocytes and the cells were treated with atRA or DMSO and transfected with either a siRNA raised against LOXL4 (SI00142450) or a non-specific siRNA (scramble siRNA; SI03650318; both from QIAGEN, Hilden, Germany) using lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX reagent as per the manufacturer's protocol. Media was changed after 24 h of incubation, and the treatment (atRA or DMSO) was repeated for a further 24 h. Scratch area was photographed at 24 h and 48 h, and percentage of wound healing was calculated as previously described. LOXL4 siRNA efficiency was tested by qRT-PCR of LOXL4. This experiment was repeated 4 times, quantifications were realized on 4 independent areas per condition.

### **2.11 LOXL4 promoter study**

Two sequences each comprising the DR5 contained in the first 10000 bases of the LOXL4 promoter were cloned into firefly luciferase reporter plasmid pGL3b (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). These sequences were obtained by PCR using a BAC (RPCI-11 HS; Life Technologies). Mutagenesis was performed on these two constructs using primers each containing DR5 with 4 bases mutated in the core sequence (see Table 1 and Figure 5). Amnion-derived epithelial cell lines WISH and AV3 were grown at 70% confluence in 6-well plates and transfected with 1 µg of the pGL3b constructs described above, 0.5 µg human RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  expression plasmid and 0.05 µg pRL-tk vector expressing Renilla luciferase, enabling results to be normalized to transfection efficiency. Transfections were run using 3.7 5µL of Lipofectamine 3000 and 5 µl of Reagent 3000 per well. Cells were treated with atRA or DMSO at 6 h post-transfection for 48 h (treatment was repeated after 24 h). Luciferase expression was then measured using the Dual-Luciferase<sup>®</sup> reporter assay system (Promega) as per the manufacturer's protocol. This experiment was repeated three times (each condition in duplicate).



## **2.12 Statistical analysis**

Data expressed as means  $\pm$  SDs are an average of duplicates or triplicates of at least three independent experiments. Comparison of means was performed by a nonparametric *t*-test (Mann-Whitney) or ANOVA (Kruskal-Xallis) on GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc.). For all studies, significance thresholds are flagged as follows: \* for  $p < 0.05$ ; \*\* for  $p < 0.01$ ; \*\*\* for  $p < 0.001$ .

## **3. RESULTS**

### **3.1 AtRA promotes wound healing by inducing primary amniotic epithelial cell migration**

Scratch assay experiments on primary amniocytes treated with atRA or DMSO (vehicle) showed a strong reduction of wound area in the atRA condition compared to DMSO, by 60% and 90% at 24 and 48 h of treatment, respectively (Fig. 1a). Without promoting cell proliferation (Fig. 1b), the pro-healing properties of atRA after 48 h of treatment come mainly from the ~90% increase in cell migration, as shown in Figure 1c. Finally, the epithelial characteristic of primary amniocytes after atRA treatment was assessed by immunocytochemistry labeling of two epithelial markers: cytokeratin 18 and E-cadherin, which reveal no significant difference between atRA and control (DMSO). Vimentin (mesenchymal marker) labeling was negative in both conditions of treatment, confirming that atRA doesn't induce epithelia-mesenchymal transition of primary amniocytes (Fig. 1d).

### **3.2 Transcriptomics study of atRA effects on human fetal membranes.**

Global effects of atRA on gene regulation in human fetal membranes were assessed by a large-scale transcriptomic analysis performed on amnion, chorion and primary amniocytes. To lend the analysis of atRA influence greater power, analysis was focused on genes giving a  $p$ -value  $< 0.01$  and a  $|\log_{2}FC| > 1.2$ . Even with this restriction, numerous genes were found to be regulated by atRA in the amnion (144) and primary amniocytes ( $n=67$ ) whereas only 2 genes were found in the chorion (Fig. 2a and supplementary tables S1, S2 and S3). Classifying these genes according to their physiological functions (using Genomatix<sup>®</sup> software) underlined the involvement of atRA in numerous different pathways, including some directly tied to the wound healing process, such as ECM dynamics and cell migration (Fig. 2b).

### **3.3 Lysyl oxidases are involved in the pro-healing properties of atRA on primary amniocytes.**

Beyond the genes coming from the transcriptomics study, LOXL4, a member of the LOX family of important enzymes for ECM dynamics, was strongly induced by atRA treatment both in amnion and primary



amniocytes (Fig. 3a). Even if the expression of all the 5 members of this family was demonstrated by RT-PCR in amnion and primary amniocytes (Fig. 3b), only LOXL4 expression was modulated by atRA in amniotic environment and not in chorionic one (data not shown). Then, scratch assays showed that treating primary amniocytes with atRA or DMSO in combination with a lysyl oxidase activity inhibitor ( $\beta$ APN; Fig. 3c) drastically decreased the pro-healing action of atRA. This effect was then checked on atRA-induced migration and proliferation. These assays again demonstrated no change in cell proliferation (Fig. 3d, upper panel) adding  $\beta$ APN (the LOX inhibitor) clearly affected the above- demonstrated action of atRA on cell migration (Fig. 3d, lower panel).

### **3.4 LOXL4 induction by atRA at transcriptional and protein level is essential for the pro-healing properties of atRA.**

Based on our transcriptomic studies, the retino-induction of treated primary amniotic epithelial cells and amnion explants was studied kinetically by RT-qPCR using RAR $\beta$  as a positive control of the atRA treatments, as RAR $\beta$  is a well-known atRA-induced gene (Fig. 4a, at left, upper panel). These LOXL4 retino-induction experiments on primary amniotic epithelial cells and amnion explants confirmed the induction obtained in the transcriptomic analysis at 24 h of treatment, and showed an early induction of LOXL4 (from 6 h of treatment on primary amniocytes that remained unaltered by cycloheximide treatment, thus confirming a direct induction, data not shown) and an accumulation of the transcripts (up to 48 h; Fig. 4a, left part, lower panel). This accumulation of LOXL4 proteins was then confirmed by immunocytochemistry on primary amniocytes treated with atRA or DMSO for 48 h (Fig. 4a, at right). Finally, the specific involvement of LOXL4 in the wound healing process was assessed by scratch assay experiments on primary amniotic epithelial cells using siRNA specifically raised against LOXL4. After checking LOXL4 extinction (by RT-qPCR and immunocytochemistry, Fig. 4b, left and right panels, respectively), the results obtained demonstrate that the pro-healing properties of atRA were inhibited (at 24 and 48 h) when cells were transfected with siRNA specifically targeting LOXL4 (Fig. 4c).

### **3.5 One DR5 site located in the LOXL4 promoter is essential for its transcriptional regulation by atRA.**

Potential regulatory sequences involved in the induction of LOXL4 gene by atRA were identified by *in silico* screening using the V\$RXRF matrix bundled with Genomatix<sup>®</sup> software. Two hypothetical DR5-type retinoic acid-responsive elements were found in the LOXL4 promoter between -10000 and +1 bases (Fig. 5a).



Experiments conducted in both amniotic AV3 and WISH cell lines demonstrated that atRA treatment (24h) induced luciferase reporter gene expression when the wild-type DR5-1 construct was transfected, whereas plasmid constructs containing the mutated DR5-1 no longer responded to atRA treatment. However, DR5-2, which is the most distant from the transcription start site, was not involved in the atRA-driven LOXL4 regulation in the amniocyte environment (Fig. 5b).

#### **4. DISCUSSION**

Here we propose atRA, the main active metabolite of vitamin A, as a promising candidate adjuvant for better clinical management of iPPROM, for example as collagen plug additive. We show that the pro-migratory effect of atRA on primary amniotic epithelial cells, leads up to 90% improvement in healing compared to DMSO vehicle, without any effects on epithelia-mesenchymal transition, whereas atRA is known to induce cell differentiation. Furthermore, we demonstrate that these effects are mediated, in part, by both transcriptional induction (using one DR5 motif) and protein-level induction of the LOXL4 gene which is one of the lysyl oxidases. iPPROM is the major complication of fetal surgery (Beck et al., 2012) and remains difficult to treat. Fetoscopy can compromise fetal membrane integrity as it leaves a puncture hole that remains open without any signs of healing process (Devlieger et al, 2006; Devlieger et al, 2000). Several strategies to prevent iPPROM after a microsurgical defect have been tested, and one of the most promising approaches is to end the fetoscopy by fitting the needle with a plug and placing it inside the gap to seal the membranes (Luks et al., 1991). However, if used alone as an inert substance, collagen plugs do not restore fetal membrane integrity, as seen in a histological study on the rabbit model (Gratacos et al., 2000) and in clinical experience that also finds poor efficacy (Papanna et al., 2010b; Engels et al., 2014).

Numerous studies have tested solutions to improve the plug's wound healing properties by adding various substances (Engels et al., 2013; Liekens et al., 2008) or testing other matrix compositions (Kivelio et al., 2013). One such approach involved doping the collagen plug with amnion cells before using it to seal membrane defects (Papadopoulos et al., 2010), and found that the amniotic cells showed good survival in the collagen matrix and improved the efficacy of the plug in a rabbit model. As amniotic cells are vital to wound healing, our results support a new approach to improve plug efficacy by using atRA, to facilitate at term a hermetic closure of the defect.

Retinoids are already widely used in the clinical treatment of many diseases and disorders ranging from ocular burn, acne, psoriasis and photo-aging to cancer and acute promyelocytic leukemia. However, they may not be safe for use during pregnancy, particularly during the first trimester (Sulik et al., 1995) where tragic





outcomes have been reported in pregnant women treated with accutane (13-cis retinoic acid) (Centers for Disease Control., 1984). Note however that retinoid toxicity is highly gestation stage-dependent, to the point that retinoid can be used during the second and third trimester of pregnancy for the treatment of acute promyelocytic leukemia (Yang and Hladnik, 2009). Note that given this evidence and the natural wariness of patients, we only propose using atRA in the placental sphere after fetoscopy. Such microinvasive surgical procedures are classically indicated for diagnosis or treatment from the 19<sup>th</sup> week of gestation to the end of pregnancy, avoiding *ipso facto* the related risk of retinoid toxicity during pregnancy. Moreover, in our conception of the strategy, atRA would only be administrated locally, either directly into the plug or by seeding the plug with atRA-pre-treated amniotic cells, and only as a one-time bolus delivered at the end of fetoscopy.

The results obtained here are ultimately grounded in our transcriptomic analysis of the action of atRA on fetal membranes. The long list of target genes obtained on amnion explants and primary amniocytes was ample evidence that cellular pathways like ECM dynamics, cell migration and wound healing are directly linked to the pro-healing properties of atRA and strongly involved in amniotic response to active metabolites of vitamin A. We then refocused our analysis ECM dynamics, as several studies have already demonstrated that the retinoids pathway is involved in ECM structure (see (Barber et al., 2014) for review). Vitamin A deficiency in animal models leads to various anatomical and histological defects due to altered ECM composition. For example, renal function is affected in rats fed a vitamin A-deficient diet due to modifications of the kidney basement membrane, including an increase of collagen IV production and a decrease of MMP2 and MMP9, altering the matrix production/matrix degradation balance (Marín et al., 2005). Vitamin A deficiency also alters the liver ECM matrix (Aguilar et al., 2009) and respiratory function, where a thickening of the alveolar basement membranes and disorganization of the collagen network have been observed (Esteban-Pretel et al., 2010). Nevertheless, the molecular mechanisms mobilized by vitamin A to regulate ECM structure remain unclear. *In vitro* studies have highlighted direct transcriptional regulation of ECM proteins and proteinases by retinoic acids (i.e. downregulation of collagen I chains (Wang et al., 2002), MMP1 (Pan et al., 1995) and TGF- $\beta$ 1 (Glick et al., 1991) as well as upregulation of laminin (Matsui, 1996) or PLAT (Borel et al., 2010)), leading to a global imbalance in ECM production.

Here, we found clear evidence that the positive effect of atRA on wound healing at least partly requires the induction of LOXL4, a gene involved in ECM biogenesis and dynamics. By focusing on amniotic involvements of lysyl oxidases, we found a novel function for these proteins in the “placental environment”. Although relevant literature is scarce, a recent paper identified LOX, LOXL1, LOXL2 as negative regulators of



trophoblastic cell invasion. Interestingly, all three are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , which is another type of nuclear receptor (Segond et al., 2013). LOX expression is also reported to be altered in preterm prelabor rupture of fetal membranes (Poletini et al., 2016). Lysyl oxidases are key enzymes in extracellular matrix remodeling through their activity on collagen reticulation, and their importance has already well been demonstrated by KO studies on mice models (Mäki et al., 2002; Liu et al., 2004) and by the fact that several pathologies are associated with disrupted LOX expression (Kuivaniemi et al., 1985; Dudakova et al., 2012; Desmoulière et al., 1997). Moreover, their role in cell migration has also been highlighted by *in vitro* studies on vascular (Li et al., 2000) and fibroblast cells (Nelson et al., 1988). However, despite these lines of evidence, the results found here for LOXL4 are only a first step toward a full understanding of the paths mobilized by vitamin A to promote wound healing. We anticipate our transcriptomics study to be starting point toward a deeper understanding of how vitamin A promotes wound healing and how its active metabolite can find novel applications in clinical practice.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

English language editing was done by ATT (Auvergne Traduction Technique et Scientifique), Clermont-Ferrand.

#### **FUNDINGS**

This work was supported by an MENSUR grant.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

MR, AC, CB, DB and GC conducted experiments and acquired data.

MR, AC, CB, FP, VS, DG and LB analyzed and interpreted data.

MR, VS and LB wrote the manuscript

DG, VS and LB designed research studies and approved the final version of the manuscript



## **REFERENCES**

- Abdelmalek, M., Spencer, J., 2006. Retinoids and wound healing. *Dermatol. Surg.* 32, 1219-1230.
- Aguilar, R.P., Genta, S., Oliveros, L., Anzulovich, A., Giménez, M.S., Sánchez, S.S., 2009. Vitamin A deficiency injures liver parenchyma and alters the expression of hepatic extracellular matrix. *J. Appl. Toxicol.* 29, 214-222.
- Arechavaleta-Velasco, F., Marciano, D., Diaz-Cueto, L., Parry, S., 2004. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 843-850.
- Barber, T., Esteban-Pretel, G., Marín, M.P., Timoneda, J., 2014. Vitamin A deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients.* 10, 4984-5017.
- Beck, V., Lewi, P., Gucciardo, L., Devlieger, R., 2012. Preterm prelabor rupture of membranes and fetal survival after minimally invasive fetal surgery: a systematic review of the literature. *Fetal. Diagn. Ther.* 31, 1-9.
- Bendon, R.W., Faye-Petersen, O., Pavlova, Z., Qureshi, F., Mercer, B., Miodovnik, M., Das, A.F., Meis, P.J., Moawad, A.H., Iams, J.D, McNellis D., 1999. Fetal membrane histology in preterm premature rupture of membranes: comparison to controls, and between antibiotic and placebo treatment. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2, 552-558.
- Blanchon, L., Marceau, G., Borel, V., Prat, C., Herbet, A., Bouvier, D., Gallot, D., Sapin, V., 2011. Implications of retinoid pathway in human fetal membranes: study of target genes. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 39, 370-372.
- Blanchon, L., Accoceberry, M., Belville, C., Delabaere, A., Prat, C., Lemery, D., Sapin, V., Gallot, D., 2013. Rupture of membranes: pathophysiology, diagnosis, consequences and management. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 42, 105-116.
- Borel, V., Marceau, G., Gallot, D., Blanchon, L., Sapin, V., 2010. Retinoids regulate human amniotic tissue-type plasminogen activator gene by a two-step mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1793-1805.
- Bryant-Greenwood, G.D., 1998. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta.* 19, 1-11.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Casey, M.L., MacDonald, P.C., 1997. Lysyl oxidase (ras recession gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 167-172.
- Caughey, A.B., Robinson, J.N., Norwitz E.R., 2008. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Rev. Obstet. Gynecol.* 1, 11-22.
- Centers for Disease Control., 1984. Isotretinoin - a newly recognized human teratogen. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 33, 171-173.
- Dadvand, P., Basagaña, X., Figueras, F., Martinez, D., Beelen, R., Cirach, M., de Nazelle, A., Hoek, G., Ostro, B., Nieuwenhuijsen, M.J., 2013. Air pollution and preterm premature rupture of membranes: a spatiotemporal analysis. *Am. J. Epidemiol.* 179, 200-207.
- Denison, F.C., Kelly, R.W., Calder, A.A., Riley, S.C., 1998. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum. Reprod.* 13, 3560-3565.
- Desmoulière, A., Darby, I., Costa, A.M., Raccurt, M., Tuchweber, B., Sommer, P., Gabbiani, G., 1997. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Investn.* 76, 765-778.



- Devlieger, R., Gratacós, E., Wu, J., Verbist, L., Pijnenborg, R., Deprest, J.A., 2000. An organ-culture for in vitro evaluation of fetal membrane healing capacity. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92, 145-150.
- Devlieger, R., Millar, L.K., Bryant-Greenwood, G., Lewi, L., Deprest, J.A., 2006. Fetal membrane healing after spontaneous and iatrogenic membrane rupture: A review of current evidence. *J. Obstet. Gynecol.* 195, 1512-1520.
- Dudakova, L., Liskova, P., Trojek, T., Palos, M., Kalasova, S., Jirsova, K., 2012. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. *Exp. Eye. Res.* 104, 74-81.
- El Khwad, M., Stetzer, B., Moore, R., Kumar, D., Mercer, B., Arikat, S., Redline, R.W., Mansour, J.M., Moore, J.J., 2005. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol. Reprod.* 72, 720-726.
- Engels, A.C., Hoylaerts, M.F., Endo, M., Luyen, S., Verbist, G., Manodoro, S., DeKoninck, P., Richter, J., Deprest, J.A., 2013. In vitro sealing of iatrogenic fetal membrane defects by a collagen plug imbued with fibrinogen and plasma. *Prenat. Diagn.* 32, 1-6.
- Engels, A.C., Van Calster, B., Richter, J., DeKoninck, P., Lewi, L., De Catte, L., Devlieger, R., Deprest, J.A., 2014. Collagen plug sealing of iatrogenic fetal membrane defects after fetoscopic surgery for congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* 43, 54-59.
- England, M.C., Benjamin, A., Abenhaim, H.A., 2013. Increased risk of preterm premature rupture of membranes at early gestational ages among maternal cigarette smokers. *Am. J. Perinatol.* 30, 821-826.
- Esteban-Pretel, G., Marín, M.P., Renau-Piqueras, J., Barber, T., Timoneda, J., 2010. Vitamin A deficiency alters rat lung alveolar basement membrane: reversibility by retinoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 21, 227-236.
- Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J., 1996. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 379, 335-339.
- Glick, A.B., McCune, B.K., Abdulkarem, N., Flanders, K.C., Lumadue, J.A., Smith, J.M., Sporn, M.B., 1991. Complex regulation of TGF $\beta$  expression by retinoic acid in the vitamin A-deficient rat. *Development.* 111, 1081-1086.
- Gratacos, E., Wu, J., Yesildaglar, N., Devlieger, R., Pijnenborg, R., Deprest, J.A., 2000. Successful sealing of fetoscopic access sites with collagen plugs in the rabbit model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 142-146.
- Gratacós, E., Sanin-Blair, J., Lewi, L., Toran, N., Verbist, G., Cabero, L., Deprest, J., 2006. A histological study of fetoscopic membrane defects to document membrane healing. *Placenta.* 27, 452-456.
- Hadley, C.B., Main, D.M., Gabbe, S.G., 1990. Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am. J. Perinatol.* 7, 374-379.
- Hattori, M., Shimizu, K., Katsumura, K., Oku, H., Sano, Y., Matsumoto, K., Yamaguchi, Y., Ikeda, T., 2012. Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250, 557-563.
- Hein, S., Yamamoto, S.Y., Okazaki, K., Jourdan-LeSaux, C., Csizsar, K., Bryant-Greenwood, G.D., 2001. Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta.* 22, 49-57.
- Johansen, S., Heegaard, S., Prause, J.U., Rask-Pedersen, E., 1998. The healing effect of all-trans retinoic acid on epithelial corneal abrasions in rabbits. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 4, 401-404.
- Kagan, H.M., Reddy, V.B., Narasimhan, N., Csizsar, K., 1995. Catalytic properties and structural components of LO. *Ciba. Found. Symp.* 192, 100-115.
- Kivelio, A., Dekoninck, P., Perrini, M., Brubaker, C.E., Messersmith, P.B., Mazza, E., Deprest, J., Zimmermann, R., Ehrbar, M., Ochsenbein-Koelble, N., 2013. Mussel mimetic tissue adhesive for fetal membrane repair: initial in vivo investigation in rabbits. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 171, 240-245.





- Kuivaniemi, H., Peltonen, L., Kivirikko, K.I., 1985. Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 798-808.
- Kumar, D., Fung, W., Moore, R., Pandey, V., Fox, J., Stetzer, B., Mansour, J.M., Mercer, B.M., Redline, R.W., Moore, J.J., 2006. Proinflammatory cytokines found in amniotic fluid induce collagen remodeling, apoptosis, and biophysical weakening of cultured human fetal membranes. *Biol. Reprod.* 74, 29-34.
- Lee, K.H., Tong, T.G., 1970. Mechanism of action of retinyl compounds on wound healing. *J. Pharm. Sci.* 59, 1195.
- Li, W., Liu, G., Chou, I.N., Kagan, H.M., 2000. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem.* 78, 550-557.
- Liekens, D., Lewi, L., Jani, J., Heyns, L., Poliard, E., Verbist, G., Ochsenein, N., Hoylaerts, M., Deprest, J., 2008. Enrichment of collagen plugs with platelets and amniotic fluid cells increases cell proliferation in sealed iatrogenic membrane defects in the fetal rabbit model. *Prenat. Diagn.* 28, 503-507.
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J.A., Yanagisawa, H., Zuo, J., Li, T., 2004. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* 36, 178-182.
- Luks, F.I., Deprest, J.A., Peers, K.H., Steegers, E.A., van Der Wildt, B., 1999. Gelatin sponge plug to seal fetoscopy port sites: technique in ovine and primate models. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181, 995-996.
- Mäki, J.M., Räsänen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Mäkikallio, K., Kivirikko, K.I., Soininen, R., 2002. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation.* 106, 2503-2509.
- Mäki, J.M., 2009. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol.Histopathol.* 24, 651-660.
- Mallik, A.S., Fichter, M.A., Rieder, S., Bilic, G., Stergioula, S., Henke, J., Schneider, K.T., Kurmanavicius, J., Biemer, E., Zimmermann, R., Zisch, A.H., Papadopoulos, N.A., 2007. Fetoscopic closure of punctured fetal membranes with acellular human amnion plugs in a rabbit model. *Obstet. Gynecol.* 110, 1121-1129.
- Marceau, G., Gallot, D., Borel, V., Lémery, D., Dastugue, B., Dechelotte, P., Sapin, V., 2006. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1207-1216.
- Marín, M.P., Esteban-Pretel, G., Alonso, R., Sado, Y., Barber, T., Renau-Piqueras, J., Timoneda, J., 2005. Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *J. Nutr.* 135, 695-701.
- Matsui, T., 1996. Differential activation of the murine laminin B1 gene promoter by  $RAR\alpha$ ,  $ROR\alpha$ , and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 405-410.
- Méhats, C., Schmitz, T., Marcellin, L., Breuiller-Fouché, M., 2011. Biochemistry of fetal membranes rupture. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 39, 365-9.
- Molnar, J., Fong, K.S., He, Q.P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S.F., Fogelgren, B., Szauter, K.M., Mink, M., Csiszar, K., 2003. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 11;1647, 220-224.
- Moore, R.M., Mansour, J.M., Redline, R.W., Mercer, B.M., Moore, J.J., 2006. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta.* 27, 1037-1051.
- Moutquin, J.M., 2003. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG.* 20, 30-33.
- Nelson, J.M., Diegelmann, R.F., Cohen, I.K., 1988. Effect of beta-aminopropionitrile and ascorbate on fibroblast migration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188, 346-345.



- Pan, L., Eckhoff, C., Binckerhoff, C.E., 1995. Suppression of collagenase gene expression by all-trans and 9-cis retinoic acid is ligand dependent and requires both RARs and RXRs. *J. Cell. Biochem.* 57, 575-589.
- Papadopoulos, N.A., Kyriakidis, D.I., Schillinger, U., Totis, A., Henke, J., Kovacs, L., Horch, R.E., Schneider, K.T., Machens, H.G., Biemer, E., 2010. Successful anatomic repair of fetoscopic access sites in the mid-gestational rabbit model using amnion cell engineering. *In vivo.* 24, 745-750.
- Papanna, R., Mann, L.K., Johnson, A., Sangi-Haghpeykar, H., Moise, K.J., 2010a. Chorioamnion separation as a risk for preterm premature rupture of membranes after laser therapy for twin-twin transfusion syndrome. *Jr. Obstet. Gynecol.* 115, 771-776.
- Papanna, R., Molina, S., Moise, K.Y., Moise, K.J. Jr., Johnson, A., 2010b. Chorioamnion plugging and the risk of preterm premature rupture of membranes after laser surgery in twin-twin transfusion syndrome. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* 35, 337-343.
- Parry, S., Strauss, J.F., 1998. Premature rupture of the fetal membranes. *N. Engl. J. Med.* 338, 663-670.
- Polettini, J., Silva, M.G., Kacerovsky, M., Syed, T.A., Saade, G.R., Menon, R., 2016. Screening of lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase like (LOXL) enzyme expression and activity in preterm prelabor rupture of fetal membranes. *J. Perinat. Med.* 44, 99-109.
- Prat, C., Blanchon, L., Borel, V., Gallot, D., Herbet, A., Bouvier, D., Marceau, G., Sapin, V., 2012. Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biol. Reprod.* 86, 48.
- Prat, C., Bouvier, D., Comptour, A., Marceau, G., Belville, C., Clairefond, G., Blanc, P., Gallot, D., Blanchon, L., Sapin, V., 2015. All-trans-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment. *Placenta.* 36, 881-7.
- Riley, S.C., Leask, R., Denison, F.C., Wisely, K., Calder, A.A., Howe, D.C., 1999. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. *J. Endocrinol.* 162, 351-9.
- Segond, N., Degrelle, S.A., Berndt, S., Clouqueur, E., Rouault, C., Saubamea, B., Dessen, P., Fong, K.S., Csiszar, K., Badet, J., Evain-Brion, D., Fournier, T., 2013. Transcriptome analysis of PPAR $\gamma$  target genes reveals the involvement of lysyl oxidase in human placental cytotrophoblast invasion. *PLoS One.* 8, e79413.
- Simhan, H.N., Canavan, T.P., 2005. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. *BJOG.* 1, 32-37.
- Smith-Mungo, L.I., Kagan, H.M., 1998. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix. Biol.* 16, 387-398.
- Strauss, J.F., 2013. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod. Sci.* 20, 140-153.
- Sulik, K.K., Dehart, D.B., Rogers, J.M., Chernoff, N., 1995. Teratogenicity of low doses of all-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. *Teratology.* 51, 398-403.
- Thielitz, A., Gollnick, H., 2008. Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. *Am. J. Clin. Dermatol.* 6, 369-381.
- Vadillo-Ortega, F., Gonzalez-Avila, G., Furth, E., Lei, H., Muschel, R., Stetler-Stevenson, W., Strauss, J.F. 3<sup>rd</sup>, 1995. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am. J. Pathol.* 146, 148-156.
- Wang, L., Tankersley, L.R., Tang, M., Potter, J.J. & Mezey, E., 2002. Regulation of the murine  $\alpha$ 2(I) collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors. *Arch. Biochem. Biophys.* 401, 262-270.
- Yang, D., Hladnik, L., 2009. Treatment of acute promyelocytic leukemia during pregnancy. *Pharmacotherapy.* 29, 709-724.



## **FIGURES CAPTIONS**

### **Table 1** Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR, RT-qPCR, cloning and mutagenesis

Calculated values of optimal hybridization temperature  $T_m$  (°C) and the predictive length (base pairs/bp) are given.

### **Figure 1** AtRA promotes wound healing by inducing cell migration in primary primary amniocytes

Representative photographs of the scratch assay experiments performed on primary amniocytes (n=4, and 4 areas per condition were quantified) treated with atRA or DMSO (vehicle) (a, left panel). Wound areas were measured, normalized to t=0, and then ratioed to the DMSO condition (a, right panel). Cell proliferation assays were performed at the end of the scratch assay experiments (48 h) using BrDU labeling (n=3, and 4 areas per condition were quantified). Results were normalized to the DMSO condition (b). Cell migration assays were performed at the end of the scratch assay experiments (48 h) (n=3, each condition in duplicate). Representative photographs of non-migratory cells were taken on the top of the insert at the end of the experiment (c, left panel). Results were normalized to the DMSO condition (c, right panel). The epithelial characteristic of primary amniocytes was checked by immunocytochemistry labeling of two epithelial markers (cytokeratin 18 and E-cadherin) and a mesenchymal marker (vimentin) after 48h of treatment with atRA or DMSO ; NC representing the negative control (without the primary antibody) (d). Statistical test: Mann-Whitney. \*\*\*:  $p < 0.001$ , ns: non-significant.

### **Figure 2** Transcriptomic analyses of atRA effects on human fetal membranes

Transcriptomic analysis was performed on amnion and chorion explants and primary amniocytes treated with atRA or its vehicle (DMSO) for 24 h (n=12). Volcano plots of the results obtained for each condition (a). Red and blue dots represent each probe up- or down-regulated after applying a restriction to the fold change (FC). Only genes with a  $\log_{2}FC > 1.2$  for the atRA-induced genes (plotted in red) or with a  $\log_{2}FC < -1.2$  for the atRA-repressed genes (plotted in blue) were kept for further analysis. Numbers of genes up- or down-regulated are indicated on the top left and top right of each volcano plot. Cellular pathways identified as most meaningful after Genomatix<sup>®</sup> analysis of atRA-regulated genes in amnion and primary amniocytes are shown in (b). Numbers of genes belonging to these pathways are indicated in brackets.



**Figure 3** Lysyl oxidases induced by atRA in the transcriptomics study are involved in the pro-healing properties of vitamin A

LOXL4 is induced by atRA in primary amniocytes and in the amnion in the transcriptomics study (a). Other LOX-family members were expressed in amnion and primary amniocytes (NC: negative control) (b). Scratch assay experiments were performed on primary amniocytes treated either with DMSO or ATRA or with DMSO +  $\beta$ APN or ATRA +  $\beta$ APN. Wound areas were measured, normalized to t=0, then ratioed to the DMSO condition (n=4, and 4 distinct areas per scratch were photographed) (c). Effect of  $\beta$ APN on cell proliferation (n=3, and 4 areas per scratch were measured, upper panel) and cell migration after 48 h of atRA treatment was assessed using scratch assay experiments (n=4, lower panel) (d). All comparisons of means were performed using a Kruskal-Wallis test; \*\*\*: p<0.001, \*\*: p<0.01, \*: p<0.5, ns: non-significant.

**Figure 4** The pro-healing properties of atRA require LOXL4 induction by atRA at transcriptional and protein level

RT-qPCR confirmed atRA-induced LOXL4 and RAR $\beta$  (positive control) expression from 6 h to 48 h of treatment (a, left panel). LOXL4 induction, at protein level, was checked by immunocytochemistry on primary amniocytes treated during 48 h (a, right panel, red staining) (n=4). Comparison of means was performed by a Mann-Whitney test; \*\*\*: p<0.001, \*: p<0.5. Validation by RT-qPCR (left panel) and immunocytochemistry (b, right panel) of the extinction of LOXL4 by siRNA (n=4). Comparison of means was performed by a Mann-Whitney test; \*\*\*: p<0.001, \*\*: p<0.01, ns: non-significant. Scratch assay experiments were performed on primary amniocytes treated with atRA or DMSO and transfected either with a scramble or with siRNA raised against LOXL4. Wound areas were measured after 24 h and 48 h as described previously (n=4) (c). Comparison of means was performed by a Kruskal Wallis test; \*\*\*: p<0.001, \*\*: p<0.01, ns: non-significant.

**Figure 5** Regulation of LOXL4 by atRA

Schematic representation of the LOXL4 promoter from -1 to -10,000 bp. Potential retinoic acid-responsive DR5-type elements are highlighted in grey (Genomatix<sup>®</sup>). Partial sequences (wild-type or mutated) of the promoter containing the two DR5 cloned into the luciferase reporter plasmid are shown (a). Amnion-derived epithelial AV3 and WISH cells were treated for 48 h with atRA or DMSO and transfected with a firefly luciferase reporter plasmid containing each of the DR5 (wild-type or mutated). Cells were co-transfected with a control plasmid expressing the renilla luciferase, enabling us to normalize the results (n=3, each condition in duplicate) (b). Comparison of means was performed by a Mann-Whitney test; \*\*: p<0.01, \*: p<0.5, ns: non-significant.

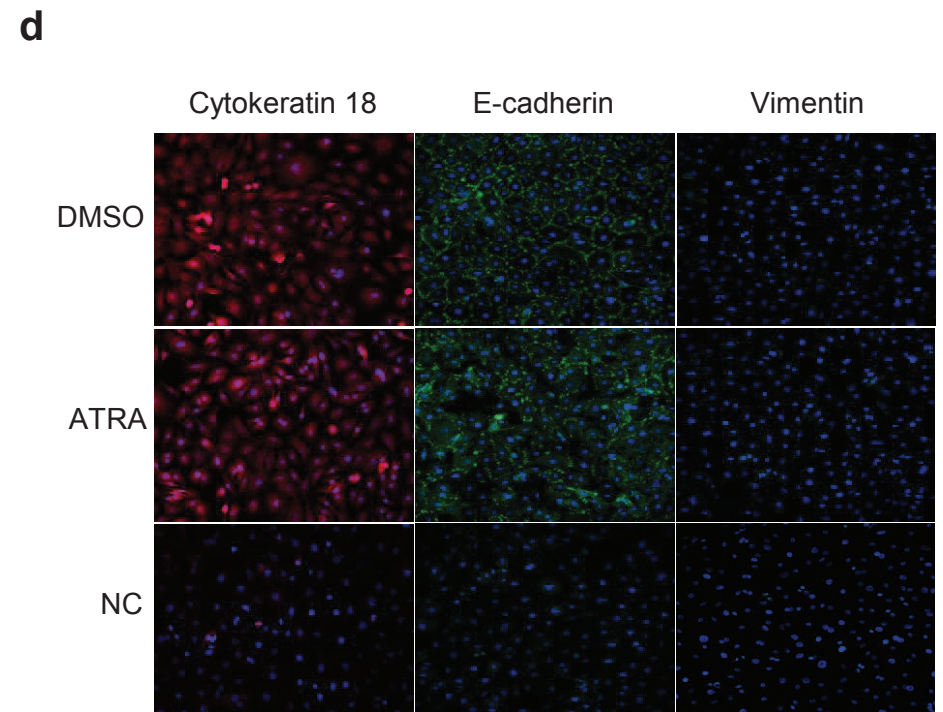
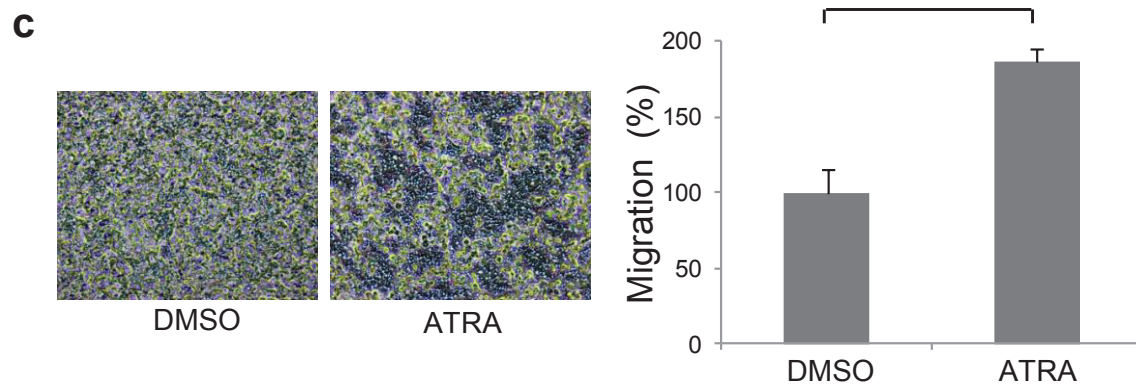
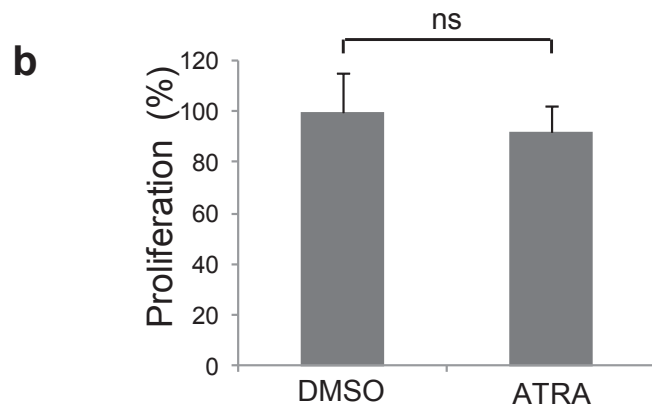
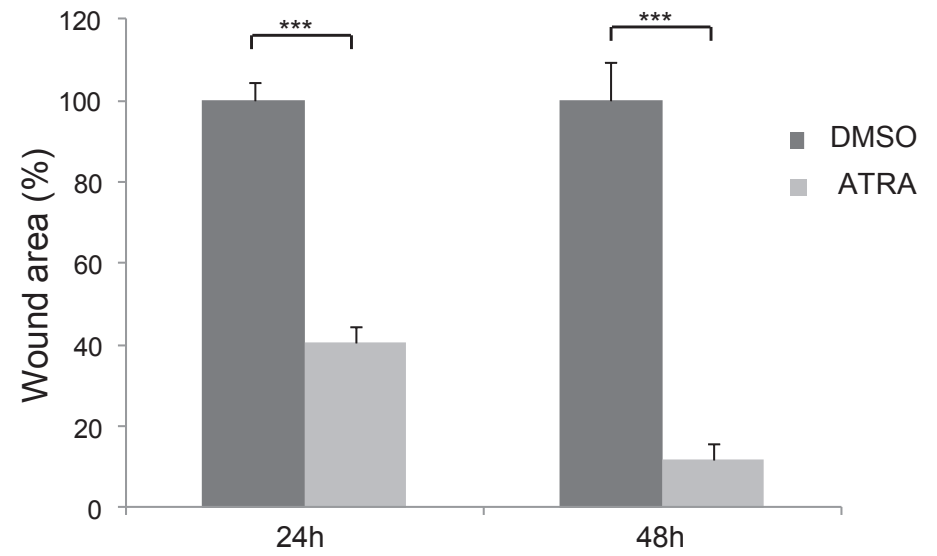
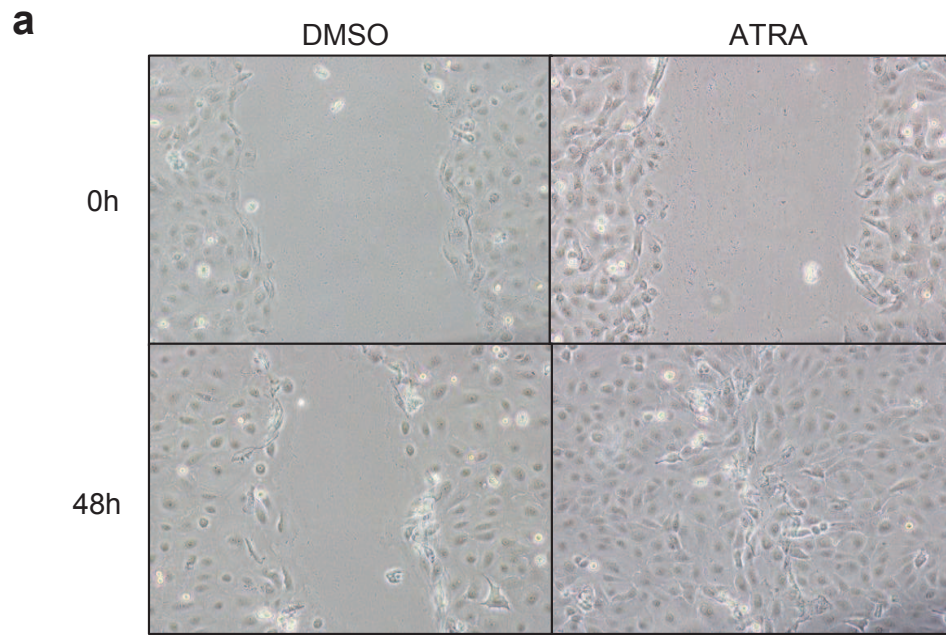




**Table 1**

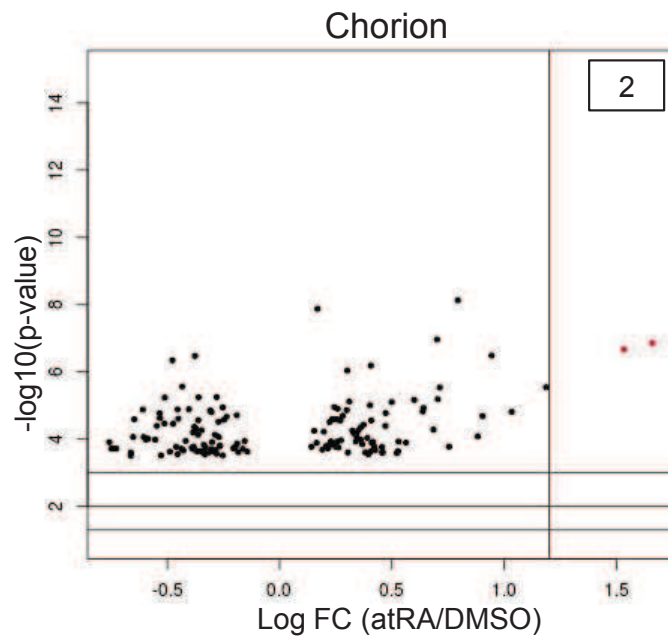
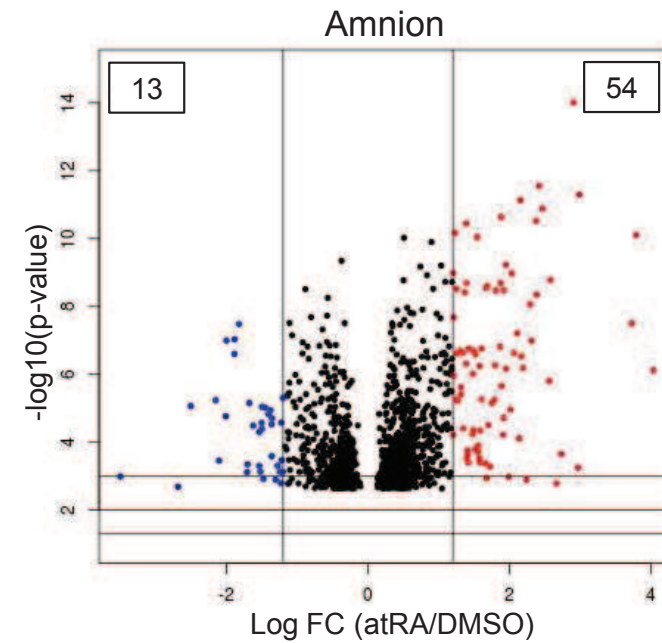
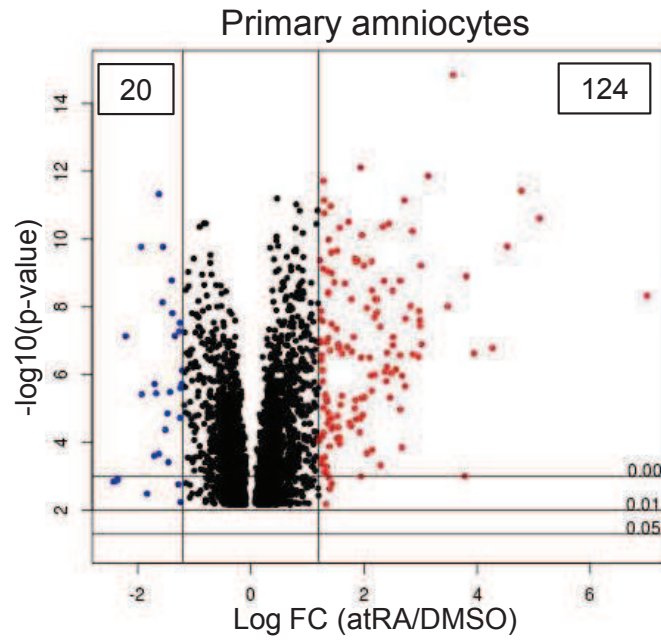
GENES	sequence (5'-3')		Product size (bp)	Accession n°
	Forward	Reverse		
human LOX	GATACGGCACTGGCTACTTCC	CTGGCCAGACAGTTTTCTCTCC	136	NM_002317.5
human LOXL1	AGCATCCACTTATGTGCAGAGA	GAGGAAGTCTGCTGTGCCCT	166	NM_005576.2
human LOXL2	CACTGCGGATCCCTGAAACC	CTGTCTCGGGCTGATGATCC	103	NM_002318.2
human LOXL3	CAGGCTGOCCACA TCCTCTG	ATCCTCATCGTGCGTACAGTC	189	NM_032603.3
human LOXL4	Commercial (QIAGEN)		146	NM_032211.6
human RAR $\beta$	ATGGATGTTCTGTCA GTGAG	CATAGTGGTACCCTGATGAT	268	NM_000965.4
human RPS17	TGCGAGGAGATGCCATTATC	AAGGCTGAGACCTCAGGAAC	169	NM_001021
human RPLP0	AGGCTTTAGGATCA CCACT	GCA GAGTTTCTCTGTGATA	219	NM_001002.3
human LOXL4 promoter DR5-1	GAGAGGTACCTCAGCATGAGAGGTGGCTGG	GAGAGCTAGCGGAGGCA GATGTGCAAGTAA G	351	
human LOXL4 promoter DR5-2	GAGAGGTACCCCGTGGCCCTGTCAA TTAC	GAGAGCTAGCTCACAACTTTCCA CTCTCGG	379	
human LOXL4 promoter mutant DR5-1	GGTGGGGCAGTATAACTGGGGGGA	TCCCCCA GTTATACTGCCCA CC		
human LOXL4 promoter mutant DR5-2	CCCA GGCATGTATAAGCCACAGGA	TCCTGTGGCTTATACATGCCTGGG		



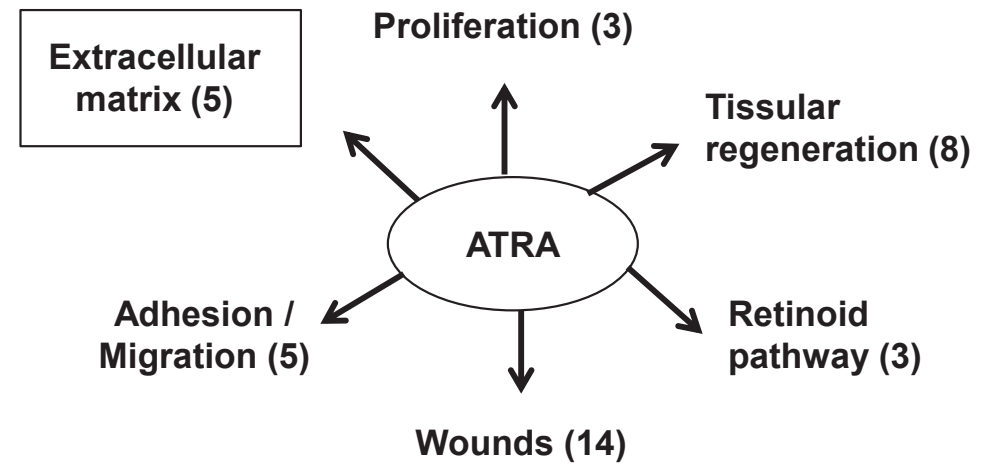




**a**



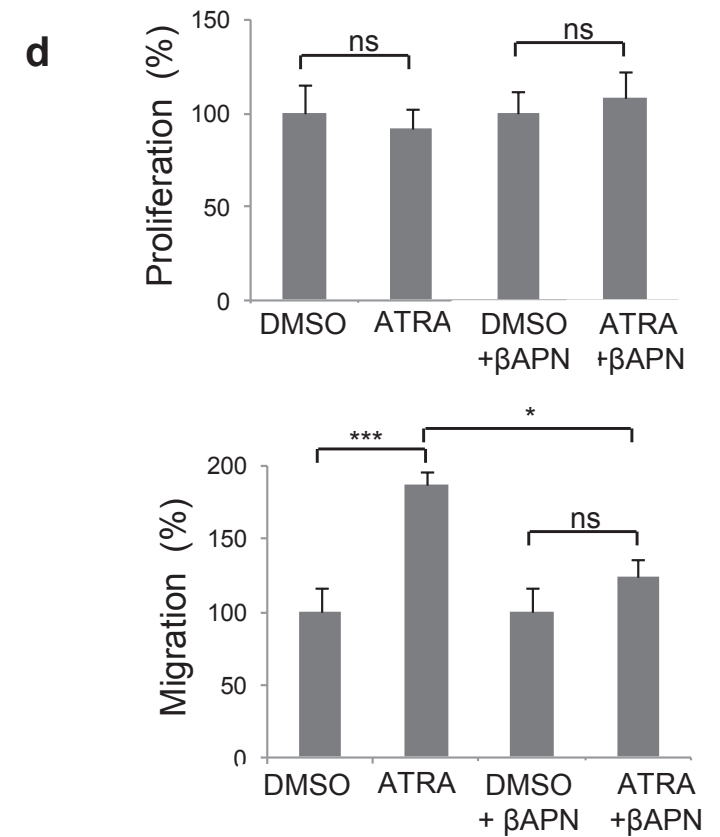
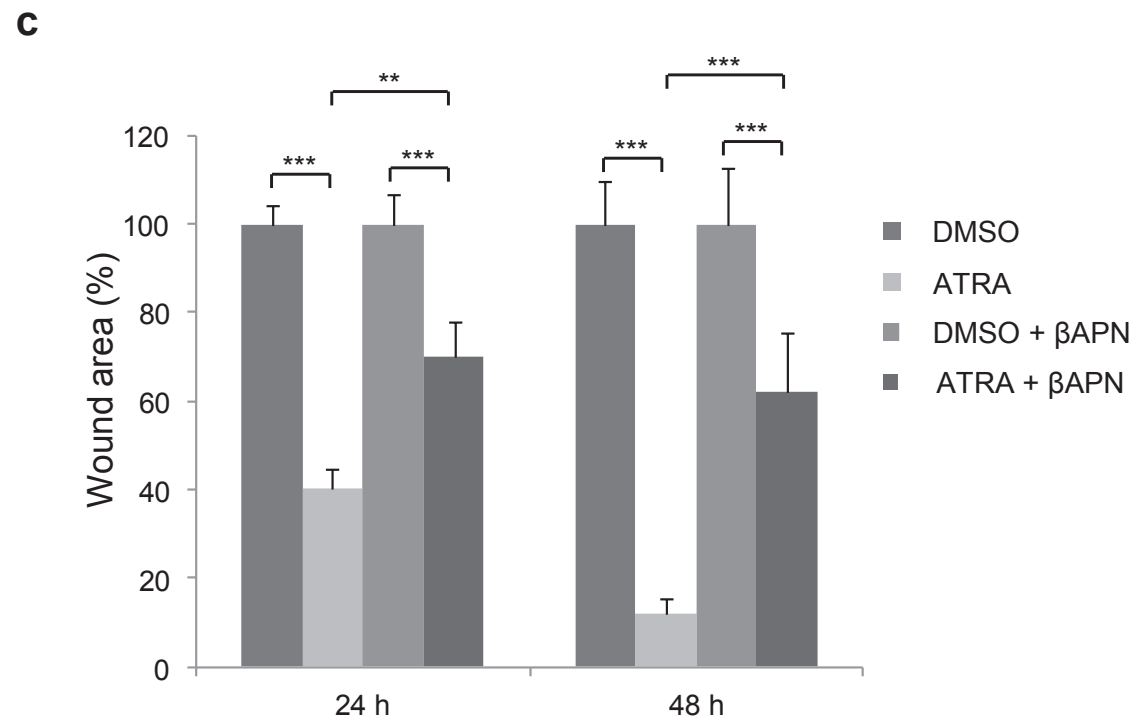
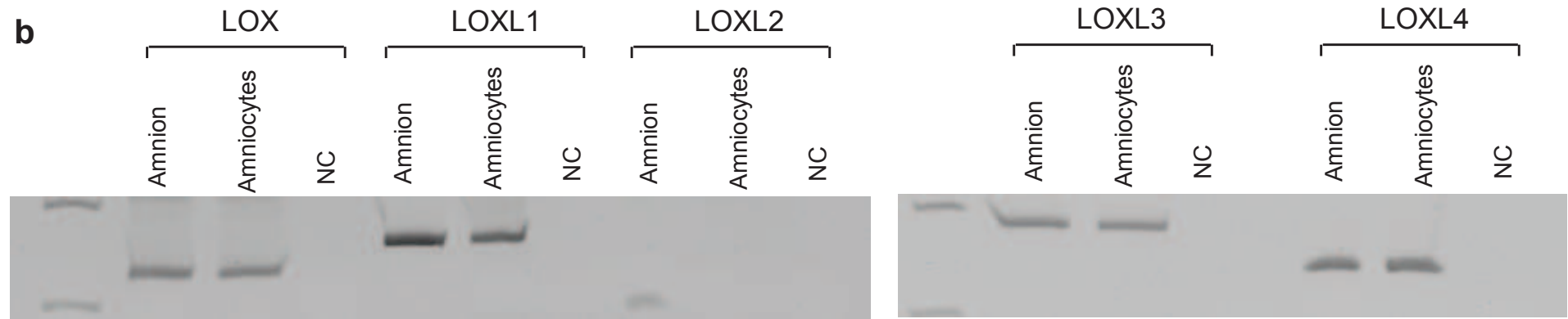
**b**





**a**

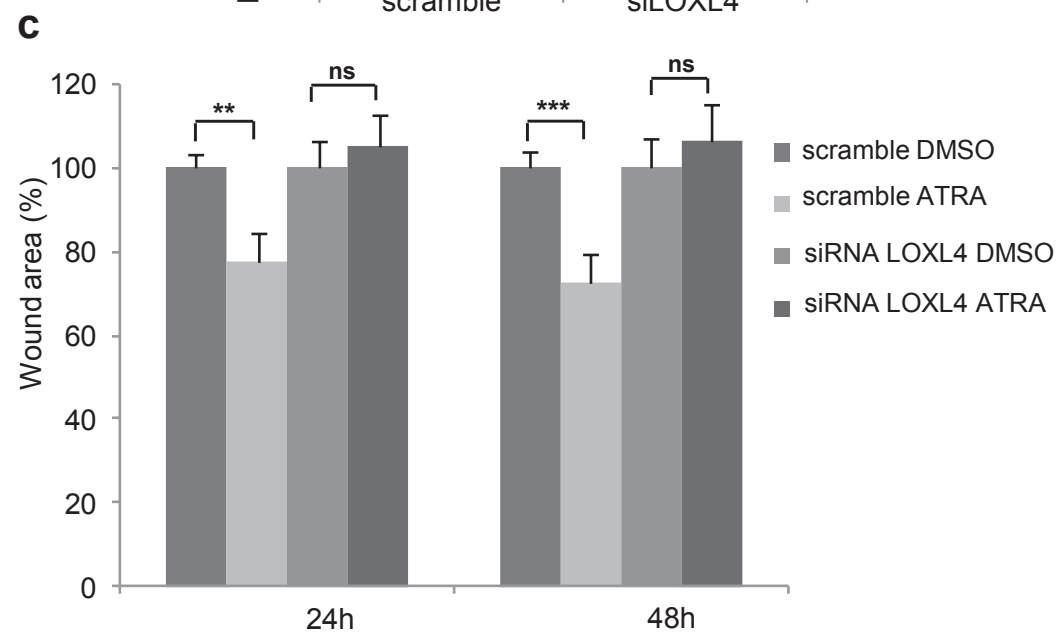
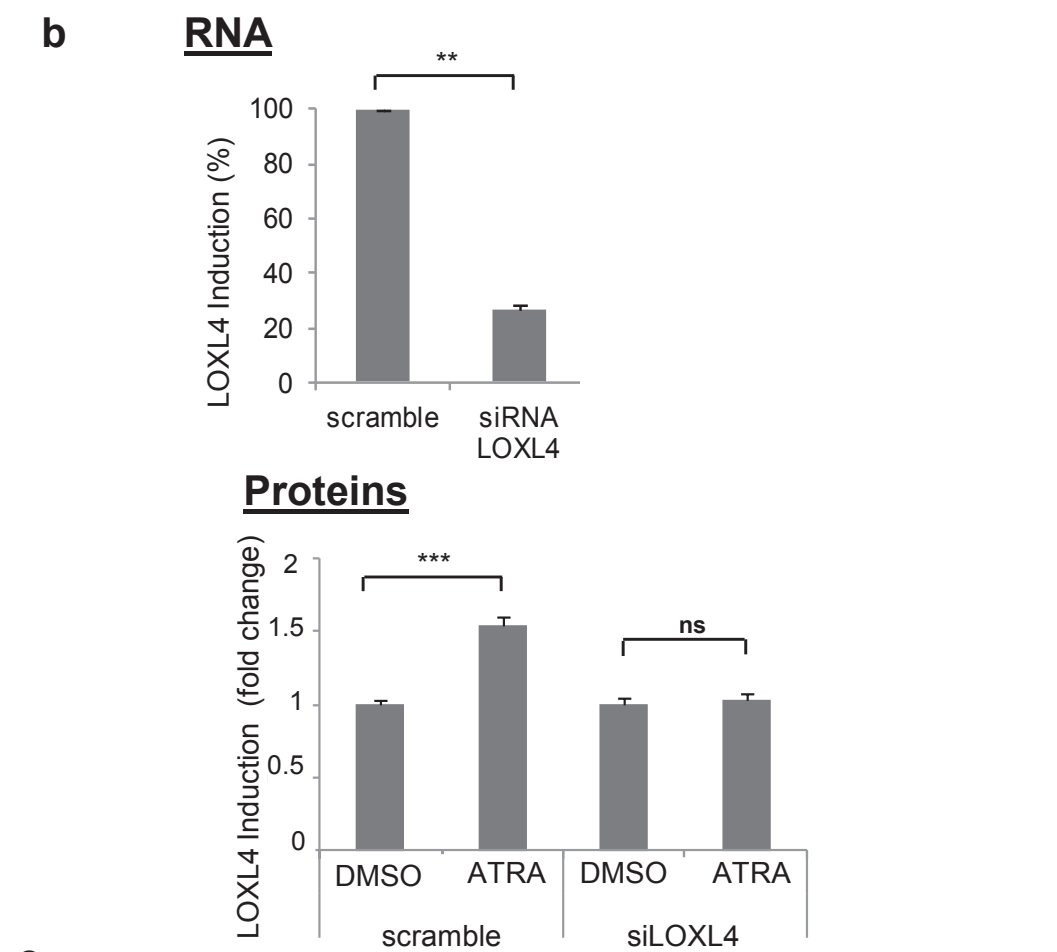
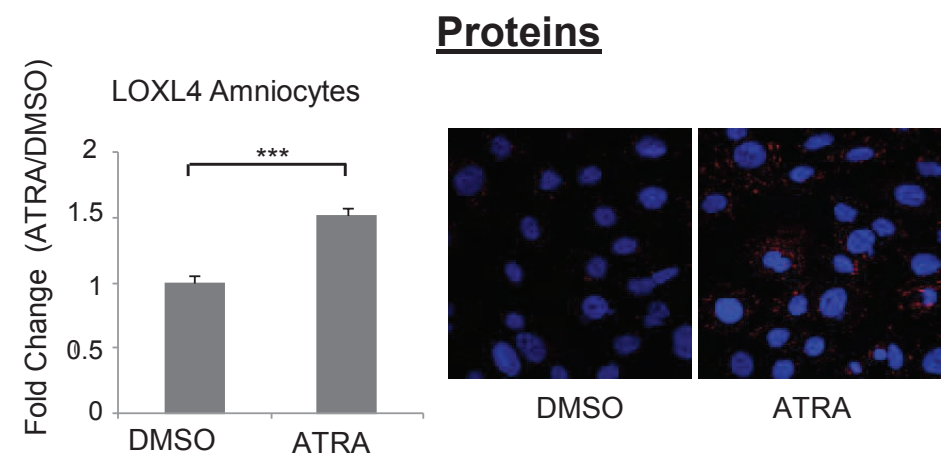
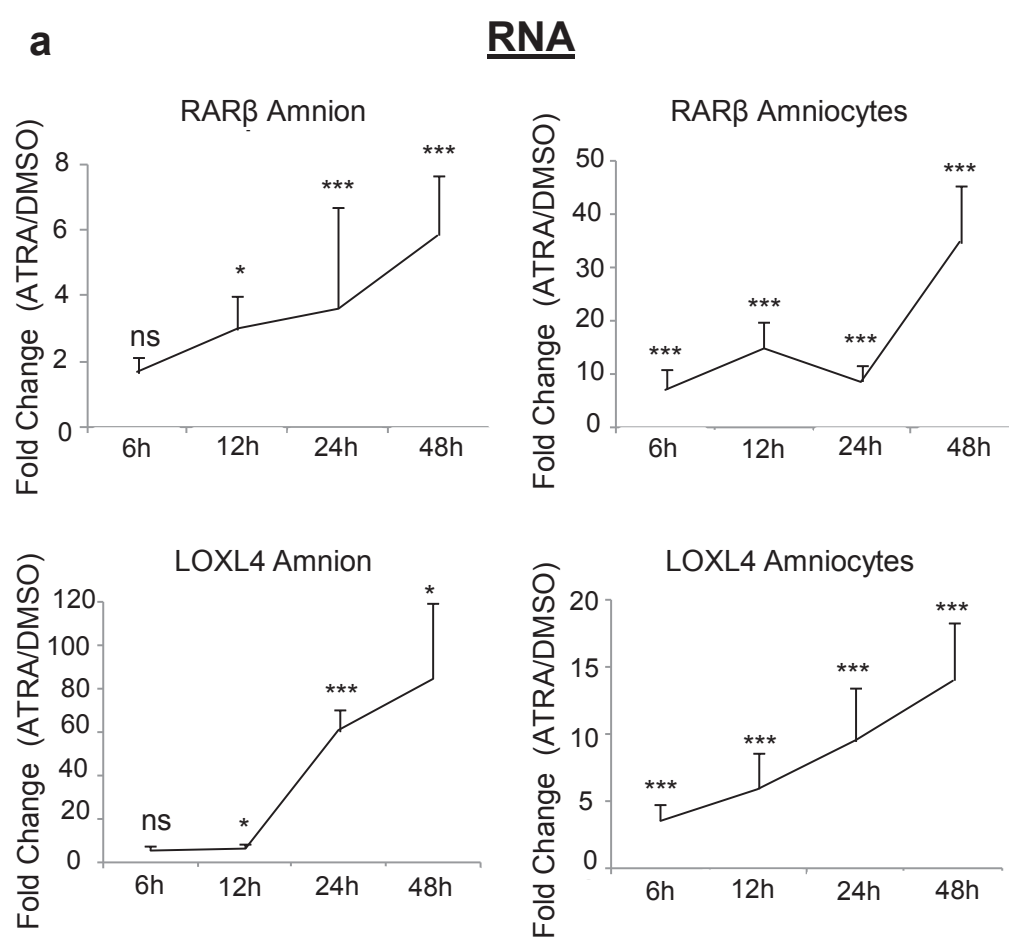
Genes id	Amnion		Primary amniocytes		Gene name	Genbank Accession
	FC	LogFC	FC	LogFC		
LOXL4	16,394	4,035	34,422	5,105	lysyl oxidase-like 4	NM_032211



**Figure 3** (Rouzaire et al., 2016)

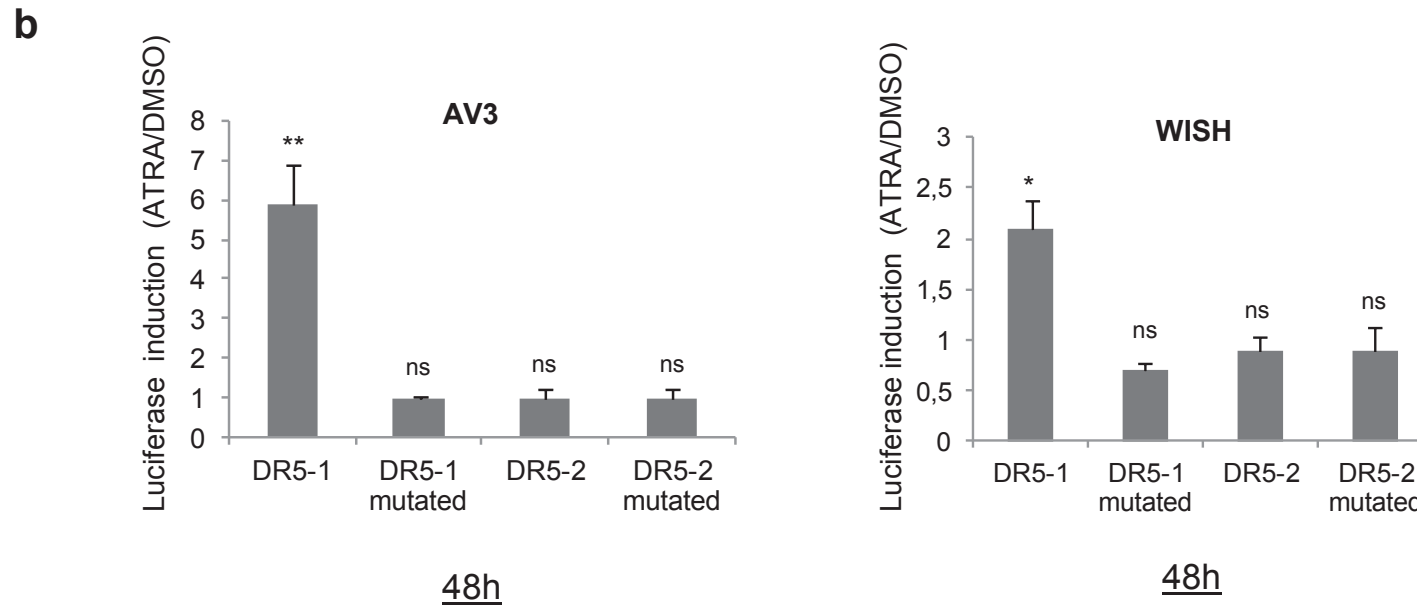
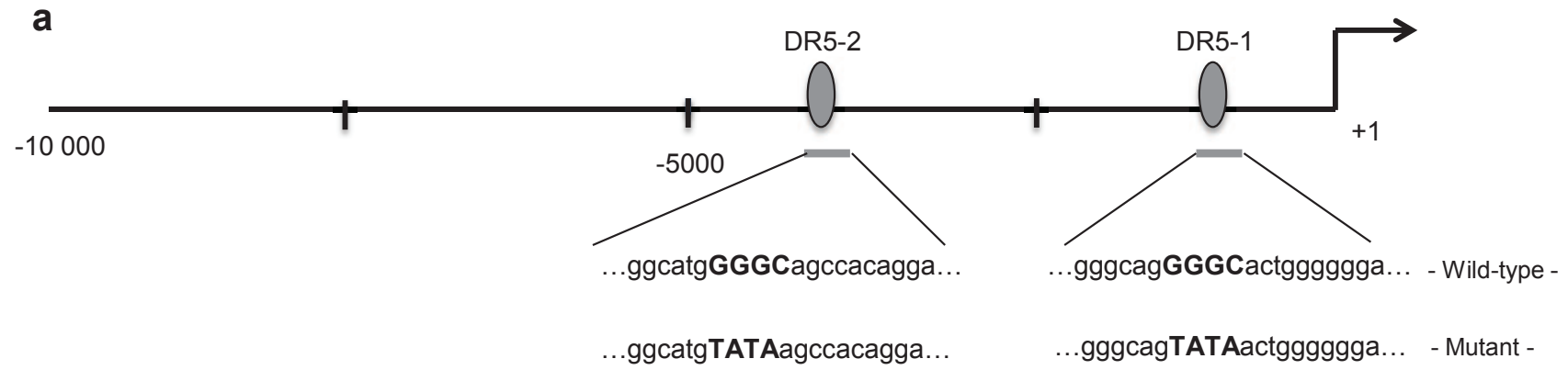






**Figure 4** (Rouzaire et al., 2016)







La RPM iatrogène constitue la principale complication des procédures chirurgicales foetoscopique. Communément pratiquées au 2<sup>ème</sup> et au début du 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse, ces procédures exposent le fœtus à des risques de prématurité important si l'intégrité des membranes fœtales n'est pas rétablie après l'intervention. Pour cela, l'une des stratégies thérapeutiques déjà utilisées en clinique consiste à stopper la fuite du liquide amniotique en plaçant un bouchon (ou plug) de collagène au niveau du site d'entrée du foetoscope. Cette procédure reste cependant à améliorer car elle ne présente qu'une faible efficacité clinique du fait de l'incapacité totale des membranes à coloniser le plug et à restituer une poche des eaux hermétique.

Les membranes fœtales ne sont pas vascularisées et ne peuvent donc pas initier un processus de cicatrisation classique – composé d'une phase inflammatoire suivie d'une ré-épithélialisation puis d'un remodelage de la MEC – en réponse à une lésion. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à une molécule très impliquée dans la régulation de ces deux dernières phases du processus de cicatrisation que sont la ré-épithélialisation et le remodelage de la MEC. Il s'agit de la vitamine A et de ses dérivés actifs, les acides rétinoïques, qui sont déjà communément utilisées en clinique, notamment pour leur propriété pro-cicatrisante.

Dans le but de proposer, à terme, une molécule capable de favoriser la cicatrisation des membranes fœtales suite à une intervention foetoscopique en association ou non avec les plugs de collagène, cette étude visait tout d'abord à démontrer les effets de l'atRA sur la cicatrisation des cellules épithéliales amniotiques grâce à un modèle de blessure *in vitro*. Suite à cette première étude qui démontrait un gain de cicatrisation d'environ 80% après traitement à l'atRA, nous avons recherché les mécanismes cellulaires impliqués et nous avons mis en évidence que l'atRA favorisait la cicatrisation en augmentant la migration et non la prolifération cellulaire.



La seconde partie de ce travail visait à étudier les mécanismes moléculaires responsables de l'effet pro-cicatrisant de l'atRA. Une analyse globale du transcriptome des membranes fœtales (amniocytes, amnios, chorion) suite à un traitement à l'atRA a permis d'initier ce travail. A l'issu de ce dernier, nous avons mis en évidence de nombreux gènes régulés par l'atRA et impliqués dans des voies de signalisation importantes pour le processus de cicatrisation, que sont l'adhésion cellulaire, la migration ou encore le remodelage de la MEC. C'est à cette dernière que nous nous sommes plus particulièrement intéressé en choisissant d'étudier un gène crucial pour la dynamique de la matrice : le gène LOXL4, appartenant à la famille des lysyl oxydases. Cette famille d'enzymes composée de 5 membres possède une activité amine oxydase permettant les pontages entre les molécules de collagènes et d'élastine, assurant ainsi la formation d'un réseau fibrillaire indispensable à la stabilité et l'intégrité des MEC. Nous avons aussi pu démontrer, par un test fonctionnel de blessure *in vitro*, que l'effet pro-cicatrisant de l'atRA était médié par l'induction transcriptionnelle de LOXL4. Pour la première fois, ce travail met en évidence un lien direct entre la régulation d'un gène par l'atRA et ses effets potentialisateurs sur la cicatrisation des épithéliums.





**DISCUSSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**



Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la cicatrisation des membranes fœtales humaines dans le but de pouvoir proposer, à terme, une molécule capable d'induire la ré-épithélialisation de l'amnios suite à une lésion. Selon le dogme actuel, aucun signe majeur de cicatrisation n'est observé au sein des membranes fœtales humaines suite aux procédures fœtoscopiques réalisées à des fins thérapeutiques lors de la grossesse (56). De fait, il était intéressant de proposer une molécule capable de l'initier et d'en étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Dans cette étude, j'ai pu démontrer que l'atRA était capable de promouvoir la cicatrisation de plus de 80% dans un modèle de blessure *in vitro* réalisé sur des cellules épithéliales dérivées de l'amnios (amniocytes primaires) permettant ainsi la restitution d'un tapis cellulaire intact suite à une lésion.

L'étude des mécanismes cellulaires impliqués a permis de démontrer que l'atRA agissait sur la fermeture de la blessure en favorisant la migration des cellules épithéliales, sans agir sur leur prolifération. Ces résultats sont en accord avec la plupart des études *in vitro* démontrant une absence d'effet de l'atRA sur la prolifération cellulaire voire même un effet inhibiteur (318–320). Ces effets antiprolifératifs – essentiellement retrouvés sur des tissus tumoraux – restent cependant discutables. Une étude a par exemple démontré un effet positif de l'atRA sur la prolifération des kératinocytes de l'épiderme *in vivo* alors qu'il n'avait aucun effet *in vitro* (321). Parmi les hypothèses tentant d'expliquer ces effets contradictoires de l'atRA sur la prolifération, le DMSO, très souvent utilisé en recherche dans les essais *in vitro*, pourrait masquer les effets de l'atRA sur la prolifération. Une étude a notamment établi que l'atRA n'avait pas d'effet sur la prolifération des cellules fibroblastiques dermiques humaines (HDF) lors de tests de blessure – en accord avec nos résultats obtenus sur les amniocytes primaires – alors que le DMSO seul inhibe la prolifération de ces cellules en comparaison à une condition sans traitement (322). Cet effet délétère du DMSO sur la prolifération semble néanmoins dépendant du type cellulaire, comme démontré dans cette dernière étude sur une lignée de



kératinocytes humains (HaCaT), où le DMSO n'exerce, cette fois ci, pas d'effet antiprolifératif.

Le DMSO, utilisé comme vecteur de l'atRA dans notre étude, connaît une autre application en biologie, où il est communément utilisé dans la cryoconservation de cellules malgré des effets toxiques de plus en plus décrits (323–325). Ainsi, cette substance pourrait être délétère pour les effets pro-cicatrisants de l'atRA et pour la viabilité des cellules elles même. Représentant au jour d'aujourd'hui le principal écueil à ce type d'étude mais aussi à la future utilisation de l'atRA comme molécule pharmacologique, ce dérivé actif peut aussi être solubilisé dans de l'éthanol. Toutefois, cette substance présente également des inconvénients et pourrait tout autant altérer la cicatrisation. Pour pallier à ce problème majeur de toxicité des vecteurs solubilisant l'atRA, l'équipe travaille actuellement en collaboration avec un partenaire privé pour développer un excipient (contenant un ou plusieurs solvants) permettant de solubiliser l'atRA sans effet délétère sur les cellules. Les premières expériences conduites (utilisant les tests de blessures classiques ainsi que la quantification de gènes cibles de l'atRA par qPCR) ont déjà donné des résultats encourageants et ont permis d'optimiser la délivrance de l'atRA d'un point de vue galénique à des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  M, concentrations se rapprochant des concentrations classiquement utilisées et actives.

Comme les membranes fœtales ne sont pas vascularisées, la phase inflammatoire classique permettant le recrutement de la machinerie cellulaire et moléculaire nécessaire pour initier la ré-épithélialisation de la blessure n'a pas lieu au sein de ce tissu (55). Ainsi, le choix de l'atRA semble pertinent puisqu'il initie à lui seul un processus de ré-épithélialisation – en favorisant la migration des amniocytes – et de remodelage tissulaire, en régulant des gènes essentiels à la dynamique de la MEC. En effet, l'analyse transcriptomique réalisée au sein de l'équipe sur des explants de membranes fœtales (amnios ou chorion) et sur des amniocytes primaires traités à l'atRA pendant 24h a permis de mettre en évidence un nombre important



de gènes régulés par l'atRA et impliqués dans le remodelage de la MEC. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques retrouvées au sein d'autres tissus comme la peau (178,179), le cartilage (175) ou les reins (173). Cette étude (détaillées dans la partie 2.III.C. ii) confirme que la vitamine A régule de nombreux gènes impliqués dans la composition et la dynamique des MEC et nous a donc permis de faire ressortir son implication dans la régulation d'un membre de la famille des LOXs qui n'avait jamais été démontrée auparavant.

Au regard des résultats du transcriptome, nous avons également pu conclure que l'amnios était le feuillet qui répondait le plus au signal rétinol – présentant de nombreux gènes régulés par l'atRA – alors que le chorion, feuillet le plus externe en contact avec la décidue maternelle ne fait ressortir que très peu de gènes répondant à un traitement à l'atRA. Il est intéressant de noter la spécificité des actions moléculaires comme l'acide rétinol sur deux feuillets proches anatomiquement mais différent d'un point de vue origine développementale. Pour débiter l'analyse de ces données, nous avons fait le choix de ne conserver que les gènes dont la différence d'expression entre la condition atRA et la condition contrôle (DMSO) était significative avec une p-value inférieure à 0,01, ceci constituant un premier filtre des résultats. La seconde limite utilisée pour sélectionner les gènes d'intérêts a été la valeur du fold change (FC) – rapport de l'expression du gène entre la condition atRA et la condition DMSO – qui nous a permis de conserver 144 gènes au sein des amniocytes primaires, 67 gènes au sein des explants d'amnios et 2 gènes au sein du chorion. Ce critère de sélection – que nous avons fixé à un  $\log FC = |1,2|$  – nous a permis de discriminer suffisamment les gènes selon leur réponse à l'atRA et de limiter leur nombre pour pouvoir concentrer la suite de l'analyse. Le choix de cette valeur reste discutable du fait de l'élimination potentielle de gènes importants répondant à l'atRA avec un faible FC, toutefois, ce seuil est largement retrouvé dans les analyses de données issues d'études transcriptomiques (326–331). La suite de l'analyse a consisté à classer ces gènes en fonction de leur fonction physiologique grâce au logiciel





Genomatix puis à croiser cette étude bio-informatique avec la bibliographie des gènes appartenant à des cascades biologiques en lien avec la cicatrisation et la MEC. A nouveau, ces recherches nous ont probablement contraints à évacuer certains acteurs potentiellement importants dans la cicatrisation mais elles nous ont surtout permis de réfléchir aux limites actuelles de ces techniques à « haut débit ». Toutefois, parmi un peu plus d'une dizaine de gènes d'intérêts (dont la rétino-induction ou -répression a été testée par RT-qPCR (résultats non présentés)) qui pourront être étudiés par la suite ; LOXL4 est tout de suite apparu comme présentant un grand intérêt pour débiter notre étude.

En effet, les résultats obtenus et décrits précédemment ont permis de démontrer que la protéine LOXL4, dont l'expression est rétino-induite dans l'amnios et les amniocytes primaires, joue un rôle essentiel dans la médiation de l'effet pro-cicatrisant de l'atRA. En plus d'avoir une fonction avérée dans la dynamique de la MEC via la réticulation des fibres de collagènes et d'élastine, les LOXs sont de plus en plus décrites dans des processus biologiques variés tels que la migration, l'adhésion cellulaire ou encore le remodelage tissulaire (310,311,314–317). De plus, la plupart des pathologies présentant une dérégulation de l'expression des LOXs - telles que le syndrome d'Ehler-Danlos (332), les kératocones (333) ou encore les rétinopathies (308) - sont associées à des défauts de cicatrisation. Ainsi, nos résultats sont en accord avec la bibliographie puisqu'ils démontrent que l'induction de LOXL4, membre de la famille des LOXs, est un des moyens essentiel utilisé par la cascade moléculaire de l'atRA pour promouvoir la migration cellulaire et favoriser ainsi la fermeture de la blessure. Là encore, il est intéressant de noter que seul un des cinq membres de la famille des LOXs est induit par l'acide rétinoïque au sein de l'amnios, démontrant la spécificité de l'action de cette molécule.

L'intégrité des membranes fœtales constitue un facteur essentiel au développement harmonieux de la grossesse. De fait, son altération peut conduire à une pathologie présentant



des risques important pour la mère et le fœtus : la rupture prématurée des membranes, ou RPM. Il s'agit de la principale complication des procédures fœtoscopiques communément pratiquées au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse (RPM iatrogène). Elle se produit en moyenne chez 3-5% des patientes suite à une foetoscopie à visée diagnostique et chez 5-8% des patientes ayant subi une procédure chirurgicale foetoscopique (334). Dans le but de prévenir ces risques, la stratégie du plug de collagène avait été proposée et devait permettre d'obturer la brèche créée par le foetoscope. Déjà utilisée en clinique, cette procédure s'avère toutefois peu efficace du fait de l'incapacité des membranes à initier un processus de cicatrisation malgré la présence du plug au niveau de la brèche (335).

Les résultats obtenus lors de cette thèse - démontrant un effet très positif de l'atRA sur la migration des amniocytes - ouvrent des perspectives intéressantes pour améliorer la prise en charge de cette pathologie clinique.

Dés lors, deux utilisations de cette molécule pourraient être envisagées à terme :

- ❖ La première consisterait à administrer localement de l'atRA au niveau de la lésion en imbibant le plug de collagène.
- ❖ La seconde pourrait consister à traiter au préalable des cellules amniocytaires à l'atRA avant de les ajouter au plug inerte.

Cette seconde stratégie rejoint certaines études qui ont déjà tenté de potentialiser l'action du plug de collagène en l'imbibant de molécules bioactives ou de cellules. Par exemple, Engel *et al.*, ont utilisé des plugs imbibés de fibrinogène sur des blessures de membranes fœtales réalisées *ex vivo*. Une migration cellulaire plus rapide de 35% par rapport aux plugs classiques a été obtenue, et ce grâce à la formation d'un bouchon de fibrine (91). Une autre étude menée *in vivo* sur le modèle lapin proposait d'associer des cellules amniocytaires au plug de collagène pour favoriser la recolonisation des cellules suite à une foetoscopie. Ces cellules



amniocytaires conduisaient à une amélioration de l'intégrité de l'amnios permettant ainsi de limiter la fuite du liquide amniotique (92). Cette dernière étude pourrait dès lors être rapprochée d'une de nos hypothèses visant à prétraiter les cellules avant de les injecter au sein du plug. Chez le modèle lapin, la matrice de collagène a également été remplacée par d'autres matrices moins inertes biologiquement afin d'améliorer l'efficacité de ce plug. Parmi celles-ci, un bouchon composé de MEC d'amnios décellularisé a été testé et présente une efficacité comparable au plug de collagène (88). L'insertion de ces plugs à l'intérieur de la brèche membranaire a aussi été suivie de l'application d'un caillot de fibrine synthétique (gel) composé d'une solution de fibrinogène et de thrombine afin de maintenir le plug en place (87,88,92). Toutefois, ce gel de fibrine adhère très mal aux membranes fœtales et se dégrade rapidement, rendant son utilisation inefficace au vu de la durée de la grossesse humaine. Depuis quelques années, le développement de polymères à base de polyéthylène glycol (PEG) a permis de proposer une alternative à ce gel de fibrine. Un biopolymère synthétique composé de PEG et de catéchol, groupement fonctionnel retrouvé dans les protéines adhésives des moules marines, a été développé puis testé dans un protocole de transplantation d'îlots extra-hépatiques chez la souris. Au vu des résultats très positifs obtenus dans ce modèle (336), son utilisation a été transposée au sein des membranes fœtales et testée dans un modèle de blessure *ex vivo* puis *in vivo* chez le lapin (93–95). Malgré des propriétés adhésives et une stabilité supérieure au gel de fibrine, ce composé nécessite des tests à plus long terme sur des modèles animaux présentant une longue période de gestation (brebis, primates). De plus, ce composé augmente le recrutement de macrophages au niveau du site d'application – en comparaison avec le caillot de fibrine – suggérant la mise en place d'un processus inflammatoire pouvant devenir néfaste pour l'intégrité des membranes fœtales à long terme.



Dans ce contexte, l'apport d'atRA au niveau du site d'entrée du foetoscope pourrait optimiser l'intégration du plug aux membranes fœtales quelque soit l'hypothèse envisagée pour son administration (directe et locale ou indirecte en prétraitant des cellules amniocytaires).

Il pourrait ainsi :

- favoriser (directement ou indirectement) la migration des cellules épithéliales amniotiques bordant la brèche en direction du plug.

- augmenter (directement ou indirectement) les pontages entre les fibres de collagène de l'amnios et du plug lui-même via l'induction de LOXL4 par l'atRA.

- réguler d'autres gènes potentiellement bénéfiques pour le remodelage de la MEC et la cicatrisation (gènes restant à étudier à la suite du transcriptome cité dans la publication n°2).

Toutefois et malgré cette action pro-cicatrisante prometteuse, une telle administration d'atRA présente toutefois certains inconvénients.

D'une part, la toxicité de son agent solubilisant, le DMSO, pourrait avoir des effets délétères sur la cicatrisation et la viabilité des cellules, notion que nous avons déjà discutée précédemment. De ce fait, le développement d'un nouveau vecteur de l'atRA apparaît vraiment constituer la priorité actuelle.

D'autre part, l'utilisation des rétinoïdes lors de la grossesse est toujours largement discutée du fait de leur tératogénicité (Publication n°1). Même si ces effets tératogènes sur le fœtus sont concentrés au 1<sup>er</sup> trimestre (338,339), la seule indication des rétinoïdes pendant la grossesse se limite actuellement à une pathologie constituant une urgence clinique : la leucémie aiguë promyélocytaire (340). Dans le cas où cette pathologie est diagnostiquée au 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse, l'administration du traitement classique à base d'atRA permet une





rémission dans 90-95% des cas sans effets délétères sur le fœtus (341), démontrant l'innocuité de l'atRA à ces stades tardifs du développement.

Enfin, il serait aussi possible d'imaginer un plug capable de délivrer directement LOXL4 au niveau du site de lésion. Cette possibilité, bien que limitée pour l'instant à LOXL4 pourrait à terme être plutôt utilisé sous forme de « cocktail » de protéines favorisant la cicatrisation. En effet, l'utilisation des protéines recombinantes en clinique s'est largement démocratisée ces dernières années et pourrait représenter une piste possible pour apporter directement la protéine LOXL4 au niveau du plug. Toutefois, afin de promouvoir un effet cicatrisant à plus long terme, l'utilisation de la thérapie génique est une piste tout aussi prometteuse. Ce procédé, encore en expérimentation (342,343), permettrait de faire « surproduire » la protéine LOXL4 aux cellules des membranes fœtales bordant la lésion pour une durée prolongée afin de favoriser la migration cellulaire. La surexpression de LOX a déjà été testée de cette manière en délivrant son plasmide d'expression au sein d'une matrice de collagène. Il a ainsi été établi que LOX était produit pendant une durée prolongée (jusqu'à 20 jours) grâce à cette technique. De plus, son efficacité a été démontrée grâce à un test fonctionnel *in vitro* sur des fibroblastes en culture puis *in vivo* sur un test de blessure cutanée chez le rat. Dans ces deux modèles, le plasmide d'expression de LOX a permis une nette augmentation de la résistance mécanique en comparaison au transgène control codant pour la GFP (317).

Cette stratégie thérapeutique plus ciblée permettrait d'éviter les inconvénients liés à l'utilisation de l'atRA mais nécessiterait de nouveaux tests pour définir notamment la dose de LOXL4 efficace ainsi que le moyen d'administration. De plus, cette alternative n'apparaît que partiellement satisfaisante puisqu'elle évincerait tous les autres effets positifs que l'atRA semble avoir sur la cicatrisation des membranes fœtales en régulant un grand nombre de gènes comme les résultats de notre transcriptome l'ont établi.



En effet, au regard de l'ensemble des résultats obtenus par ce travail, l'induction de LOXL4 apparait essentielle pour médier les effets pro-cicatrisants de l'atRA sur les cellules amniotiques mais ne constitue pas le seul acteur et/ou mécanisme impliqué (Publication n°2 : Fig.2 et Fig.3c). Ainsi, la compréhension des effets globaux de l'atRA sur les membranes fœtales et leur cicatrisation, bien que prometteurs, doivent être encore étayés avant de pouvoir envisager son développement en tant que molécule thérapeutique au sein de ce tissu. Malgré cela, ces recherches constituent une nouvelle perspective dans la prise en charge de la RPM iatrogène en proposant une molécule capable à la fois de promouvoir la migration des amniocytes et d'avoir une action sur le remodelage de la MEC et l'adhésion cellulaire. Toutes ces propriétés présentent un grand intérêt pour le développement d'une matrice « idéale » capable de s'intégrer véritablement aux membranes fœtales de façon à reformer une poche des eaux hermétique à la suite des fœtoscopies, limitant ainsi le risque infectieux et la fuite du liquide amniotique.



## **REFERENCES**

## **BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Bourne G. The Foetal Membranes. *Postgrad Med J.* avr 1962;38(438):193-201.
2. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol.* juin 1960;79:1070-3.
3. Bourne GL, Lacy D. Ultra-structure of human amnion and its possible relation to the circulation of amniotic fluid. *Nature.* 18 juin 1960;186:952-4.
4. Duminy F. [Ultrastructure of the human fetal membranes]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* juin 1974;3(4):477-98.
5. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta.* janv 1998;19(1):1-11.
6. Pasquier J-C, Doret M. [Fetal membranes: embryological development, structure and the physiopathology of the preterm premature rupture of membranes]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* oct 2008;37(6):579-88.
7. 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.* avr 2001;85(4):444-9.
8. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta.* mars 2007;28(2-3):161-9.
9. 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.* nov 2004;191(5):1678-87.
10. 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.
11. Sangwan VS, Basu S. Antimicrobial properties of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol.* janv 2011;95(1):1-2.
12. Johnson CT, Farzin A, Burd I. Current management and long-term outcomes following chorioamnionitis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* déc 2014;41(4):649-69.
13. Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol.* août 2008;32(4):288-94.
14. Brace RA, Anderson DF, Cheung CY. Regulation of amniotic fluid volume: mathematical model based on intramembranous transport mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 15 nov 2014;307(10):R1260-1273.
15. Beall MH, van den Wijngaard JPHM, van Gemert MJC, Ross MG. Regulation of Amniotic Fluid Volume. *Placenta.* août 2007;28(8-9):824-32.
16. Brace RA. Progress toward understanding the regulation of amniotic fluid volume: water and solute fluxes in and through the fetal membranes. *Placenta.* janv 1995;16(1):1-18.
17. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta.* avr 2001;22(4):265-75.





18. Daneshmand SS, Cheung CY, Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep: role of passive permeability and vascular endothelial growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2003;188(3):786-93.
19. 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.* mai 2007;28(5-6):421-8.
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.* juin 2005;192(6):2041-2044-2046.
21. 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.* déc 2009;44(12):920-3.
22. Shioji M, Fukuda H, Kanzaki T, Wasada K, Kanagawa T, Shimoya K, et al. Reduction of aquaporin-8 on fetal membranes under oligohydramnios in mice lacking prostaglandin F2 alpha receptor. *J Obstet Gynaecol Res.* août 2006;32(4):373-8.
23. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta.* déc 2006;27(11-12):1037-51.
24. Arikat S, Novince RW, Mercer BM, Kumar D, Fox JM, Mansour JM, et al. Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required. *Am J Obstet Gynecol.* janv 2006;194(1):211-7.
25. Oyen ML, Calvin SE, Landers DV. Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol.* août 2006;195(2):510-5.
26. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 15 mars 2007;15(6):2223-68.
27. Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig.* oct 2004;11(7):427-37.
28. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. déc 1998;40(6):395-400.
29. Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, Howe DC. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. *J Endocrinol.* sept 1999;162(3):351-9.
30. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol.* mai 1994;101(5):375-86.
31. 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.* janv 1999;14(1):237-41.



32. El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod.* mars 2005;72(3):720-6.
33. Meinert M, Malmström A, Tufvesson E, Westergren-Thorsson G, Petersen AC, Laurent C, et al. Labour induces increased concentrations of biglycan and hyaluronan in human fetal membranes. *Placenta.* juin 2007;28(5-6):482-6.
34. Meinert M, Eriksen GV, Petersen AC, Helmig RB, Laurent C, Uldbjerg N, et al. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2001;184(4):679-85.
35. Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, et al. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest.* 1 nov 1996;98(9):1971-8.
36. Reti NG, Lappas M, Riley C, Wlodek ME, Permezel M, Walker S, et al. Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* mai 2007;196(5):484.e1-10.
37. Skinner SJ, Liggins GC. Glycosaminoglycans and collagen in human amnion from pregnancies with and without premature rupture of the membranes. *J Dev Physiol.* avr 1981;3(2):111-21.
38. Strauss JF. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* févr 2013;20(2):140-53.
39. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol.* janv 1995;146(1):148-56.
40. Arechavaleta-Velasco F, Marciano D, Díaz-Cueto L, Parry S. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2004;190(3):843-50.
41. Smith R. Parturition. *N Engl J Med.* 18 janv 2007;356(3):271-83.
42. Ohana E, Mazor M, Chaim W, Levy J, Sharoni Y, Leiberman JR, et al. Maternal plasma and amniotic fluid cortisol and progesterone concentrations between women with and without term labor. A comparison. *J Reprod Med.* févr 1996;41(2):80-6.
43. Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.* août 1998;83(8):2916-20.
44. Whittle WL, Patel FA, Alfaidy N, Holloway AC, Fraser M, Gyomory 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.* avr 2001;64(4):1019-32.
45. 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.* déc 2005;90(12):6569-74.
46. 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.* avr 1997;56(4):812-20.



47. 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.* nov 2004;89(11):5639-48.
48. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Prostaglandin E(2)-dependent production of latent matrix metalloproteinase-9 in cultures of human fetal membranes. *Mol Hum Reprod.* nov 2000;6(11):1033-40.
49. Kobayashi H. The entry of fetal and amniotic fluid components into the uterine vessel circulation leads to sterile inflammatory processes during parturition. *Front Immunol.* 2012;3:321.
50. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Mazor M, et al. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *Am J Obstet Gynecol.* août 2006;195(2):394.e1-24.
51. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaihong P, Gotsch F, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. nov 2014;72(5):458-74.
52. Romero R, Miranda J, Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* août 2015;28(12):1394-409.
53. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 5 mars 1998;338(10):663-70.
54. Blanchon L, Accoceberry M, Belville C, Delabaere A, Prat C, Lemery D, et al. [Rupture of membranes: pathophysiology, diagnosis, consequences and management]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* avr 2013;42(2):105-16.
55. Devlieger R, Millar LK, Bryant-Greenwood G, Lewi L, Deprest JA. Fetal membrane healing after spontaneous and iatrogenic membrane rupture: a review of current evidence. *Am J Obstet Gynecol.* déc 2006;195(6):1512-20.
56. Gratacós E, Sanin-Blair J, Lewi L, Toran N, Verbist G, Cabero L, et al. A histological study of fetoscopic membrane defects to document membrane healing. *Placenta.* mai 2006;27(4-5):452-6.
57. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* juill 1998;179(1):194-202.
58. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mars 2005;112 Suppl 1:19-22.
59. Weiss A, Goldman S, Shalev E. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2007;12:649-59.
60. Fortner KB, Grotegut CA, Ransom CE, Bentley RC, Feng L, Lan L, et al. Bacteria Localization and Chorion Thinning among Preterm Premature Rupture of Membranes. *PLoS ONE* [Internet]. 8 janv 2014 [cité 16 déc 2015];9(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885429/>



61. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res.* mars 2005;57(3):404-11.
62. Millar LK, Boesche MH, Yamamoto SY, Killeen J, DeBuque L, Chen R, et al. A relaxin-mediated pathway to preterm premature rupture of the fetal membranes that is independent of infection. *Am J Obstet Gynecol.* juill 1998;179(1):126-34.
63. 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.* avr 1997;56(4):800-11.
64. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1(1):11-22.
65. Sharma R, Mehta S. Ascorbic Acid concentration and preterm premature rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol India.* déc 2014;64(6):417-20.
66. England MC, Benjamin A, Abenhaim HA. Increased risk of preterm premature rupture of membranes at early gestational ages among maternal cigarette smokers. *Am J Perinatol.* nov 2013;30(10):821-6.
67. Dadvand P, Basagaña X, Figueras F, Martinez D, Beelen R, Cirach M, et al. Air pollution and preterm premature rupture of membranes: a spatiotemporal analysis. *Am J Epidemiol.* 15 janv 2014;179(2):200-7.
68. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettini J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* juin 2014;184(6):1740-51.
69. Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, et al. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. *Placenta.* avr 2011;32(4):317-22.
70. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* mai 1995;268(5 Pt 1):L699-722.
71. Zimmerman EF, Potturi RB, Resnick E, Fisher JE. Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice. *Teratology.* mars 1994;49(3):192-201.
72. Menon R, Polettini J, Syed TA, Saade GR, Boldogh I. Expression of 8-oxoguanine glycosylase in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. juill 2014;72(1):75-84.
73. Dad N, Abushama M, Konje JC, Ahmed B. What is the role of amnioinfusion in modern day obstetrics? *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2 déc 2015;1-5.
74. Morris JM, Roberts CL, Bowen JR, Patterson JA, Bond DM, Algert CS, et al. Immediate delivery compared with expectant management after preterm pre-labour rupture of the membranes close to term (PPROMT trial): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 9 nov 2015;
75. Chang J, Tracy TF, Carr SR, Sorrells DL, Luks FI. Port insertion and removal techniques to minimize premature rupture of the membranes in endoscopic fetal surgery. *J Pediatr Surg.* mai 2006;41(5):905-9.





76. Beck V, Lewi P, Gucciardo L, Devlieger R. Preterm prelabor rupture of membranes and fetal survival after minimally invasive fetal surgery: a systematic review of the literature. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(1):1-9.
77. Sepulveda W, Corral E, Gutierrez J. A simple device for vascular occlusion of acardiac twins. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* avr 2003;21(4):386-8.
78. Holmes A, Jauniaux E, Rodeck C. Monopolar thermocoagulation in acardiac twinning. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* sept 2001;108(9):1000-2.
79. van Mieghem T, Baud D, Devlieger R, Lewi L, Ryan G, De Catte L, et al. Minimally invasive fetal therapy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* oct 2012;26(5):711-25.
80. Devlieger R, Gratacós E, Wu J, Verbist L, Pijnenborg R, Deprest JA. An organ-culture for in vitro evaluation of fetal membrane healing capacity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* sept 2000;92(1):145-50.
81. Behzad F, Dickinson MR, Charlton A, Aplin JD. Brief communication: sliding displacement of amnion and chorion following controlled laser wounding suggests a mechanism for short-term sealing of ruptured membranes. *Placenta.* oct 1994;15(7):775-8.
82. Quintero RA, Romero R, Dzieczkowski J, Mammen E, Evans MI. Sealing of ruptured amniotic membranes with intra-amniotic platelet-cryoprecipitate plug. *Lancet Lond Engl.* 20 avr 1996;347(9008):1117.
83. Deprest J, Van Mieghem T, Emonds M-P, Richter J, De Koninck P, Zia S, et al. Traitement de la rupture iatrogène des membranes fœtales par « patch » amniotique. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* juin 2011;39(6):378-82.
84. Deprest J, Emonds M-P, Richter J, DeKoninck P, Van Mieghem T, Van Schoubroeck D, et al. Amniopatch for iatrogenic rupture of the fetal membranes. *Prenat Diagn.* juill 2011;31(7):661-6.
85. Gratacós E, Wu J, Yesildaglar N, Devlieger R, Pijnenborg R, Deprest JA. Successful sealing of fetoscopic access sites with collagen plugs in the rabbit model. *Am J Obstet Gynecol.* janv 2000;182(1 Pt 1):142-6.
86. Papanna R, Molina S, Moise KY, Moise KJ, Johnson A. Chorioamnion plugging and the risk of preterm premature rupture of membranes after laser surgery in twin-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* mars 2010;35(3):337-43.
87. Deprest JA, Papadopoulos NA, Decaluw H, Yamamoto H, Lerut TE, Gratacós E. Closure techniques for fetoscopic access sites in the rabbit at mid-gestation. *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 1999;14(7):1730-4.
88. Mallik AS, Fichter MA, Rieder S, Bilic G, Stergioula S, Henke J, et al. Fetoscopic closure of punctured fetal membranes with acellular human amnion plugs in a rabbit model. *Obstet Gynecol.* nov 2007;110(5):1121-9.
89. Liekens D, Lewi L, Jani J, Heyns L, Poliard E, Verbist G, et al. Enrichment of collagen plugs with platelets and amniotic fluid cells increases cell proliferation in sealed iatrogenic membrane defects in the foetal rabbit model. *Prenat Diagn.* juin 2008;28(6):503-7.



90. Lewi L, Liekens D, Heyns L, Poliard E, Beutels E, Deprest J, et al. In vitro evaluation of the ability of platelet-rich plasma to seal an iatrogenic fetal membrane defect. *Prenat Diagn.* juin 2009;29(6):620-5.
91. Engels AC, Hoylaerts MF, Endo M, Luyen S, Verbist G, Manodoro S, et al. In vitro sealing of iatrogenic fetal membrane defects by a collagen plug imbued with fibrinogen and plasma. *Prenat Diagn.* févr 2013;33(2):162-7.
92. Papadopulos NA, Kyriakidis DI, Schillinger U, Totis A, Henke J, Kovacs L, et al. Successful anatomic repair of fetoscopic access sites in the mid-gestational rabbit model using amnion cell engineering. *Vivo Athens Greece.* oct 2010;24(5):745-50.
93. Bilic G, Brubaker C, Messersmith PB, Mallik AS, Quinn TM, Haller C, et al. Injectable candidate sealants for fetal membrane repair: bonding and toxicity in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* janv 2010;202(1):85.e1-9.
94. Haller CM, Buerzle W, Kivelio A, Perrini M, Brubaker CE, Gubeli RJ, et al. Mussel-mimetic tissue adhesive for fetal membrane repair: an ex vivo evaluation. *Acta Biomater.* déc 2012;8(12):4365-70.
95. Kivelio A, Dekoninck P, Perrini M, Brubaker CE, Messersmith PB, Mazza E, et al. Mussel mimetic tissue adhesive for fetal membrane repair: initial in vivo investigation in rabbits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* déc 2013;171(2):240-5.
96. Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 15:167-175, 1913. The necessity of certain lipins in the diet during growth. By E. V. McCollum and Marguerite Davis. *Nutr Rev.* sept 1973;31(9):280-1.
97. Wolbach SB, Howe PR. TISSUE CHANGES FOLLOWING DEPRIVATION OF FAT-SOLUBLE A VITAMIN. *J Exp Med.* 30 nov 1925;42(6):753-77.
98. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* juin 2006;66(7):606-30.
99. Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1021-1054.
100. Nomenclature of retinoids: recommendations 1981. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *Arch Biochem Biophys.* 15 juill 1983;224(2):728-31.
101. Liébecq C. IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). *Newsletter* 1996. *Eur J Biochem FEBS.* 15 juill 1997;247(2):733-9.
102. Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 22 sept 1999;1440(2-3):139-62.
103. Holmes HN, Corbet RE. A CRYSTALLINE VITAMIN A CONCENTRATE. *Science.* 22 janv 1937;85(2195):103.
104. O'Byrne SM, Blaner WS. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res.* juill 2013;54(7):1731-43.



105. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res.* mai 2004;43(3):228-65.
106. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci CMLS.* mai 2010;67(9):1423-45.
107. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients.* janv 2011;3(1):63-103.
108. During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J Lipid Res.* juill 2002;43(7):1086-95.
109. Reboul E, Borel P. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Prog Lipid Res.* oct 2011;50(4):388-402.
110. van Bennekum AM, Fisher EA, Blaner WS, Harrison EH. Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase. *Biochemistry (Mosc).* 25 avr 2000;39(16):4900-6.
111. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, et al. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem.* 16 nov 2007;282(46):33553-61.
112. O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg IJ, Baehr W, et al. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem.* 21 oct 2005;280(42):35647-57.
113. Harrison EH. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:87-103.
114. Goodman DS. Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J Natl Cancer Inst.* déc 1984;73(6):1375-9.
115. Sapin V, Chaïb S, Blanchon L, Alexandre-Gouabau MC, Lémery D, Charbonne F, et al. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. *Pediatr Res.* oct 2000;48(4):565-72.
116. Yu KC, Cooper AD. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 mars 2001;6:D332-354.
117. Harrison EH. Lipases and carboxylesterases: possible roles in the hepatic utilization of vitamin A. *J Nutr.* févr 2000;130(2S Suppl):340S-344S.
118. Ghyselinck NB, Båvik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, et al. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 15 sept 1999;18(18):4903-14.
119. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, et al. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 1 sept 1999;18(17):4633-44.
120. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta.* juin 2009;1791(6):467-73.



121. Shirakami Y, Lee S-A, Clugston RD, Blaner WS. HEPATIC METABOLISM OF RETINOIDS AND DISEASE ASSOCIATIONS. *Biochim Biophys Acta*. janv 2012;1821(1):124-36.
122. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J*. 15 juin 2000;348 Pt 3:481-95.
123. Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm*. 2004;69:271-95.
124. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. 9 févr 2007;315(5813):820-5.
125. Sun H, Kawaguchi R. The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;288:1-41.
126. Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G. Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci CMLS*. déc 2008;65(24):3936-49.
127. Molotkov A, Fan X, Duester G. Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase Adh1 or Adh3. *Eur J Biochem FEBS*. mai 2002;269(10):2607-12.
128. Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*. 1 févr 2003;143-144:247-53.
129. Chetyrkin SV, Hu J, Gough WH, Dumauval N, Kedishvili NY. Further characterization of human microsomal 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. 1 févr 2001;386(1):1-10.
130. Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, et al. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev*. 1 mai 2007;21(9):1113-24.
131. Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, Martras S, Parés X, Flynn TG, et al. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J*. 1 août 2003;373(Pt 3):973-9.
132. Posch KC, Burns RD, Napoli JL. Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal. Recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase. *J Biol Chem*. 25 sept 1992;267(27):19676-82.
133. McCaffery P, Lee MO, Wagner MA, Sladek NE, Dräger UC. Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Dev Camb Engl*. juin 1992;115(2):371-82.
134. Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. janv 2012;1821(1):152-67.
135. Dupé V, Matt N, Garnier J-M, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 nov 2003;100(24):14036-41.





136. Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem.* 14 mars 2003;278(11):9856-61.
137. White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, et al. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem.* 25 juill 1997;272(30):18538-41.
138. Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 15 janv 2001;15(2):226-40.
139. MacLean G, Li H, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology.* oct 2007;148(10):4560-7.
140. Uehara M, Yashiro K, Mamiya S, Nishino J, Chambon P, Dolle P, et al. CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. *Dev Biol.* 15 févr 2007;302(2):399-411.
141. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet TIG.* nov 1988;4(11):309-14.
142. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature.* 3 déc 1987;330(6147):444-50.
143. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature.* 17 déc 1987;330(6149):624-9.
144. Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, et al. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature.* 28 avr 1988;332(6167):850-3.
145. Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juill 1989;86(14):5310-4.
146. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* mars 1992;6(3):329-44.
147. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juill 1996;10(9):940-54.
148. Nagpal S, Friant S, Nakshatri H, Chambon P. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* juin 1993;12(6):2349-60.
149. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 17 mars 2004;328:1-16.
150. Rochette-Egly C, Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e005.



151. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, et al. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*. 14 déc 1995;378(6558):681-9.
152. Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science*. 12 juin 1998;280(5370):1747-9.
153. Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res*. juill 2013;54(7):1761-75.
154. Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld MG, et al. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature*. 6 oct 1994;371(6497):528-31.
155. Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, Khorasanizadeh S. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J*. 1 mars 2000;19(5):1045-54.
156. Biddie SC, John S, Hager GL. Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action. *Trends Endocrinol Metab*. janv 2010;21(1):3-9.
157. Depoix C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists. *J Biol Chem*. 23 mars 2001;276(12):9452-9.
158. Egea PF, Rochel N, Birck C, Vachette P, Timmins PA, Moras D. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol*. 23 mars 2001;307(2):557-76.
159. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 25 juin 1999;284(5423):2174-7.
160. Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 27 avr 2001;276(17):13505-8.
161. Savkur RS, Burriss TP. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res Off J Am Pept Soc*. mars 2004;63(3):207-12.
162. Narlikar GJ, Fan H-Y, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 22 févr 2002;108(4):475-87.
163. Malik S, Roeder RG. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*. juin 2000;25(6):277-83.
164. Woychik NA, Hampsey M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*. 22 févr 2002;108(4):453-63.
165. Liu L, Gudas LJ. Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency. *J Biol Chem*. 2 déc 2005;280(48):40226-34.
166. Kam RKT, Deng Y, Chen Y, Zhao H. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci*. 22 mars 2012;2:11.



167. Wu L, Ross AC. Acidic retinoids synergize with vitamin A to enhance retinol uptake and STRA6, LRAT, and CYP26B1 expression in neonatal lung. *J Lipid Res.* 1 févr 2010;51(2):378-87.
168. Ocaya PA, Elmabsout AA, Olofsson PS, Törmä H, Gidlöf AC, Sirsjö A. CYP26B1 plays a major role in the regulation of all-trans-retinoic acid metabolism and signaling in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2011;48(1):23-30.
169. Chen Y, Pollet N, Niehrs C, Pieler T. Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* mars 2001;101(1-2):91-103.
170. Strate I, Min TH, Iliev D, Pera EM. Retinol dehydrogenase 10 is a feedback regulator of retinoic acid signalling during axis formation and patterning of the central nervous system. *Dev Camb Engl.* févr 2009;136(3):461-72.
171. Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol.* janv 2003;23(1):46-54.
172. 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.* juin 2010;14(6B):1793-805.
173. Marín MP, Esteban-Pretel G, Alonso R, Sado Y, Barber T, Renau-Piqueras J, et al. Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *J Nutr.* avr 2005;135(4):695-701.
174. Barber T, Esteban-Pretel G, Marín MP, Timoneda J. Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients.* nov 2014;6(11):4984-5017.
175. Cohen AJ, Lassová L, Golden EB, Niu Z, Adams SL. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. *J Cell Biochem.* 1 sept 2006;99(1):269-78.
176. Matsui T. Differential activation of the murine laminin B1 gene promoter by RAR alpha, ROR alpha, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 mars 1996;220(2):405-10.
177. Pan L, Eckhoff C, Brinckerhoff CE. Suppression of collagenase gene expression by all-trans and 9-cis retinoic acid is ligand dependent and requires both RARs and RXRs. *J Cell Biochem.* avr 1995;57(4):575-89.
178. King IA. Increased epidermal hyaluronic acid synthesis caused by four retinoids. *Br J Dermatol.* mai 1984;110(5):607-8.
179. Kaya G, Grand D, Hotz R, Augsburg E, Carraux P, Didierjean L, et al. Upregulation of CD44 and hyaluronate synthases by topical retinoids in mouse skin. *J Invest Dermatol.* janv 2005;124(1):284-7.
180. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res.* déc 1991;53(6):753-8.
181. Nusgens B-V. [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann Dermatol Vénérologie.* avr 2010;137 Suppl 1:S3-8.



182. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest.* avr 2010;120(4):956-62.
183. Luo J, Sucov HM, Bader JA, Evans RM, Giguère V. Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms. *Mech Dev.* mars 1996;55(1):33-44.
184. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e002.
185. Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub M-P, et al. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(15):7225-7229.
186. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients.* avr 2011;3(4):385-428.
187. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 févr 2006;103(8):2474-9.
188. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 28 avr 2006;312(5773):596-600.
189. Howell JM, Thompson JN, Pitt GA. HISTOLOGY OF THE LESIONS PRODUCED IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF ANIMALS FED A DIET DEFICIENT IN VITAMIN A ALCOHOL BUT CONTAINING VITAMIN A ACID. II. THE FEMALE RAT. *J Reprod Fertil.* avr 1964;7:251-8.
190. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* oct 1999;4(4):585-95.
191. Sapin V, Dollé P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P. Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXRalpha null fetuses. *Dev Biol.* 1 nov 1997;191(1):29-41.
192. Datta K, Kulkarni AP. Co-oxidation of all-trans retinol acetate by human term placental lipoxygenase and soybean lipoxygenase. *Reprod Toxicol Elmsford N.* avr 1996;10(2):105-12.
193. Stephanou A, Handwerger S. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology.* mars 1995;136(3):933-8.
194. Stephanou A, Handwerger S. Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol Cell Endocrinol.* juill 1995;112(1):123-9.
195. Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* avr 1998;83(4):1384-7.
196. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2001;86(10):5017-24.





197. Holdsworth-Carson SJ, Permezel M, Riley C, Rice GE, Lappas M. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor-alpha in term human gestational tissues: tissue specific and labour-associated changes. *Placenta*. févr 2009;30(2):176-86.
198. Wang Y, Lin Q, Wang X, Lu P, Sheng Z, Ding C, et al. [Expression of lethal gene mRNA on placenta villi in patients with spontaneous abortion]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. sept 2002;37(9):542-5.
199. Marceau G, Gallot D, Lemery D, Sapin V. Metabolism of Retinol During Mammalian Placental and Embryonic Development. In: *Vitamins & Hormones* [Internet]. Elsevier; 2007 [cité 18 juill 2014]. p. 97-115. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008367290675004X>
200. Prat C, Bouvier D, Comptour A, Marceau G, Belville C, Clairefond G, et al. All-trans-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment. *Placenta*. août 2015;36(8):881-7.
201. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*. mars 1953;92(2):189-217.
202. Guillonneau M, Jacqz-Aigrain E. [Teratogenic effects of vitamin A and its derivatives]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie*. sept 1997;4(9):867-74.
203. Garcin H, Higuieret P. Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats: effect of retinoic acid supplementation. *Ann Nutr Metab*. 1983;27(6):495-500.
204. Hatchell DL, Faculjak M, Kubicek D. Treatment of xerophthalmia with retinol, tretinoin, and etretinate. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. juin 1984;102(6):926-7.
205. McGowan SE, Holmes AJ, Smith J. Retinoic acid reverses the airway hyperresponsiveness but not the parenchymal defect that is associated with vitamin A deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. févr 2004;286(2):L437-444.
206. Esteban-Pretel G, Marín MP, Renau-Piqueras J, Sado Y, Barber T, Timoneda J. Vitamin A deficiency disturbs collagen IV and laminin composition and decreases matrix metalloproteinase concentrations in rat lung. Partial reversibility by retinoic acid. *J Nutr Biochem*. janv 2013;24(1):137-45.
207. Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*. 15 déc 1995;83(6):859-69.
208. Ghyselinck NB, Dupé V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, et al. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol*. juin 1997;41(3):425-47.
209. Subbarayan V, Kastner P, Mark M, Dierich A, Gorry P, Chambon P. Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR gamma 1 and RAR gamma 2 isoforms. *Mech Dev*. août 1997;66(1-2):131-42.
210. Li E, Sucov HM, Lee KF, Evans RM, Jaenisch R. Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the alpha 1 retinoic acid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 févr 1993;90(4):1590-4.



211. Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M, Chambon P. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell*. 21 mai 1993;73(4):643-58.
212. Mendelsohn C, Mark M, Dollé P, Dierich A, Gaub MP, Krust A, et al. Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev Biol*. nov 1994;166(1):246-58.
213. Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Dev Camb Engl*. oct 1994;120(10):2749-71.
214. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development*. 1994;120(10):2723-2748.
215. Grondona JM, Kastner P, Gansmuller A, Décimo D, Chambon P, Mark M. Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARgamma2 compound mutant mice. *Dev Camb Engl*. juill 1996;122(7):2173-88.
216. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*. 23 sept 1994;78(6):987-1003.
217. Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, et al. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev*. 1 janv 1996;10(1):80-92.
218. Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 août 1996;93(17):9010-4.
219. Wendling O, Chambon P, Mark M. Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 janv 1999;96(2):547-51.
220. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev*. 1 mai 1994;8(9):1007-18.
221. Underwood BA. Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable « pox ». *J Nutr*. janv 2004;134(1):231S-236S.
222. Clugston RD, Huang L-S, Blaner WS. Chronic alcohol consumption has a biphasic effect on hepatic retinoid loss. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. sept 2015;29(9):3654-67.
223. Berthout A, Sellam M, Denimal F, Lalau J-D, Milazzo S. [The eye and anorexia nervosa. A case report]. *J Fr Ophtalmol*. juin 2007;30(6):e15.
224. Thacher SM, Vasudevan J, Chandraratna RA. Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Curr Pharm Des*. janv 2000;6(1):25-58.
225. Singh P, Tyagi M, Kumar Y, Gupta KK, Sharma PD. Ocular chemical injuries and their management. *Oman J Ophthalmol*. 2013;6(2):83-6.
226. Kligman AM, Grove GL, Hirose R, Leyden JJ. Topical tretinoin for photoaged skin. *J Am Acad Dermatol*. oct 1986;15(4 Pt 2):836-59.



227. Koo J, Lebwohl M. Duration of remission of psoriasis therapies. *J Am Acad Dermatol.* juill 1999;41(1):51-9.
228. Brogden RN, Goa KE. Adapalene. A review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of mild to moderate acne. *Drugs.* mars 1997;53(3):511-9.
229. Ablain J, de Thé H. Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 nov 2014;135(10):2262-72.
230. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 25 janv 1996;379(6563):335-9.
231. Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.* sept 2002;1(4):705-20.
232. Shim JH, Shin DW, Noh MS, Lee TR. Reduced collagen internalization via down-regulation of MRC2 expression by UVA irradiation and its recovery by all-trans retinoic acid. *J Dermatol Sci.* févr 2014;73(2):163-6.
233. Kruse FE, Tseng SC. Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* avr 1994;35(5):2405-20.
234. Gouveia RM, Connon CJ. The effects of retinoic acid on human corneal stromal keratocytes cultured in vitro under serum-free conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* nov 2013;54(12):7483-91.
235. Quintero Barceinas RS, García-Regalado A, Aréchaga-Ocampo E, Villegas-Sepúlveda N, González-De la Rosa CH. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. *BioMed Res Int.* 2015;2015:404368.
236. Levenson SM, Gruber CA, Rettura G, Gruber DK, Demetriou AA, Seifter E. Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing. *Ann Surg.* oct 1984;200(4):494-512.
237. Wicke C, Halliday B, Allen D, Roche NS, Scheuenstuhl H, Spencer MM, et al. Effects of steroids and retinoids on wound healing. *Arch Surg Chic Ill 1960.* nov 2000;135(11):1265-70.
238. Smolin G, Okumoto M. Vitamin A acid and corneal epithelial wound healing. *Ann Ophthalmol.* mai 1981;13(5):563-6.
239. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol.* mars 1983;95(3):353-8.
240. Kim EC, Kim TK, Park SH, Kim MS. The wound healing effects of vitamin A eye drops after a corneal alkali burn in rats. *Acta Ophthalmol (Copenh).* nov 2012;90(7):e540-546.
241. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging.* 2006;1(4):327-48.
242. Samarawickrama C, Chew S, Watson S. Retinoic acid and the ocular surface. *Surv Ophthalmol.* juin 2015;60(3):183-95.



243. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care [Internet]*. 2015 [cité 26 janv 2016];19. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464872/>
244. Vetrugno M, Maino A, Cardia G, Quaranta GM, Cardia L. A randomised, double masked, clinical trial of high dose vitamin A and vitamin E supplementation after photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol*. mai 2001;85(5):537-9.
245. Pinnell SR, Martin GR. The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. oct 1968;61(2):708-16.
246. Kim Y, Boyd CD, Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem*. 31 mars 1995;270(13):7176-82.
247. Saito H, Papaconstantinou J, Sato H, Goldstein S. Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J Biol Chem*. 28 mars 1997;272(13):8157-60.
248. Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, Jia L, Csiszar K. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics*. 1 juin 2001;74(2):211-8.
249. Asuncion L, Fogelgren B, Fong KS, Fong SF, Kim Y, Csiszar K. A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. nov 2001;20(7):487-91.
250. Trackman PC, Pratt AM, Wolanski A, Tang SS, Offner GD, Troxler RF, et al. Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: complete codons and predicted amino acid sequence. *Biochemistry (Mosc)*. 22 mai 1990;29(20):4863-70.
251. Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J, Kagan HM. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem*. 25 avr 1992;267(12):8666-71.
252. Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysinase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem*. 22 mars 1996;271(12):7113-9.
253. Kagan HM, Sullivan KA, Olsson TA, Cronlund AL. Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochem J*. 1 janv 1979;177(1):203-14.
254. Cox TR, Erler JT. Lysyl oxidase in colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 15 nov 2013;305(10):G659-666.
255. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;70:1-32.
256. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 1 mars 2003;88(4):660-72.
257. Gacheru SN, Trackman PC, Shah MA, O'Gara CY, Spacciapoli P, Greenaway FT, et al. Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J Biol Chem*. 5 nov 1990;265(31):19022-7.





258. Kosonen T, Uriu-Hare JY, Clegg MS, Keen CL, Rucker RB. Incorporation of copper into lysyl oxidase. *Biochem J.* 1 oct 1997;327 ( Pt 1):283-9.
259. Wang SX, Mure M, Medzihradsky KF, Burlingame AL, Brown DE, Dooley DM, et al. A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science.* 23 août 1996;273(5278):1078-84.
260. Matsuzaki R, Fukui T, Sato H, Ozaki Y, Tanizawa K. Generation of the topa quinone cofactor in bacterial monoamine oxidase by cupric ion-dependent autooxidation of a specific tyrosyl residue. *FEBS Lett.* 12 sept 1994;351(3):360-4.
261. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 1 juill 2008;79(1):7-13.
262. Cronshaw AD, Fothergill-Gilmore LA, Hulmes DJ. The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem J.* 15 févr 1995;306 ( Pt 1):279-84.
263. Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, et al. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 22 juin 2001;276(25):22537-43.
264. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci CMLS.* oct 2006;63(19-20):2304-16.
265. Siegel RC. Biosynthesis of collagen crosslinks: increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1974;71(12):4826-30.
266. Molnar J, Fong KSK, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SFT, et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta.* 11 avr 2003;1647(1-2):220-4.
267. Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, Bryant-Greenwood GD, Boyd CD, Csiszar K. The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem.* 30 avr 1999;274(18):12939-44.
268. Mäki JM, Tikkanen H, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* nov 2001;20(7):493-6.
269. Ito H, Akiyama H, Iguchi H, Iyama K, Miyamoto M, Ohsawa K, et al. Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J Biol Chem.* 29 juin 2001;276(26):24023-9.
270. Hein S, Yamamoto SY, Okazaki K, Jourdan-LeSaux C, Csiszar K, Bryant-Greenwood GD. Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta.* janv 2001;22(1):49-57.
271. Poletini J, Silva MG, Kacerovsky M, Syed TA, Saade GR, Menon R. Screening of lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase like (LOXL) enzyme expression and activity in preterm prelabor rupture of fetal membranes. *J Perinat Med.* 1 janv 2016;44(1):99-109.
272. Casey ML, MacDonald PC. Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization. *J Clin Endocrinol Metab.* janv 1997;82(1):167-72.



273. Liu C, Zhu P, Wang W, Li W, Shu Q, Chen Z-J, et al. Inhibition of lysyl oxidase by prostaglandin E2 via EP2/EP4 receptors in human amnion fibroblasts: Implications for parturition. *Mol Cell Endocrinol*. 27 janv 2016;
274. Siegel RC, Pinnell SR, Martin GR. Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 10 nov 1970;9(23):4486-92.
275. Okkelman IA, Sukaeva AZ, Kirukhina EV, Korneenko TV, Pestov NB. Nuclear translocation of lysyl oxidase is promoted by interaction with transcription repressor p66 $\beta$ . *Cell Tissue Res*. nov 2014;358(2):481-9.
276. Kagan HM, Williams MA, Calaman SD, Berkowitz EM. Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 août 1983;115(1):186-92.
277. Giampuzzi M, Oleggini R, Di Donato A. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta*. 11 avr 2003;1647(1-2):245-51.
278. Saad FA, Torres M, Wang H, Graham L. Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 juin 2010;396(4):944-9.
279. El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, Collmann AY, Wood D, Scherber CM, et al. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 oct 2012;109(43):17460-5.
280. Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schödel J, Mole DR, Campean V, et al. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem*. 26 févr 2010;285(9):6658-69.
281. Herranz N, Dave N, Millanes-Romero A, Morey L, Díaz VM, Lórenz-Fonfría V, et al. Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Mol Cell*. 11 mai 2012;46(3):369-76.
282. Moon H-J, Finney J, Xu L, Moore D, Welch DR, Mure M. MCF-7 cells expressing nuclear associated lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) exhibit an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenotype and are highly invasive in vitro. *J Biol Chem*. 18 oct 2013;288(42):30000-8.
283. Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mäkikallio K, Kivirikko KI, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 5 nov 2002;106(19):2503-9.
284. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*. févr 2004;36(2):178-82.
285. Payne SL, Hendrix MJC, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem*. 15 août 2007;101(6):1338-54.
286. Kuivaniemi H, Korhonen RM, Vaheri A, Kivirikko KI. Deficient production of lysyl oxidase in cultures of malignantly transformed human cells. *FEBS Lett*. 20 janv 1986;195(1-2):261-4.
287. Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, et al. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res*. 15 sept 2004;64(18):6410-5.



288. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SFT, et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* 15 déc 2005;65(24):11429-36.
289. López B, González A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* juill 2010;299(1):H1-9.
290. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arterioscler Dallas Tex.* août 1981;1(4):287-91.
291. Counts DF, Evans JN, Dipetrillo TA, Sterling KM, Kelley J. Collagen lysyl oxidase activity in the lung increases during bleomycin-induced lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* déc 1981;219(3):675-8.
292. Carter EA, McCarron MJ, Alpert E, Isselbacher KJ. Lysyl oxidase and collagenase in experimental acute and chronic liver injury. *Gastroenterology.* mars 1982;82(3):526-34.
293. Siegel RC, Chen KH, Greenspan JS, Aguiar JM. Biochemical and immunochemical study of lysyl oxidase in experimental hepatic fibrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1978;75(6):2945-9.
294. Liu SB, Ikenaga N, Peng Z-W, Sverdlov DY, Greenstein A, Smith V, et al. Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 23 déc 2015;
295. Rimar D, Rosner I, Nov Y, Slobodin G, Rozenbaum M, Halasz K, et al. Brief report: lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* mars 2014;66(3):726-30.
296. Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li W-J. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis.* 2015;11(1):1-15.
297. Franklin TJ. Therapeutic approaches to organ fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* janv 1997;29(1):79-89.
298. Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* mai 2008;21(4):218-24.
299. Joyce EM, Moore JJ, Sacks MS. Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* mai 2009;144 Suppl 1:S121-127.
300. Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet EJHG.* mai 2010;18(5):511-8.
301. Royce PM, Camakaris J, Danks DM. Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem J.* 15 nov 1980;192(2):579-86.
302. Kempainen R, Hämäläinen ER, Kuivaniemi H, Tromp G, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Expression of mRNAs for lysyl oxidase and type III procollagen in cultured fibroblasts from patients with the Menkes and occipital horn syndromes as determined by quantitative polymerase chain reaction. *Arch Biochem Biophys.* 1 avr 1996;328(1):101-6.



303. Yeowell HN, Pinnell SR. The Ehlers-Danlos syndromes. *Semin Dermatol.* sept 1993;12(3):229-40.
304. Sartoris DJ, Luzzatti L, Weaver DD, Macfarlane JD, Hollister DW, Parker BR. Type IX Ehlers-Danlos syndrome. A new variant with pathognomonic radiographic features. *Radiology.* sept 1984;152(3):665-70.
305. Kuivaniemi H, Peltonen L, Kivirikko KI. Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am J Hum Genet.* juill 1985;37(4):798-808.
306. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye Lond Engl.* févr 2014;28(2):189-95.
307. Dudakova L, Liskova P, Trojek T, Palos M, Kalasova S, Jirsova K. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. *Exp Eye Res.* nov 2012;104:74-81.
308. Coral K, Angayarkanni N, Madhavan J, Bharathselvi M, Ramakrishnan S, Nandi K, et al. Lysyl oxidase activity in the ocular tissues and the role of LOX in proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* nov 2008;49(11):4746-52.
309. Nentwich MM, Ulbig MW. Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 15 avr 2015;6(3):489-99.
310. Nelson JM, Diegelmann RF, Cohen IK. Effect of beta-aminopropionitrile and ascorbate on fibroblast migration. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* juill 1988;188(3):346-52.
311. Lazarus HM, Cruikshank WW, Narasimhan N, Kagan HM, Center DM. Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* déc 1995;14(9):727-31.
312. Li W, Liu G, Chou IN, Kagan HM. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 12 juin 2000;78(4):550-7.
313. Segond N, Degrelle SA, Berndt S, Clouqueur E, Rouault C, Saubamea B, et al. Transcriptome analysis of PPAR $\gamma$  target genes reveals the involvement of lysyl oxidase in human placental cytotrophoblast invasion. *PloS One.* 2013;8(11):e79413.
314. Orriols M, Guadall A, Galán M, Martí-Pàmies I, Varona S, Rodríguez-Calvo R, et al. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling. Insight from a new animal model. *Thromb Haemost.* oct 2014;112(4):812-24.
315. Lerman RH, Apstein CS, Kagan HM, Osmers EL, Chichester CO, Vogel WM, et al. Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ Res.* sept 1983;53(3):378-88.
316. Stephens EH, Nguyen TC, Blazejewski JG, Vekilov DP, Connell JP, Itoh A, et al. Extracellular matrix remodeling in wound healing of critical size defects in the mitral valve leaflet. *Heart Vessels.* 12 nov 2015;
317. Lau Y-KI, Gobin AM, West JL. Overexpression of lysyl oxidase to increase matrix crosslinking and improve tissue strength in dermal wound healing. *Ann Biomed Eng.* août 2006;34(8):1239-46.





318. Hattori M, Shimizu K, Katsumura K, Oku H, Sano Y, Matsumoto K, et al. Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol*. avr 2012;250(4):557-63.
319. Nelson DL, Balian G. The effect of retinoic acid on collagen synthesis by human dermal fibroblasts. *Coll Relat Res*. mars 1984;4(2):119-28.
320. Chanchevalap S, Nandan MO, Merlin D, Yang VW. All-trans retinoic acid inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by inhibiting expression of the gene encoding Kruppel-like factor 5. *FEBS Lett*. 3 déc 2004;578(1-2):99-105.
321. Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juill 1996;10(9):1002-13.
322. Olateju OI, Pather N, Kramer B. The proliferative effect of all-trans retinoic acid during wound healing: A compromised effect in the presence of dimethyl sulphoxide. *Wound Pract Res J Aust Wound Manag Assoc*. nov 2012;20(4):190.
323. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, Rodríguez-Romo LN, López-Otero A, Hernández-Arizpe A, et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol*. 2009;122(1):1-5.
324. Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F, Abas WABW, Choi JR, Omar SZ, et al. Phenotypic and Functional Characterization of Long-Term Cryopreserved Human Adipose-derived Stem Cells. *Sci Rep [Internet]*. 15 avr 2015 [cité 4 avr 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397835/>
325. Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, Jang S-J, Park J-S, Ullah I, et al. DMSO- and Serum-Free Cryopreservation of Wharton's Jelly Tissue Isolated from Human Umbilical Cord. *J Cell Biochem*. 2 avr 2016;
326. Toft JH, Lian IA, Tarca AL, Erez O, Espinoza J, Eide IP, et al. Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. avr 2008;21(4):267-73.
327. Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 avr 2006;103(14):5478-83.
328. Várkonyi T, Nagy B, Füle T, Tarca AL, Karászi K, Schönleber J, et al. Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta*. févr 2011;32 Suppl:S21-29.
329. Heissig F, Krause J, Bryk J, Khaitovich P, Enard W, Pääbo S. Functional analysis of human and chimpanzee promoters. *Genome Biol*. 2005;6(7):R57.
330. Tuggle CK, Wang Y, Couture O. Advances in swine transcriptomics. *Int J Biol Sci*. 2007;3(3):132-52.
331. Srinivasan R, Scolari VF, Lagomarsino MC, Seshasayee ASN. The genome-scale interplay amongst xenogene silencing, stress response and chromosome architecture in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. janv 2015;43(1):295-308.



332. Gupta A, Kumar P. Possible Simple Measures for Complex Wound Healing Problems in Ehlers-Danlos Syndrome. *Plast Reconstr Surg Glob Open* [Internet]. 7 nov 2014 [cité 6 avr 2016];2(10). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4236386/>
333. Cheung IMY, McGhee CNJ, Sherwin T. A new perspective on the pathobiology of keratoconus: interplay of stromal wound healing and reactive species-associated processes. *Clin Exp Optom*. mars 2013;96(2):188-96.
334. Quintero RA. Treatment of previable premature ruptured membranes. *Clin Perinatol*. sept 2003;30(3):573-89.
335. Engels AC, Van Calster B, Richter J, DeKoninck P, Lewi L, De Catte L, et al. Collagen plug sealing of iatrogenic fetal membrane defects after fetoscopic surgery for congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. janv 2014;43(1):54-9.
336. Brubaker CE, Kissler H, Wang L-J, Kaufman DB, Messersmith PB. Biological performance of mussel-inspired adhesive in extrahepatic islet transplantation. *Biomaterials*. janv 2010;31(3):420-7.
337. Marceau G, Gallot D, Borel V, Lémery D, Dastugue B, Dechelotte P, et al. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 août 2006;346(4):1207-16.
338. Loureiro KD, Kao KK, Jones KL, Alvarado S, Chavez C, Dick L, et al. Minor malformations characteristic of the retinoic acid embryopathy and other birth outcomes in children of women exposed to topical tretinoin during early pregnancy. *Am J Med Genet A*. 15 juill 2005;136(2):117-21.
339. Chien AL, Qi J, Rainer B, Sachs DL, Helfrich YR. Treatment of Acne in Pregnancy. *J Am Board Fam Med JABFM*. avr 2016;29(2):254-62.
340. Yang D, Hladnik L. Treatment of acute promyelocytic leukemia during pregnancy. *Pharmacotherapy*. juin 2009;29(6):709-24.
341. Avivi I, Brenner B. Management of acute myeloid leukemia during pregnancy. *Future Oncol Lond Engl*. juin 2014;10(8):1407-15.
342. Cucchiari M, McNulty AL, Mauck RL, Setton LA, Guilak F, Madry H. Advances in combining gene therapy with cell and tissue engineering-based approaches to enhance healing of the meniscus. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 5 avr 2016;
343. Kuo CY, Kohn DB. Gene Therapy for the Treatment of Primary Immune Deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep*. mai 2016;16(5):39.



# ANNEXES



# Annexe n°1

(Publication soumise à Scientific reports)

## « **Lysyl oxidase-like 4 involvement in retinoic acid epithelial wound healing.** »

Comptour A, Rouzair M, Belville C, Bonnin N, Daniel E,  
Chiambaretta F, Blanchon L and Sapin V.

Ce travail, réalisé par A. Comptour, a été mené en parallèle à ma principale étude de thèse (publication n°2). Il s'intéresse également aux propriétés pro-cicatrisantes de l'atRA au niveau de l'épithélium cornéen.

La vitamine A est déjà largement utilisée comme agent thérapeutique et notamment en ophtalmologie où elle potentialise la cicatrisation. Toutefois, les mécanismes moléculaires (régulation de gènes) et cellulaires (migration, prolifération...) responsables de ses propriétés pro-cicatrisantes sur la cornée restent encore aujourd'hui mal caractérisés. Dans le but d'améliorer et de mieux maîtriser l'utilisation de la vitamine A dans le traitement de lésions oculaires telles que les brûlures, ce travail visait d'une part à étudier l'effet de l'atRA sur la cicatrisation de l'épithélium cornéen en utilisant un modèle de blessure *in vitro* (cellules épithéliales cornéennes) et un modèle *in vivo* de brûlures cornéennes par base chez la souris. De plus, ce travail visait à identifier des gènes régulés par l'atRA dans la cornée et impliqués dans ses propriétés pro-cicatrisantes. Ainsi, cette étude a permis de démontrer que l'atRA favorisait la cicatrisation de l'épithélium cornéen en augmentant la migration cellulaire *via* un mécanisme dépendant de l'induction du gène LOXL4, membre de la famille des lysyl oxydases.





# Retinoic acid promotes wound healing on HCE cells and on corneal alkali burns mouse model

Comptour, Aurelie<sup>1</sup>; Rouzaire, Marion<sup>1</sup>; Bonnin, Nicolas<sup>1, 2</sup>; Daniel, Estelle<sup>1, 2</sup>; Belville,  
Corinne<sup>1, 3</sup>; Chiambaretta, Frederic<sup>1, 2</sup>; Sapin, Vincent<sup>1</sup>; Blanchon, Loic<sup>1</sup>

1. Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 – Retinoids, Reproduction Developmental Diseases, School of Medicine, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
2. CHU Clermont-Ferrand, Ophtalmology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
3. Clermont Université, Université d'Auvergne, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author and reprint request: Dr BLANCHON Loïc, Université d'Auvergne, EA7281, 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: [loic.blanchon@udamail.fr](mailto:loic.blanchon@udamail.fr)



## **Abstract: (electronic word count: 167)**

Vitamin A and its active forms (retinoic acids/RAs) are known to have pro-healing properties but their mechanism of action is still poorly understood. This work aimed to clarify by which cellular and molecular processes atRA (all-trans RA) improves wound healing using an *in vivo* model of corneal alkali burns in mice and an *in vitro* cellular model. First, we studied the regulation by atRA of the most cellular events implied in wound healing and then, the direct influence of atRA target gene, known to be implied in the extra cellular matrix dynamics (ECM).

Together, our data demonstrate that atRA promotes epithelial wound healing in animal and HCE models by preferentially acts on migration. Then, we characterized a gene, LOXL4, which expression is induced by atRA in the cornea epithelium and we proved that it is essential in the mechanism of atRA dependent wound healing. This result described for the first time a link between a vitamin A induced gene and protein and its general clinical pro-healing properties.

## **Introduction**

Corneal epithelial wound repair is a complex and dynamic process arriving after traumatism such as for example alkali burns, which lead to severe loss of visual acuity (1). Comparable to the healing of skin or bronchial epithelium, this ocular wound implied important events such as migration (to cover the defective surface), proliferation (to reestablish the epithelial stratification) and differentiation of stem cells as it was previously described (2-4). Numerous studies were already conducted to better understand and explained this phenomenon at the cornea level by using animal models and *in-vitro* tests (5). In addition, corneal epithelial wound repair is dependent of the dynamic of the extracellular matrix (ECM), which plays an important role in the re-epithelialization by promoting cell adhesion and migration (6,7). Among all compounds already describe to have pro-healing properties, Vitamin A and its active derivatives must be considered as one of the most studied. First of all, it is well known that vitamin A and its active derivatives (retinoic acids/RA) are essential for many physiological and developmental events from embryogenesis to adulthood (8). Particularly, in vision, they are required for eye morphogenesis and to maintain the



integrity of the cornea by insuring normal growth and differentiation of the epithelium layer (9,10). Furthermore, Vitamin A deficiency (VAD) leads to ocular defects such as abnormal differentiation of ocular surface epithelium resulting in keratinization and ulceration, superficial punctate keratitis and loss of conjunctival goblets cells (11,12), simply reverted for keratinization by an atRA ointment treatment in a VAD xerophthalmic rabbit model (13). As nutrient intake or directly on the wound site surface, it was already demonstrated that vitamin A and its active derivatives have positive effect on wound healing (11,14,15) and particularly deals, since the seventies, with its positive influence on cornea epithelium repair (16-22). Moreover, This signalling pathway was already demonstrated to be present and functional in the human cornea epithelium (23).

The pleiotropic effects of RA are mediated by ligand dependent nuclear receptors called respectively retinoic acid receptors (RARs)  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  and retinoid X receptors (RXRs)  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . Today it is well admitted that members of the RAR family are activated by most of vitamin A active metabolites (atRA (all trans RA), 9-cis RA)) whereas, members of the RXR family are only activated by 9-cis RA (24,25). The transcriptional regulation of target genes was achieved by the binding of the heterodimer RAR/RXR to specific promoter sequences called RARE (Retinoid Acid Response Element) composed classically by two direct repeats of an hexameric motif (DR) (26,27).

The complete and precise mechanisms by which Vitamin A and its active derivative, such as atRA, promote wound healing are poorly understood. In fact, only few genes were characterized to be both transcriptionally regulated by Vitamin A and implied in various healing process (16,28) particularly coming from work realized few years ago, which describe a direct link between ECM dynamics and wound healing. For example, the plasminogen activator system, containing the tPA (tissue type plasminogen activator) gene regulated by retinoid as already described (29) must be precisely controlled in order to permit an ideal wound healing of rat cornea (30). Focusing on the ECM dynamics, one family of genes: the lysyl oxidase family, appears to be of particular interest in order to better explain this process. Not only implied in ECM remodeling but also in many biological functions in tumor or healthy tissues (migration, cell adhesion, metastasis (31-33), the lysyl oxidase family is a family of copper dependent amine oxidase enzyme that initiates the covalent crosslinking between component chains of collagen and elastin. Thus LOX plays a critical role in ECM formation, stabilization and



repair by contributing to the biogenesis of ECM proteins, collagen and elastin [34,35]. Four others LOX-like (LOXL (36), LOXL2 (37), LOXL3 (38) and LOXL4 (39)) proteins have been described. They share 95% of homology between their C-terminal domains, which contains the catalytic domain (40). Lysyl oxidase family are essential and must be precisely controlled because a deregulation of LOX expression was already described in connective tissues diseases such as Ehler-danlos syndrome (41), menke's syndrome (42) and fibrotic diseases (arteriosclerosis) (43). Concerning ocular pathologies, the deregulation of LOX expression and activities is the causes for keratoconus (44), proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment (45). Furthermore, among these LOX-link pathologies, previous results showed that in the case of Ehler-danlos syndrome and keratoconus the healing process is remarkably inefficient (46,47).

In this work, we characterized and demonstrated for the first time a cellular link between the pro-healing properties of vitamin A and a directly induced gene. These results, obtained for the cornea wound healing treatment, open the way to the arising of a fully documented understanding of the Vitamin A pathway positive effects not only considering ocular sphere but more generally the clinical management of wound treatment.

## **Methods**

### **Animals and in vivo model of corneal epithelial wound healing**

Twenty-eight white male CD1 old mice from 4 to 6 weeks weighing approximately 33g were used. At day 0, under general anesthesia with intraperitoneal injection of pentobarbital (0,82mg), a standardized reproducible chemical corneal burn was performed by placing a filter paper (circular, 3.0mm diameter) saturated with NaOH (1N) during 15 sec on the sclero-corneal limbus. Only the right eye of each animal was injured. The wound surface was then washed with Balance Salt Solution® and three times per day, antibiotic (norfloxacin: Chibroxine®, 0,3% eye drop) was applied on it. Finally, each injured corneas were treated by eye drop 6 times daily during 7days. Mice were divided into 4 groups of 7mice receiving a treatment with atRA (1µM) (Sigma) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO/atRA vehicle) (Sigma) or with DMSO (1mM)





(control group) or with DMSO and LOX family enzymatic inhibitor  $\beta$ APN ( $\beta$ -aminopropionitrile) (500  $\mu$ M) (Sigma) or with atRA (1 $\mu$ M) and  $\beta$ APN (500  $\mu$ M).

Wound sizes were determined by staining with fluorescein (0,5%) and photographing at day 0 and 7 under general anesthesia. Areas of wounds were quantified from photographs using imageJ V.1.31.

### **Samples collection**

Treated not burned or burned corneas with DMSO or atRA three times daily during 7days were collected and conserved (by freezing at -80°C for PCR experiments or by cryopreservation in OCT for immunohistochemistry) after sacrifice of mice by cervical dislocation.

### **Cells cultures**

HCE (human corneal epithelial) cells line transformed with SV40 (ATCC/CRL11135) were cultured under standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air, 37°C) in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 nutrient mixture (Ham) (DMEM-F12 +GlutaMAX™-I) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (GE healthcare), 5  $\mu$ g/mL of insulin (Sigma), 0,1  $\mu$ g/mL of cholera toxin (Sigma), 50mg/mL of steptomycin, 50IU/mL of penicillin (PAA), 10 ng/mL of epithelium growth factor, and 0,5% DMSO.

Triple mutant (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ) and rescues RAR $\alpha$  MEF (mouse epithelial fibroblast) cells (obtained from Pr Hugues de Thé (IGBMC, Strasbourg, France)) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum L-glutamine solution (2mM) (Gibco) and 50mg/mL of steptomycin, 50IU/mL of penicillin.

### **In vitro model of corneal epithelial wound healing (scratch assay)**

Confluent HCE cells in four well plates were manually scraped with a pipette tip. After several washing with PBS (1X) (Gibco) to remove cell debris, wounded cells were treated with DMSO (1mM) (control group) or with atRA (1 $\mu$ M) or with DMSO (1mM) and  $\beta$ APN (500  $\mu$ M) or with atRA (1 $\mu$ M) and  $\beta$ APN (500  $\mu$ M) every 24h during 48h. Photographies of wound were taken every 12h under microscope using a 10X objective and wound areas were measured using imageJ every 12h for 48h.



### **Cell Proliferation assay**

BrdU staining was conducted using a 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche). After 48h of scratch assay, HCE cells treated with DMSO, atRA, DMSO +  $\beta$ APN or atRA +  $\beta$ APN were incubated with brdU (10 $\mu$ mol/L) for 45min. Then, wells were washed three times with PBS and cells were fixed with ethanol fixative solution (ethanol 70% in 50mM glycine, pH=2) for 20min at -20°C. After incubation with an anti-brdU antibody (1/25) for 60min at 37°C and washing three times with PBS followed by incubation with an anti-mouse-Ig-alkaline phosphatase (1/25) for 60min at 37°C, color substrate solution was added to cells and bound anti-brdU antibody was visualized by light microscopy. Images were captured with a 10X objective. The percentage of cells in proliferation in each well was calculated by the ratio of brdU positive cells on the number of total cells.

This experiment was repeated four times (each condition in triplicate).

### **Cell migration assay**

Cell migration was assessed with a CytoSelect™ 24-Well Cell migration Assay (8 $\mu$ m, Fluorometric format) (biolabs). After 48h of scratch assay, HCE cells treated with DMSO, atRA, DMSO +  $\beta$ APN or atRA +  $\beta$ APN were put in suspension and placed in the upper chamber. 500 $\mu$ L of media containing 10% fetal bovine serum were then added to the lower well of the migratory plate. After 24h of incubation in a cell culture incubator, migratory cells passed through a polycarbonate membrane (8 $\mu$ m pore size). Non-migratory cells stayed in the upper chamber. Migratory cells were then dislodged from the underside of the membrane with a detachment solution. Finally, migratory cells were stained with CyQuant® GR Dye (Invitrogen) diluted in lysis buffer and quantified by a fluorescence measurement at 480nm/520nm.

This experiment was repeated three times (each condition in duplicate).

### **Enzyme-linked-immunosorbent assay**

Elisa assay was assessed using a commercially LOXL4 Elisa kit (DL-LOXL4-Hu ; Wuxi Donglin sci and tech development co. LTD) on HCE cells lysates according to the manufacturer's instructions. Absorbance of each sample was measured at a wavelength of 450nm. The concentration of LOXL4 in the samples is then determined by comparing the absorbance of the samples to the standard curve. Results were normalized by



measuring the total protein concentration in each sample using BSA protein assay kit (Pierce). Each samples were put down in the microplate in duplicate.

### **Immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments**

Immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments were respectively performed on cryosections (10 $\mu$ m) of mice corneas (4 animals per group) and on HCE cells after 48h of treatment with atRA or DMSO. Slides were first fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) and then incubated with a rabbit polyclonal anti-LOXL4 antibody (1/200) (ab88186 ; abcam) for slides of tissues and cells and a goat polyclonal anti-keratin 12 (1/50) (L-20 sc-17099; santacruz) for slides of cells diluted in a permeabilization buffer overnight. After washing three times in PBS, slides of tissues and cells were respectively incubated with a goat anti-rabbit antibody (Jackson) or donkey anti-goat conjugated with cyanine 3 (Jackson) for 2h. Slides were rinsed with PBS, and nuclei were counterstained with Hoechst (bisBenzimide H 33258) (sigma) (1/10000) for 10 min at RT. Finally, slides were examined under a fluorescent microscope (Zeiss Axiophot). Control samples were obtained without the primary antibody. For induction of LOXL4 protein, quantification of LOXL4 staining was confirmed by ELISA test (data not shown).

### **Plasmids constructions**

For LOXL4 promoter analysis, the different constructs (DR5-1; DR5-2) were obtained using PCR amplifications from BAC (RPCI-11 HS) (fisher) (table 1) and cloned into the pGL3 basic vector containing the firefly Luciferase (pGL3b) (Promega). The mutagenesis of DR5 sites (4 mutated bases in the core sequence) into DR5-1-pGL3b or DR5-2-pGL3b constructs were carried out by PCR (table 1). All the constructions were verified by DNA sequencing (GATC). Human RAR ( $\alpha$ ;  $\beta$ ;  $\gamma$ ) and RXR $\alpha$  expression plasmids were obtained from Pierre Chambon (IGBMC, Strasbourg, France). Co-transfection of pRL-tk vector (1/20) (Promega) containing renilla luciferase allowed the normalization of the transfection efficiency.

### **Transfections in cells**

LOXL4 expression was depleted in HCE cells using a small interfering RNA (siRNA) technique. First of all, HCE cells placed in 6-well plates were treated by atRA or DMSO



for 24h to increase production of LOXL4 by atRA. Then, after a scratch assay, each well was transiently transfected with 1  $\mu$ L of a commercial siRNA (10  $\mu$ M) (SI00142450; QIAGEN) against LOXL4 or 1  $\mu$ L of a nonspecific siRNA (10  $\mu$ M) (siRNA scramble; SI03650318 ; QIAGEN) in 125  $\mu$ L of optiMEM®I (1X) medium (Gibco) mixing with 2,5  $\mu$ L of lipofectamine®RNAiMAX reagent (Invitrogen) in 125  $\mu$ L of optiMEM®I (1X) (incubation for 20min of this mix prior to transfection in cells). Cells were treated by atRA or vehicle DMSO during the transfection and after for 48h. The percentage of wound healing was determined as previously described (part “scratch assay”).

For LOXL4 promoter analysis, HCE cells placed in 6-well plates were transiently transfected with 0.5 $\mu$ g of each human RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  expression plasmids, 1 $\mu$ g of different LOXL4 promoter constructs and 0,05 $\mu$ g pRL-tk vector in presence of 6,4 $\mu$ L of Nanofectin reagent (PAA). After overnight incubation, cells were treated during 48h with atRA or DMSO. Finally, cells were harvested before performing Dual-Luciferase® reporter assay system (Promega) according to the manufacturer’s instructions.

Triple mutant (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ) and rescues RAR $\alpha$  MEF cells were transiently transfected in 6-well plates with 0.5 $\mu$ g of each human RAR $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  and RXR $\alpha$  expression plasmids in presence of 3,2 $\mu$ L of Nanofectin reagent and simultaneously treated with atRA or DMSO during 48hours.

These transfections were repeated three times in duplicate.

### **Quantitative RT-PCR and PCR experiments**

Total RNA was extracted from mice corneas and cell cultures using RNeasyMini Kit (QIAGEN). The cDNA was synthesized from 1 $\mu$ g of RNA using a Superscript III First-Strand-Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). PCR reactions were assessed using TAQ DNA polymerase (Invitrogen). Quantitative RT-PCR reactions were performed using sensifast™SYBR (bioline) and Light Cycler®480 SYBR Green I Master (Roche). Quantification of transcripts was performed independently three times on three independent experiments and normalized by a housekeeping gene (acidic ribosomal phosphoprotein P0; RPLP0). Primers used for PCR and qPCR are detailed in table 1.

### **Statistics**

The data expressed as means  $\pm$  SDs are an average of duplicates or triplicates of three or four independent experiments. Comparison of means was performed by nonparametric





u-test (Mann-Whitney) or Kruskal-wallis test using GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc.). For all studies, values were considered significantly different at  $P < 0.05$ .

### **Study approval**

Mice were maintained and procedures were performed with approval Auvergne regional committee (CEMEA auvergne) in animal facility of the medicine university of Clermont-Ferrand (approval number 63.113.15). All experiments were conducted in accordance with the ARVO resolution for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

### **Results**

#### ***atRA is able to induce corneal wound healing on an in vivo and in vitro model***

*In vivo* study models of wound healing demonstrated that a treatment with atRA (1 $\mu$ M) on mice corneal alkali burns for 7 days improves the ulcer resorption as illustrated by fluorescein staining (Figure 1A). In fact, the % of remaining ulcer is only  $26\pm 7\%$  compared to the DMSO control group (100%) (Figure 1B). *In vitro* scratch assay on HCE cells (Figure 1C) confirmed that, in time, the wound area of cells treated with atRA closes kinetically faster compared to DMSO treated cells. From 12h to 48h (figure 1D), the % of wound area between atRA and DMSO treated cells is always significantly different (as for example till 12h,  $77\pm 5\%$  vs 100%).

#### ***atRA improves wound healing by acting principally on epithelial cells migration***

Then, we investigated by which cellular processes atRA improves wound healing. Migration and proliferation are the most classical events already described to be important in this phenomenon and experiments studying migration on HCE cells showed that a treatment with atRA increases by  $72\pm 5,6\%$  the number of cells in migration (figure 1G) compared to the DMSO condition. No differences were found concerning cell proliferation (figure 1E, F). Finally, to be sure that atRA does not affect the epithelial characteristic of HCE cells during the healing process, Keratin 12 (K12) staining (which forms the intermediate filaments in epithelial cells and is a specific



marker, (48, 49) was realized. Results shown in Figure 1H revealed no significant changes in the repartition and intensity of the signal between both conditions of treatment (DMSO or atRA).

### ***LOXL4 is induced by atRA in HCE cells at transcript and protein levels***

In order to clarify the atRA wound healing action, we first checked the presence of all the isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) of the retinoic nuclear receptors RAR and RXR in our cellular model of HCE (figure 2A top panel). Based on transcriptomic results obtained in our lab (unpublished data), we decided to focus our interest on the Lysyl oxidase genes family. Then, PCR analysis permit us to demonstrate that all LOX-like genes are expressed in HCE cells (figure 2A bottom panel). Q-PCR experiments realized on HCE cells treated by atRA showed that only LOXL4 is induced from 12h ( $1,28\pm 0,1$ ) to 60h ( $2,71\pm 0,35$ ) by atRA treatment (figure 2B and data not shown for other family members). Transcript results were confirmed at protein level by immunocytochemistry experiment where protein accumulation is increased by a  $1,9\pm 0,2$  factor after 48h of treatment (figure 2D) as illustrated on photographs in figure 2C.

### ***The atRA induction of LOXL4 gene transcription passed by RAR $\alpha$ fixation on one DR5 site***

To detail the action of retinoid signaling pathway in this gene regulation, triple mutant (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ) and RAR $\alpha$  rescue MEF cells were used. First, we checked in TM triple mutant cells by PCR the expression of the different LOX members family (figure 3A, top panel). Then, we validated by PCR our control transfections (figure 3A, bottom panel) after 12h of transfection and in RAR $\alpha$  rescue cell the sole present of this isoform. Then, to determine which isoforms of RAR is the most implied in the activation of LOXL4, we used transiently transfected of RAR $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  triple mutant cells which demonstrated that only the RAR $\alpha$  transfection could lead to an atRA induction of LOXL4 expression ( $1,7\pm 0,08$ ). This result is confirmed by the used of TM rescue RAR $\alpha$  MEF cells where the induction of LOXL4 by atRA is stronger ( $8,5\pm 0,7$ ) (figure 3B).



Bio-informatic studies using Genomatix® software permitted us to underline the presence of two DR5 (50) in the promoter of LOXL4, DR5-1 (-1247, -1271pb) and DR5-2 (-4122, -4146pb) (figure 3C). Transient transfection in HCE cells of the two different constructs (DR5-1 and DR5-2), each containing one DR5 demonstrated after atRA treatment that DR5-2 (induction factor of  $2,3 \pm 0,3$ ) looks like to be implied in the atRA-dependent regulation of LOXL4 transcription (figure 3C). This result was confirmed by mutagenesis studies, which demonstrated a total loss of LOXL4 induction when the DR5-2 is mutated (Figure 3C).

### ***LOXL4, induced by atRA is essential for in-vitro wound healing of HCE cells***

After having demonstrated that LOXL4 is the only member of the family retino-induced, we studied its involvement in the wound healing process promoted by atRA by using again the scratch assay technique and an enzymatic inhibitor of LOX family,  $\beta$ APN ( $\beta$ -aminopropionitrile). In agreement with the literature (51, 52), we first demonstrated that a concentration of 500  $\mu$ M is not toxic for our cells model by measuring LDH (lactate dehydrogenase) in media (data not shown). Then, cells were treated by atRA or a combination of atRA +  $\beta$ APN and results clearly underlined that the significant difference in the % of wound healing between DMSO and atRA treated cells disappeared when  $\beta$ APN is used in combination with atRA. For example, at 48h of scratch assay the % of wound area is 100% for vehicle,  $40 \pm 7\%$  for atRA condition and  $111 \pm 9\%$  for cells treated with atRA+  $\beta$ APN (figure 4A). The influence of LOX enzymatic inhibition was then tested on cell proliferation and migration as already described in figure 1F and G. Again, no difference of the % of cells in proliferation between cells treated with vehicle and cells treated with atRA neither with cells treated with  $\beta$ APN (Figure 4B). On the other hand,  $\beta$ APN treatment clearly prevents cell migration as demonstrated in figure 4C (compare  $108 \pm 4,7\%$  to  $172 \pm 5,6\%$  for cells treated by atRA+  $\beta$ APN and atRA respectively).

Because  $\beta$ APN is not specific to LOXL4, we further confirmed the specific implication of LOXL4 in wound healing by a siRNA technique.

First, we checked the efficiency of siRNA transfection on LOXL4 expression at transcript (affecting induced and endogenous) and protein levels (Figure 4). In details, experiments of qPCR have shown that, in cells transfected by siRNA scramble, LOXL4 is



induced by atRA by a factor of  $1,6\pm 0,14$  but in cells transfected by siRNA against LOXL4, the expression of LOXL4 is strongly reduced (figure 4D). At protein level, experiments of immunohistochemistry revealed that, in cells transfected by siRNA scramble, LOXL4 staining is stronger for cells treated with atRA and strongly reduced for cells transfected with siRNA against LOXL4 (figure 4E). Quantification of LOXL4 staining (Figure 4F) (verified by an ELISA test, data not shown) confirmed an induction of LOXL4 ( $1,9\pm 0,2$ ) by atRA in cells transfected by siRNA scramble and a reduction of LOXL4 accumulation protein ( $1,0\pm 0,1$ ) when cells were transfected by a siRNA against LOXL4.

Then, we realized a scratch assay in the presence of this siRNA (Figure 4G) which demonstrated that cells transfected with siRNA against LOXL4, the closure of the wound goes back to the level encountered for DMSO treatment (between  $94\pm 1\%$  for 12h and  $118\pm 14\%$  for 36h).

### ***LOXL4, induced by atRA, is essential for in vivo wound healing of mice cornea***

Finally, by going back to our *in vivo* mice model of wound healing, we would like to confirm that LOXL4 plays a major role in this process. By PCR, we first checked the expression of all LOX-like genes (Figure 5A, top panel) and of all the RAR isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (figure 5A, bottom panel). Thus, in order to see if LOXL4 is induced by atRA at protein level in mice cornea, treated not burned or burned corneas with atRA (or vehicle DMSO) were collected for immunohistochemistry experiments (Figure 5B). These experiments revealed that when corneas are burned or not and treated with atRA, a strong accumulation of LOXL4 protein appears specifically in the epithelium zone (figure 5B). Quantification of staining between the different conditions, significantly confirmed previous visual impressions (figure 5C). At last, same experiments on mice were conducted as previously described but in presence or not of  $\beta$ APN and led to the confirmation that LOXL4 is essential for the wound healing process promoted by atRA. As shown in figure 5D, fluorescein staining of the ulcer surface demonstrated that the % of remaining ulcer after 7d of treatment still near 90% for eyes treated with atRA+ $\beta$ APN whereas it is around 26% for eyes treated with atRA (figure 5E).





## Discussion

Corneal wound healing is an essential clinical step in order to recover a visual acuity as best as possible after for example an eye trauma caused by ocular chemical burn. Our study was focused on the effect of atRA on such mechanism using *in-vivo* and *in-vitro* approaches. First, we demonstrated on mice model of alkali burns that atRA is able to promote wound healing as it was previously demonstrated on other animals models and by using Vitamin A [16-19]. Our switching to an *in vitro* model of wounded HCE cells permit us to investigate the cellular and molecular processes by which atRA exerts its action, mechanisms still unknown. Migration, proliferation and differentiation are the most important and described events during the epithelial wound repair. For the first time, we found that atRA, preferentially, acts rather on migration than proliferation (tested by BrDU incorporation) and differentiation (tested by keratin 12 staining) to stimulate wound healing. These results is in agreement with those obtained by Hattori et al but clearly increase, by underlying the importance of the migration process, the knowledge on atRA influence. In fact, these authors have already demonstrated in a model of HCE-T cells that atRA combined with nanoparticles vehicles, used at high concentration, have positive effect on wound healing without effect on cell proliferation or differentiation (17).

Tissue remodeling and especially cell migration are dependent on the balance between destruction and formation of ECM and its ability to mediate cells adhesion (53, 54). Link between atRA or vitamin A regulated genes and ECM dynamic and remodeling was already largely described in several tissues, as for example in the skin (55-56) Concerning the ocular sphere, it has been shown that a treatment with atRA on corneal stromal keratinocytes cultured *in vitro* increases the production of ECM components such as collagen type 1 and reduces the expression of Matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 (responsible for the disintegration of the ECM) (57). Interestingly and particularly for MMP9, it was demonstrated that this one is essential in wound healing process by regulating re-epithelialization and migration of cells (16, 58) and that an abnormal elevation of its amount is correlated with abnormal re-epithelialization in other tissue (59). Following that, and again beside the eye, it was demonstrated that atRA influences more a balance than only an ECM degradation as it was for example



demonstrated concerning the ratio MMP-2/TIMP-2 in a model of cultured human fetal palate mesenchymal cells (60).

In our study, and to describe for the first time a direct relation between a vitamin A regulated gene and the wound healing we decided to focus on another component of the ECM remodeling, the lysyl oxidase family which plays a crucial role by acting on collagen biosynthesis (61). This choice was done according to the fact that a deregulation of them leads to severe connective tissues disorders and ocular pathologies such as for example keratocones (41, 44, 45). For the first time, we demonstrated that, one of LOX-like protein members, LOXL4, is directly induced by atRA at transcript and protein level in HCE cells and mice corneas. The LOXL4 regulation by atRA passed through the nuclear retinoic acid receptor RAR $\alpha$  fixation on the second DR5 in LOXL4 promoter (-4122, -4146pb). Furthermore, we found that this gene is essential for corneal wound healing promoted by atRA on HCE cells and on mice model of corneal injury by promoting cell migration.

Ocular injury is found in approximately 15% to 20% of patients with facial burns (62). Among the ocular injuries, ocular chemical burns represent approximately 10% of eyes trauma (63, 64). The understanding of the pathophysiology of these injuries is essential for improve the management of corneal burns. Several studies on animal models have already demonstrated the positive effect of retinoic acid on corneal wound healing by preventing harmful events, such as for example neovascularization and opacity of the cornea (65, 66). By describing a gene by which atRA and more generally vitamin A are passing to permit wound healing, this work opens the way to the study and the direct targeting of other genes implied in ECM formation and remodeling. Furthermore, this work could be the cornerstone of future clinical therapies that could use vitamin A alone or in combination with others medications and surgical cares already used since numerous years such as amniotic membrane grafts (67, 68).

## **References**

1. Macdonald EC, Cauchi PA, Azuara-Blanco A, and Foot B. Surveillance of severe chemical corneal injuries in the UK. *The British journal of ophthalmology*. 2009;93(9):1177-80.
2. Sharma GD, He J, and Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21989-97.



3. Saika S. Role of p38 MAP Kinase in Regulation of Cell Migration and Proliferation in Healing Corneal Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(1):100-9.
4. Druilhe A, Zahm JM, Benayoun L, El Mehdi D, Grandsaigne M, Dombret MC, Mosnier I, Feger B, Depondt J, Aubier M, et al. Epithelium expression and function of retinoid receptors in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;38(3):276-82.
5. Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, Kyne BM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, and Pajooohesh-Ganji A. Wounding the cornea to learn how it heals. *Experimental eye research*. 2014;121(178-93).
6. Lu L, Reinach PS, and Kao WW. Corneal epithelial wound healing. *Experimental biology and medicine*. 2001;226(7):653-64.
7. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye*. 1994;8 ( Pt 2)(170-83).
8. Clagett-Dame M, and DeLuca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual review of nutrition*. 2002;22(347-81).
9. Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, and Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 1997;211(6):358-61.
10. Warkany J, and Schraffenberger E. Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency; defects of the eye. *Archives of ophthalmology*. 1946;35(150-69).
11. Sommer A. Xerophthalmia and vitamin A status. *Progress in retinal and eye research*. 1998;17(1):9-31.
12. Macsai MS, Agarwal S, and Gamponia E. Bilateral corneal ulcers in primary vitamin A deficiency. *Cornea*. 1998;17(2):227-9.
13. Ubels JL, Edelhauser HF, Foley KM, Liao JC, and Gressel P. The efficacy of retinoic acid ointment for treatment of xerophthalmia and corneal epithelial wounds. *Current eye research*. 1985;4(10):1049-57.
14. MacKay D, and Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2003;8(4):359-77.
15. Elson ML. The role of retinoids in wound healing. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998;39(2 Pt 3):S79-81.
16. Kim EC, Kim TK, Park SH, and Kim MS. The wound healing effects of vitamin A eye drops after a corneal alkali burn in rats. *Acta ophthalmologica*. 2012;90(7):e540-6.
17. Hattori M, Shimizu K, Katsumura K, Oku H, Sano Y, Matsumoto K, Yamaguchi Y, and Ikeda T. Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2012;250(4):557-63.
18. Toshida H, Odaka A, Koike D, and Murakami A. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Current eye research*. 2008;33(1):13-8.
19. Johansen S, Heegaard S, Prause JU, and Rask-Pedersen E. The healing effect of all-trans retinoic acid on epithelial corneal abrasions in rabbits. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 1998;76(4):401-4.



20. Smolin G, Okumoto M, and Friedlaender M. Tretinoin and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(3):545-6.
21. Smolin G, and Okumoto M. Vitamin A acid and corneal epithelial wound healing. *Annals of ophthalmology.* 1981;13(5):563-6.
22. Ubels JL, Edelhauser HF, and Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *American journal of ophthalmology.* 1983;95(3):353-8.
23. Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, and Sapin V. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Molecular vision.* 2007;13(1641-50).
24. Bastien J, and Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004;328(1-16).
25. Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X, and Lefebvre B. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitamins and hormones.* 2005;70(199-264).
26. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, and Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacological reviews.* 2006;58(4):712-25.
27. Al Tanoury Z, Piskunov A, and Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *Journal of lipid research.* 2013;54(7):1761-75.
28. Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Ninomiya T, Arai Y, and Nakamura T. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. *Bone.* 2010;47(6):1006-12.
29. Borel V, Marceau G, Gallot D, Blanchon L, and Sapin V. Retinoids regulate human amniotic tissue-type plasminogen activator gene by a two-step mechanism. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2010;14(6B):1793-805.
30. Hayashi K, Frangieh G, Kenyon KR, Berman M, and Wolf G. Plasminogen activator activity in vitamin A-deficient rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(12):1810-9.
31. Lazarus HM, Cruikshank WW, Narasimhan N, Kagan HM, and Center DM. Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 1995;14(9):727-31.
32. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, and Kirschmann DA. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer research.* 2005;65(24):11429-36.
33. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, and Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 2006;440(7088):1222-6.
34. Kagan HM, and Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of cellular biochemistry.* 2003;88(4):660-72.
35. Smith-Mungo LI, and Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 1998;16(7):387-98.
36. Kim Y, Boyd CD, and Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(13):7176-82.





37. Saito H, Papaconstantinou J, Sato H, and Goldstein S. Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8157-60.
38. Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, Jia L, and Csiszar K. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics*. 2001;74(2):211-8.
39. Asuncion L, Fogelgren B, Fong KS, Fong SF, Kim Y, and Csiszar K. A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2001;20(7):487-91.
40. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2001;70(1-32).
41. Di Ferrante N, Leachman RD, Angelini P, Donnelly PV, Francis G, and Almazan A. Lysyl oxidase deficiency in Ehlers-Danlos syndrome type V. *Connective tissue research*. 1975;3(1):49-53.
42. Royce PM, Camakaris J, and Danks DM. Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *The Biochemical journal*. 1980;192(2):579-86.
43. Kagan HM, Raghavan J, and Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis*. 1981;1(4):287-91.
44. Dudakova L, Liskova P, Trojek T, Palos M, Kalasova S, and Jirsova K. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. *Experimental eye research*. 2012;104(74-81).
45. Coral K, Angayarkanni N, Madhavan J, Bharathselvi M, Ramakrishnan S, Nandi K, Rishi P, Kasinathan N, and Krishnakumar S. Lysyl oxidase activity in the ocular tissues and the role of LOX in proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):4746-52.
46. Malfait F, Wenstrup RJ, and De Paepe A. Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010;12(10):597-605.
47. Wojcik KA, Blasiak J, Szaflik J, and Szaflik JP. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta biochimica Polonica*. 2014;61(1):55-62.
48. Chen WY, Mui MM, Kao WW, Liu CY, and Tseng SC. Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Current eye research*. 1994;13(10):765-78.
49. Liu CY, Zhu G, Converse R, Kao CW, Nakamura H, Tseng SC, Mui MM, Seyer J, Justice MJ, Stech ME, et al. Characterization and chromosomal localization of the cornea-specific murine keratin gene Krt1.12. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(40):24627-36.
50. Duong V, and Rochette-Egly C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(8):1023-31.
51. Shih YH, Chang KW, Chen MY, Yu CC, Lin DJ, Hsia SM, Huang HL, and Shieh TM. Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2013;35(2):250-6.
52. Saad FA, Torres M, Wang H, and Graham L. Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;396(4):944-9.



53. Pelham RJ, Jr., and Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):13661-5.
54. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL, Hoffman RM, Figdor CG, Weiss SJ, and Friedl P. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *The Journal of cell biology*. 2013;201(7):1069-84.
55. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, and Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;379(6563):335-9.
56. Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, and Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *The New England journal of medicine*. 1993;329(8):530-5.
57. Gouveia RM, and Connon CJ. The effects of retinoic acid on human corneal stromal keratocytes cultured in vitro under serum-free conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7483-91.
58. Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, and Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *Journal of cellular physiology*. 2009;221(2):402-11.
59. Rayment EA, Upton Z, and Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *The British journal of dermatology*. 2008;158(5):951-61.
60. Li X, Zhang L, Yin X, Gao Z, Zhang H, Liu X, Pan X, Li N, and Yu Z. Retinoic acid remodels extracellular matrix (ECM) of cultured human fetal palate mesenchymal cells (hFPMCs) through down-regulation of TGF-beta/Smad signaling. *Toxicology letters*. 2014;225(2):208-15.
61. Lucero HA, and Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(19-20):2304-16.
62. Liu H, Wang K, Wang Q, Sun S, and Ji Y. A modified surgical technique in the management of eyelid burns: a case series. *Journal of medical case reports*. 2011;5(373).
63. Jones NP, Hayward JM, Khaw PT, Claoue CM, and Elkington AR. Function of an ophthalmic "accident and emergency" department: results of a six month survey. *British medical journal*. 1986;292(6514):188-90.
64. Herr RD, White GL, Jr., Bernhisel K, Mamalis N, and Swanson E. Clinical comparison of ocular irrigation fluids following chemical injury. *The American journal of emergency medicine*. 1991;9(3):228-31.
65. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2006;104(264-302).
66. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Miyamoto T, Kitano A, Flanders KC, Ohnishi Y, Nakajima Y, Kao WW, and Ikeda K. Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;293(1):C75-86.



67. Sorsby A, and Symons HM. AMNIOTIC MEMBRANE GRAFTS IN CAUSTIC BURNS OF THE EYE: (Burns of the second degree). *The British journal of ophthalmology*. 1946;30(6):337-45.
68. Tseng SC, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H, Liu TS, Cho TH, Gao YY, Yeh LK, et al. How does amniotic membrane work? *The ocular surface*. 2004;2(3):177-87.



## **Figures and legends :**

### **Figure 1: atRA is able to induce corneal wound healing on an *in vivo* and *in vitro* model.**

(A) Representative photographs of burned eyes stained with fluorescein. (B) % of remaining ulcer after 7 days of treatment with atRA compare to DMSO (100%) on burned cornea (7 mice per groups). (C) Representative images of scratch assay of HCE cells. (D) % of wound area of cells treated 48H with atRA compare to DMSO (100%) (n=4 experiments each conducted in triplicate). (E) Representative images of brdU labelling on HCE cells. (F) % of cells in proliferation after 48h of scratch assay on HCE cells treated with atRA compare to DMSO (100%), (n=4 experiments each conducted in triplicate). (G) % of migratory cells after 48h of scratch assay on HCE cells treated with atRA compare to DMSO (100%) (n=3 experiments each conducted in duplicate). (H) Keratin12 expression (Cornea Epithelial cell marker, in red) in HCE cells scratch assay treated for 48H by DMSO or atRA. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Each bar graph shows mean  $\pm$  SD. Mann-whitney u-test; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; ns: No significant.

### **Figure 2: Retino-induction of LOXL4 gene expression and protein synthesis in HCE cells**

(A) Characterization of the retinoic acid nuclear receptors RAR and RXR isoforms ( $\alpha,\beta,\gamma$ ) (top panel) and LOX family members (bottom panel) in HCE cells by PCR. Negative controls (-) were performed in the absence of cDNA. (B) LOXL4 RNA induction in HCE cells treated for 12, 24, 36, 48 and 60h with atRA normalized by housekeeping gene RPLP0 and expressed as a ratio with DMSO (n=5 experiments each conducted in duplicate). (C) Representative pictures of LOXL4 expression (in red) in HCE cells treated for 48H with atRA. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (D) LOXL4 protein synthesis quantified by immunofluorescence on HCE cells treated for 48h with atRA and expressed as a ratio with DMSO (n=3 experiments each conducted in triplicate, 3 quantifications per slide). Each bar graph shows mean  $\pm$  SD. Mann-whitney u-test; \* P<0,05; \*\*\*P<0,001.

### **Figure 3: RAR $\alpha$ is the only isoform implied in the induction of LOXL4 transcription by its fixation on one unique DR5-RARE binding site.**

(A) Characterization of the LOX family members expression in TM (triple mutants) MEF cells (top panel). Characterization of the retinoic acid nuclear receptors RAR and RXR isoforms ( $\alpha,\beta,\gamma$ ) expression (bottom panel, left side) in native and transiently transfected (by rar $\alpha$ , by rar  $\beta$  or by rar  $\gamma$ ). Confirmation of RAR $\alpha$  expression in TM rescue RAR $\alpha$  MEF cells (bottom panel, right side). For each experiment, negative controls (control -) was performed in the absence of cDNA, positive controls represent cDNA from mouse cornea. (B) LOXL4 RNA expression is induced in TM MEF cells transiently transfected with RAR $\alpha$  and in TM rescue RAR $\alpha$  MEF cells treated for 12h with atRA normalized by housekeeping gene RPLP0 and expressed as a ratio with DMSO (n=3 experiments each conducted in duplicate) (Mann-whitney u-test; \*\*\*P<0,001; ns: No significant) . (C) HCE cells transiently transfected with constructs of LOXL4 gene promoter (DR5-1, mutated DR5-1, DR5-2, mutated DR5-2/see schematic representation





of the LOXL4 gene promoter) and RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  expression vectors and treated with atRA for 48h. Luciferase quantification is normalized using “dual luciferase system” and expressed as fold induction relative to DMSO treatment (n=3 experiment each performed in duplicates) (Kruskal-wallis test; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; ns: No significant). Each bar graph shows mean  $\pm$  SD.

**Figure 4: Enzymatic or post-transcriptional inhibition of LOXL4 inhibits the wound healing process promoted by atRA**

(A) % of wound area of cells treated 48H with atRA or atRA +  $\beta$ APN for 48h compare respectively to DMSO or DMSO +  $\beta$ APN (100%) (n=4 experiments each conducted in triplicate) (\*\*\*P<0,0001). (B) % of cells in proliferation after 48h of scratch assay on HCE cells treated with atRA or atRA +  $\beta$ APN for 48h compare respectively to DMSO or DMSO +  $\beta$ APN (100%) (n=4 experiments each conducted in triplicate). (C) % of migratory cells after 48 hours of scratch assay on HCE cells treated with atRA or atRA +  $\beta$ APN for 48h compare respectively to DMSO or DMSO +  $\beta$ APN (100%) compare to DMSO (100%) (n=3 experiments each conducted in duplicate) (\*\*\*P<0,001). (D) LOXL4 mRNA extinction in HCE cells transiently transfected by a siRNA control (scramble) or siRNA against LOXL4 and treated for 48h with atRA. Results were normalized by housekeeping gene RPLP0 and expressed as a ratio with DMSO (n=3 experiments each conducted in duplicate) (\*\*\*P<0,001). (E) Representative pictures of LOXL4 expression (in red) in HCE cells transiently transfected by a siRNA scramble or siRNA against LOXL4 and treated for 48h with atRA. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (F) LOXL4 protein extinction quantified by immunofluorescence on HCE cells transiently transfected by a siRNA scramble or siRNA against LOXL4 and treated for 48h with atRA and expressed as a ratio with DMSO (n=3 experiments each conducted in triplicate, 3 quantifications per slide) (\*\*P<0,01). (G) % of wound area of cells transiently transfected by a siRNA control or a siRNA against LOXL4 and treated for 48h with atRA compare respectively to DMSO condition (n=3 each experiment with triplicate samples) (\*\*\*P<0,001). Each bar graph shows mean  $\pm$  SD. Mann-whitney u-test; ns: No significant.

**Figure 5: atRA passed by LOXL4 protein induction to induce corneal wound healing on an *in vivo* mice model.**

(A) Characterization of the LOX family members expression (top panel) and retinoic acid nuclear receptors RAR isoforms ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (bottom panel) in mouse cornea by PCR. Negative controls (-) were performed in the absence of cDNA. (B) Representative pictures of LOXL4 expression (in red) in not burned corneas (a,b,c) and burned corneas (d,e,f) treated with DMSO (b,e) or atRA (c,f). The nuclei were counterstained with Hoechst (blue), negative controls (a,d) were obtained without primary antibody incubation. (C) Quantification of LOXL4 epithelium staining on no burned and burned corneas treated with atRA. All results are expressed as a ratio with DMSO (n=3 quantification per slide, 4 mice per group). (D) Representative Photographs of burned eyes stained with fluorescein. (E) % of remaining ulcer after 7days of treatment with atRA or atRA +  $\beta$ APN (500 $\mu$ M) compare to DMSO (100%) on burned corneas (7 mice per groups). Bar graphs show mean  $\pm$  SD. Mann-whitney u-test; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, ns: No significant.



Table 1. Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR, RT-qPCR, cloning and mutagenesis

genes	sequence (5'-3')		Product size (bp)	Accession n°
	Forward	reverse		
human LOX	GATACGGCACTGGCTACTTCC	CTGGCCAGACAGTTTCTCTCC	136	NM_002317.5
human LOXL1	AGCATCCACTTATGTGCAGAGA	GAGGAAGTCTGCTGTGCCCT	166	NM_005576.2
human LOXL2	CACTGCGGATCCCTGAAACC	CTGTCTTCGGGCTGATGATCC	103	NM_002318.2
human LOXL3	CAGGCTGCCACATCCTCTG	ATCCTCATCGTGCGTACAGTC	189	NM_032603.3
human LOXL4	Commercial (QIAGEN)		146	NM_032211.6
human RAR $\alpha$	AGTCCTCAGGCTACCACTAT	CCTCCTTCTTCTTGTGTT	225	NM_000964.3
human RAR $\beta$	ATGGATGTTCTGTCAGTGAG	CATAGTGGTACCCTGATGAT	268	NM_000965.4
human RAR $\gamma$	ACCAATAAGGAGCGACTCT	ATCTCCTCTGAGCTGGTG	212	NM_000966.5
human RXR $\alpha$	GGATCCCACACTTCTCAG	GAGTCAGGGTAAAGAGGAC	286	NM_002957.5
human RXR $\beta$	AGTACTGCCGCTATCAGAA	GTTAGTCACAGGGTCATTTG	242	NM_001270401.1
human RXR $\gamma$	CTACACAGATACCCAGTGA	GGGTAGTTCATGTTTCCAAT	249	NM_006917.4
human RPLP0	AGGCTTTAGGTATCACCACT	GCAGAGTTTCTCTGTGATA	219	NM_001002.3
mouse LOX	CATAGATCGCATGGTGGGCG	ACTACATCCAGGCTTCCACGTA	195	NM_010728.3
mouse LOXL1	CGTGCTGGAGCCACCTTACT	TCCTTGCGATGCGCAGCAGA	219	NM_010729.3
mouse LOXL2	GCACACTGAAGACGTTGGAGT	AAGGCTTGGGAAGCAGATCTGC	208	NM_033325.2
mouse LOXL3	GATGATGACTTCACGCTGCAG	GTGACTGTACCCATGATGAGG	205	NM_013586.4
mouse LOXL4	CCAAGTATGGTCAAGGAGAGG	AAGGTCTCCAATGCCCTCGG	193	NM_001164311.1
mouse RAR $\alpha$	CACCTCAATGGGTACCCAGTA	AAGCAAGGCTGTAGATGCGG	224	NM_009024.2
mouse RAR $\beta$	CTCGTCCCAGAGCCACCATCTCCACTT	GAGGTCGTCTAGCTCCGCTGCATCTC	351	NM_001289761.1
mouse RAR $\gamma$	CTCATCACCAAGGTCAGCAAAGCC	CAGCCCATCCGAGAATGTCATAGT	312	NM_011244.4
mouse RPLP0	CAGGCTTTAGGCATCACCACT	GGGGGAGATGTTGAGCATGTT	132	NM_007475.5
human LOXL4 promoter DR5-1	GAGAGGTACCTCAGCATGAGAGGTGGCTGG	GAGAGCTAGCGGAGGCAGATGTGCAAGTAAG	351	
human LOXL4 promoter DR5-2	GAGAGGTACCCGTGGCCCTGTCAATTAC	GAGAGCTAGCTCACAACCTTCCACTCCTCGG	379	
human LOXL4 promoter mutant DR5-1	GGTGGGGCAGTATAACTGGGGGGA	TCCCCCAGTTATACTGCCACC		
human LOXL4 promoter mutant DR5-2	CCCAGGCATGTATAAGCCACAGGA	TCCTGTGGCTTATACATGCCTGGG		



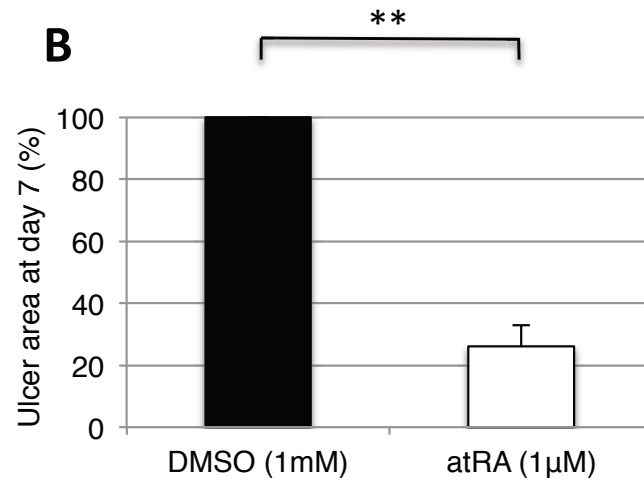
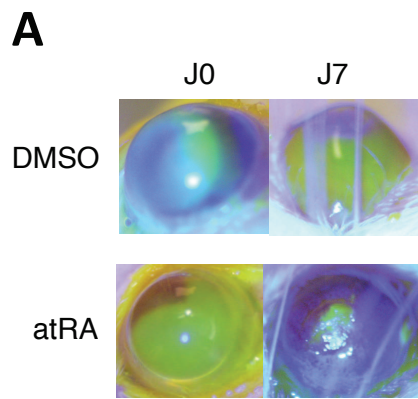


Figure 1: atRA is able to induce corneal wound healing on an *in vivo* and *in vitro* model.

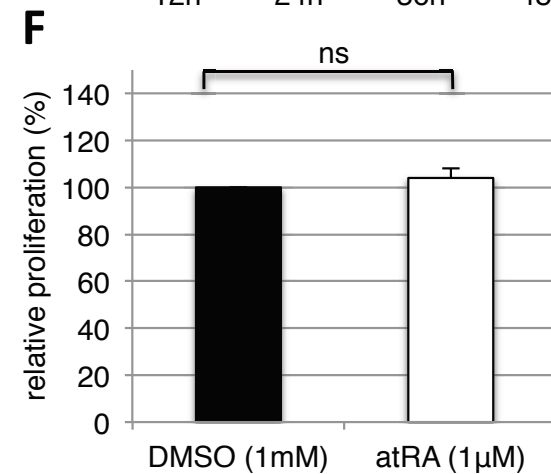
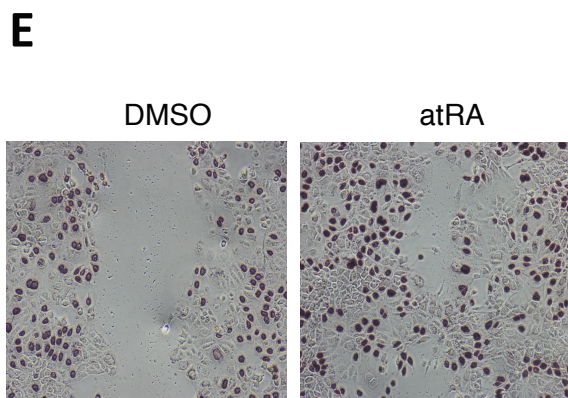
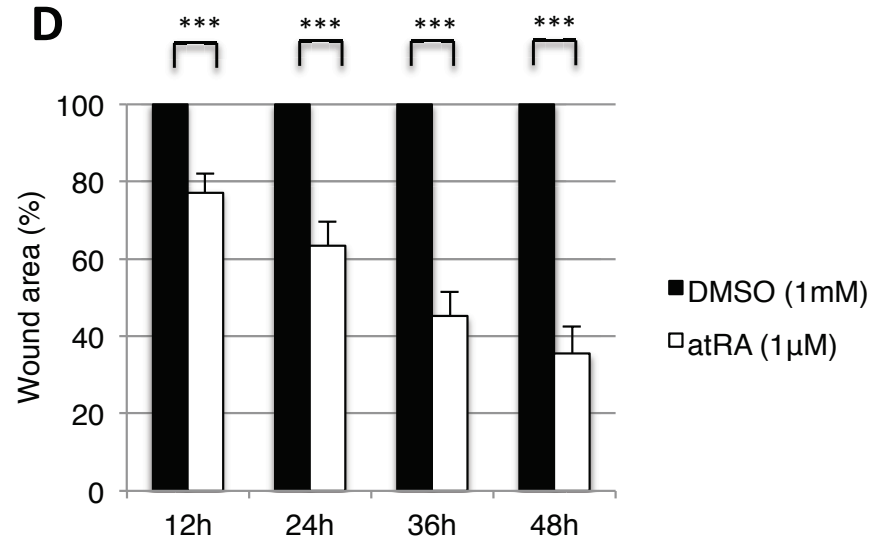
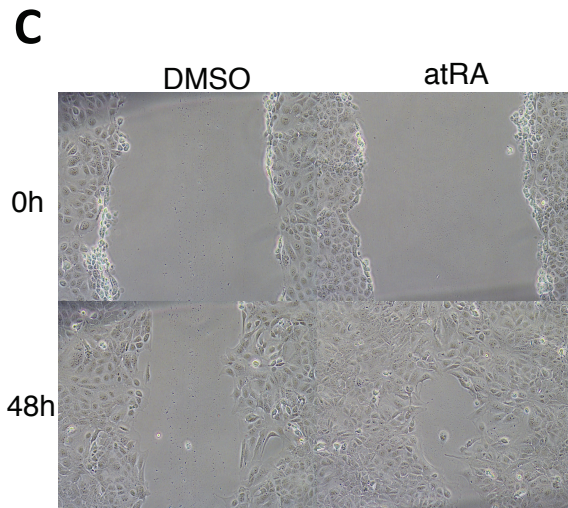
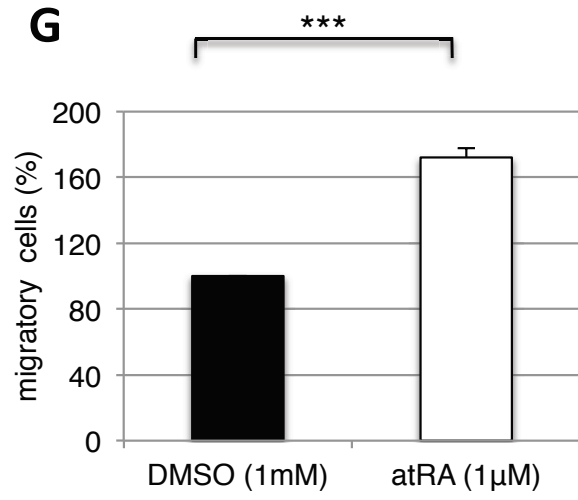


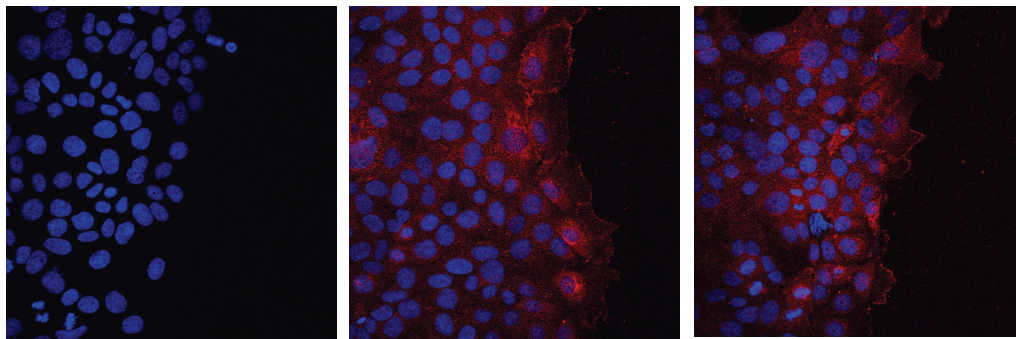
Figure 1, Comptour *et al.*





**H**

Red: keratin 12  
Blue: Hoechst



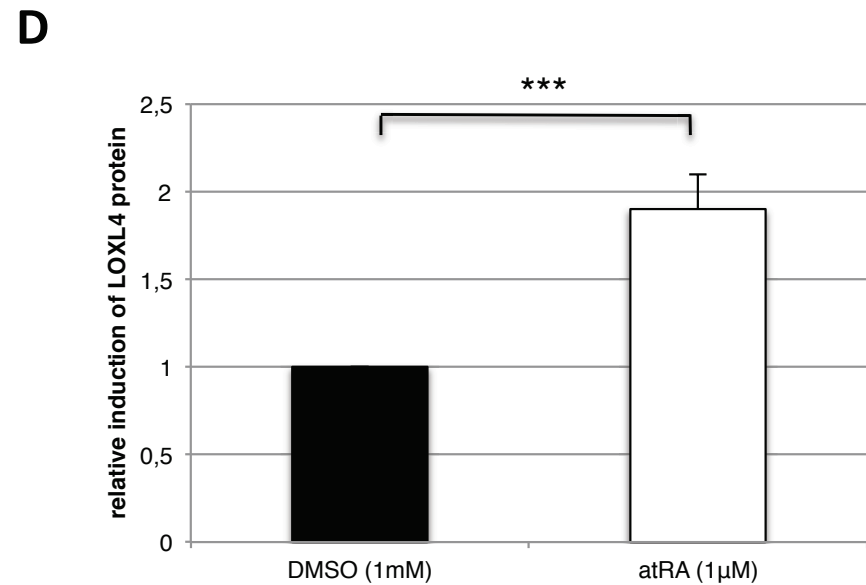
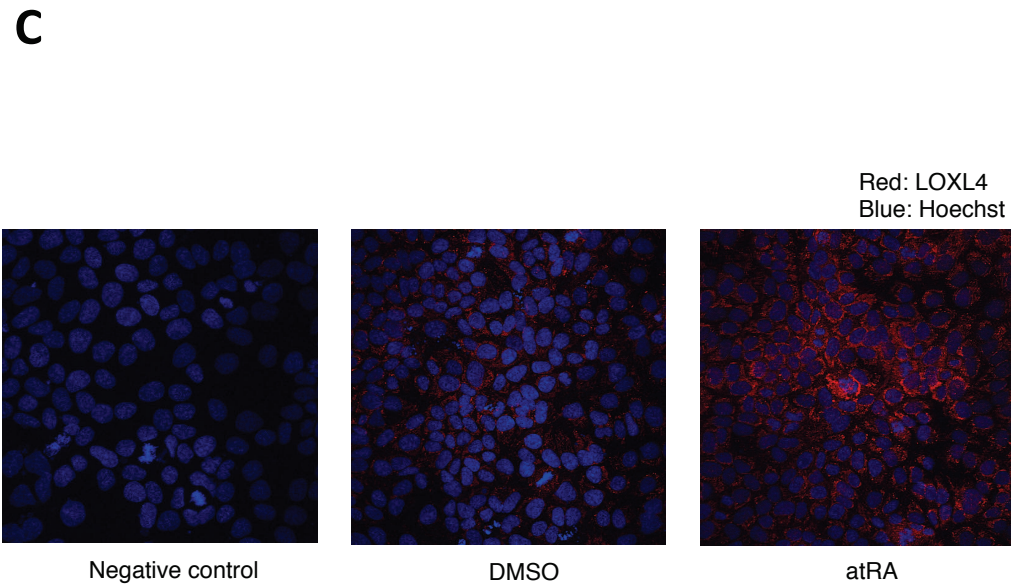
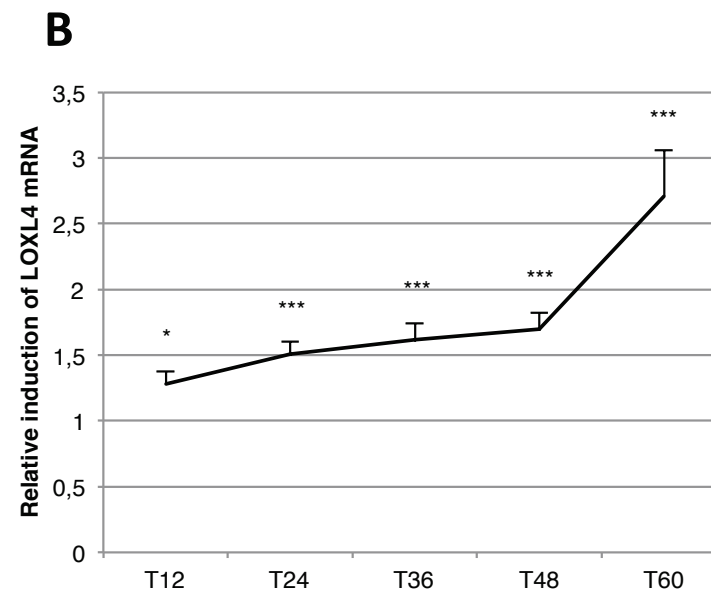
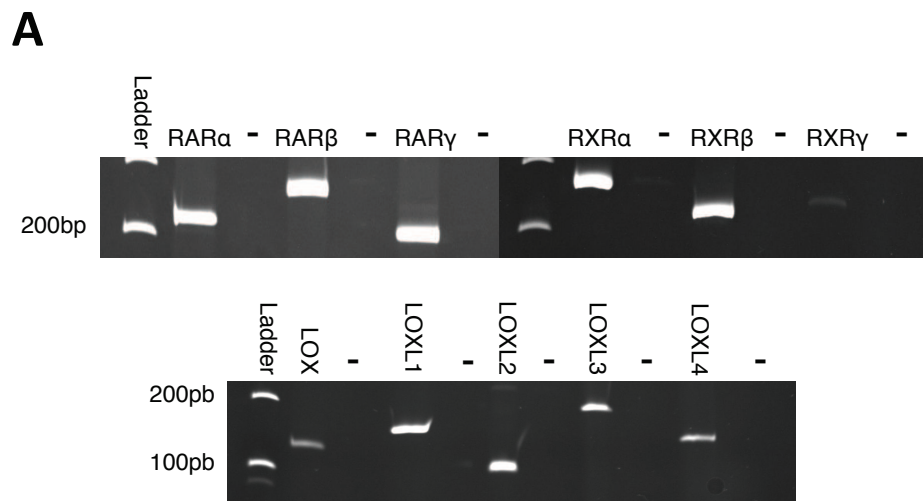
Negative Control

DMSO

atRA

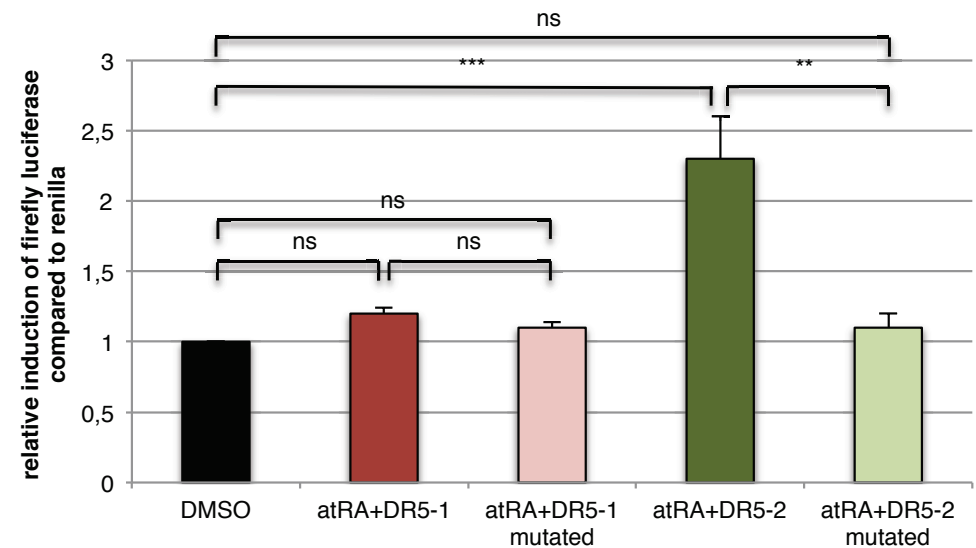
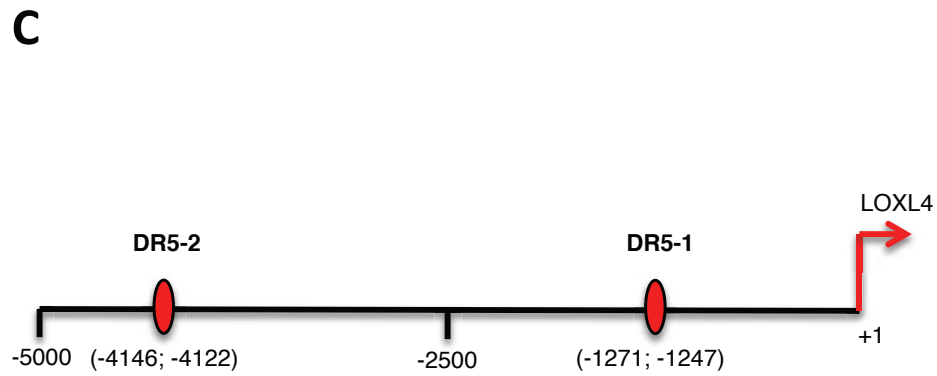
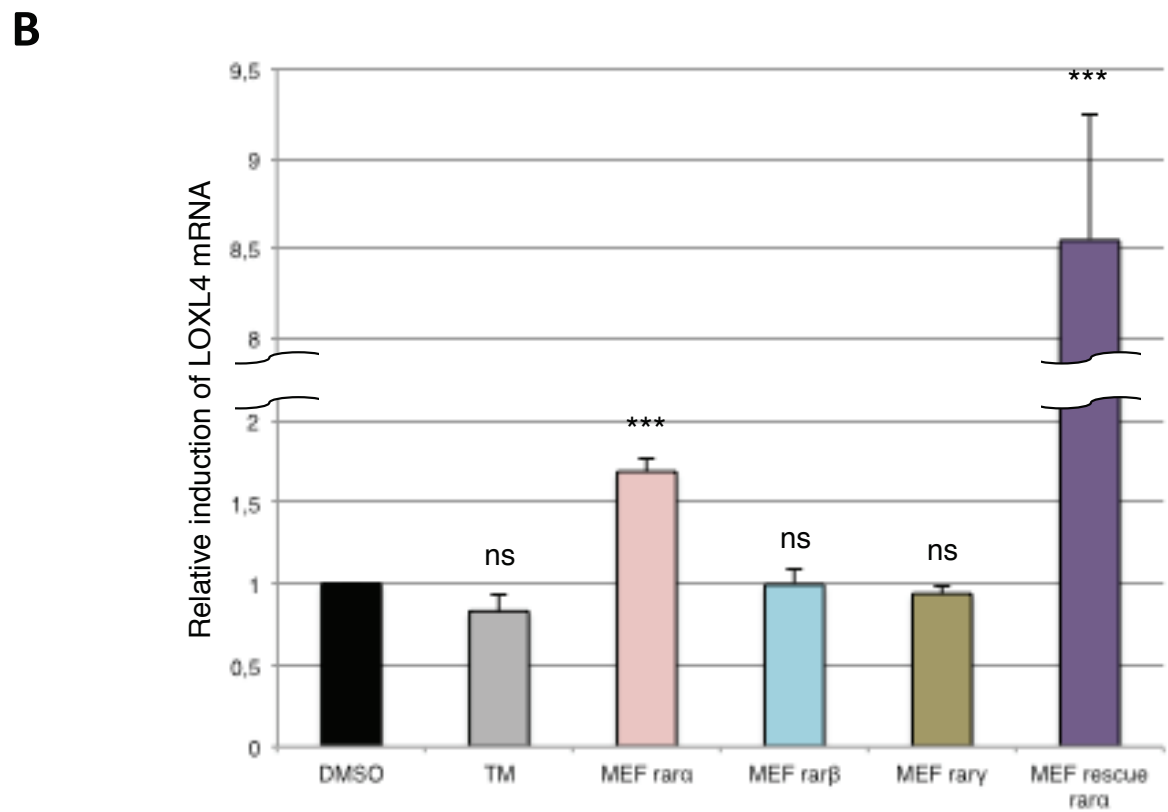
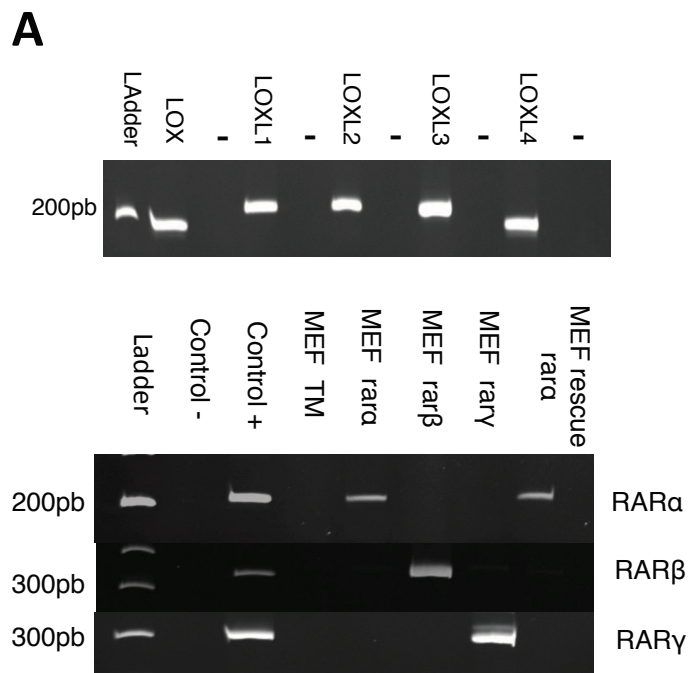






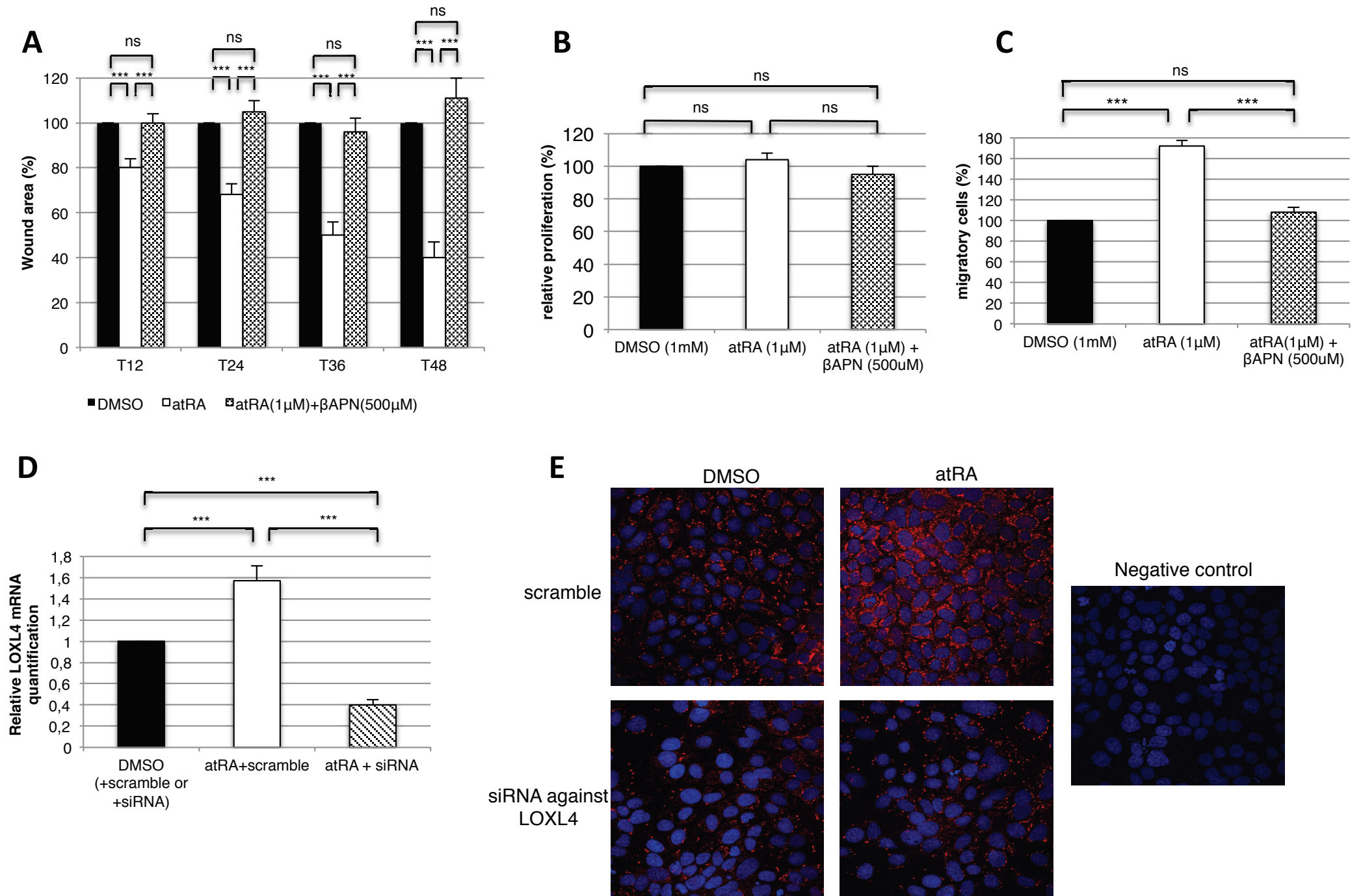
**Figure 2: Retino-induction of LOXL4 gene expression and protein synthesis in HCE cells**





**Figure 3: RAR $\alpha$  is the only isoform implied in the induction of LOXL4 transcription by its fixation on one unique DR5-RARE binding site.**





**Figure 4: Enzymatic or post-transcriptional inhibition of LOXL4 inhibits the wound healing process promoted by atRA**



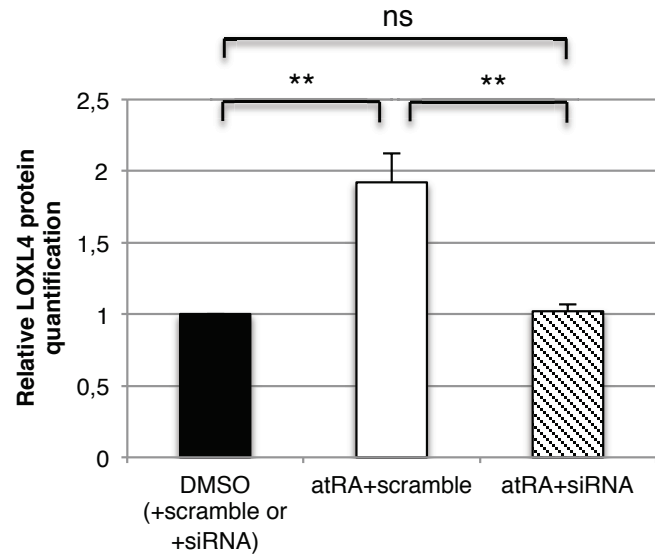
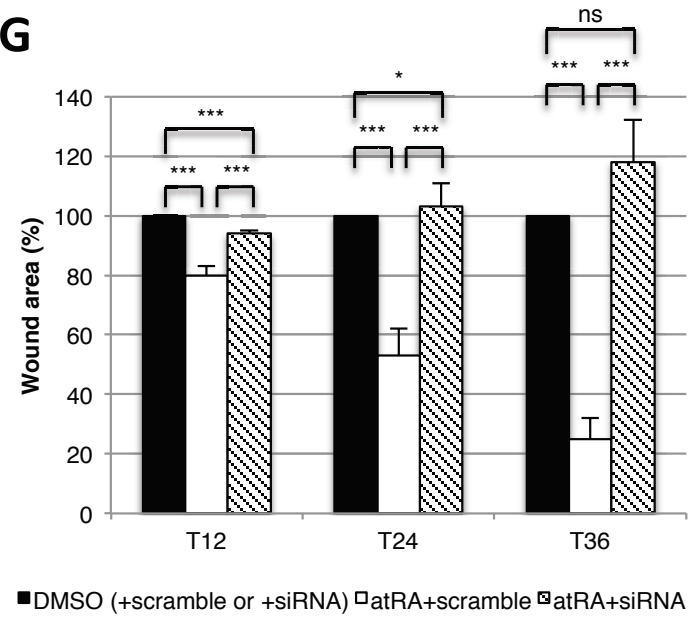
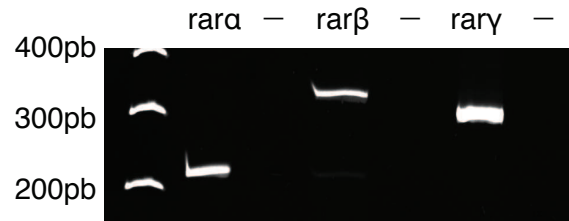
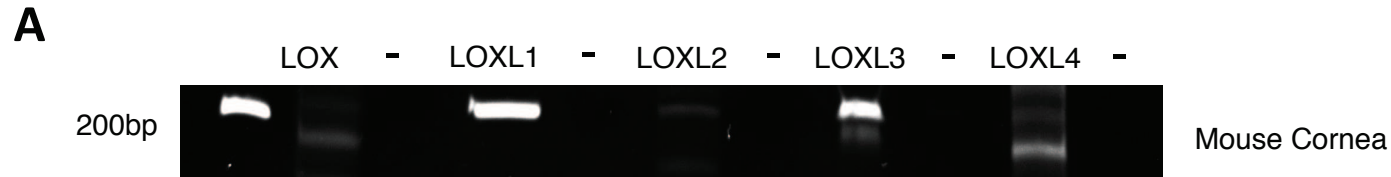
**F****G**





Figure 5: atRA passed by LOXL4 protein induction to induce corneal wound healing on an *in vivo* mice model



**B**

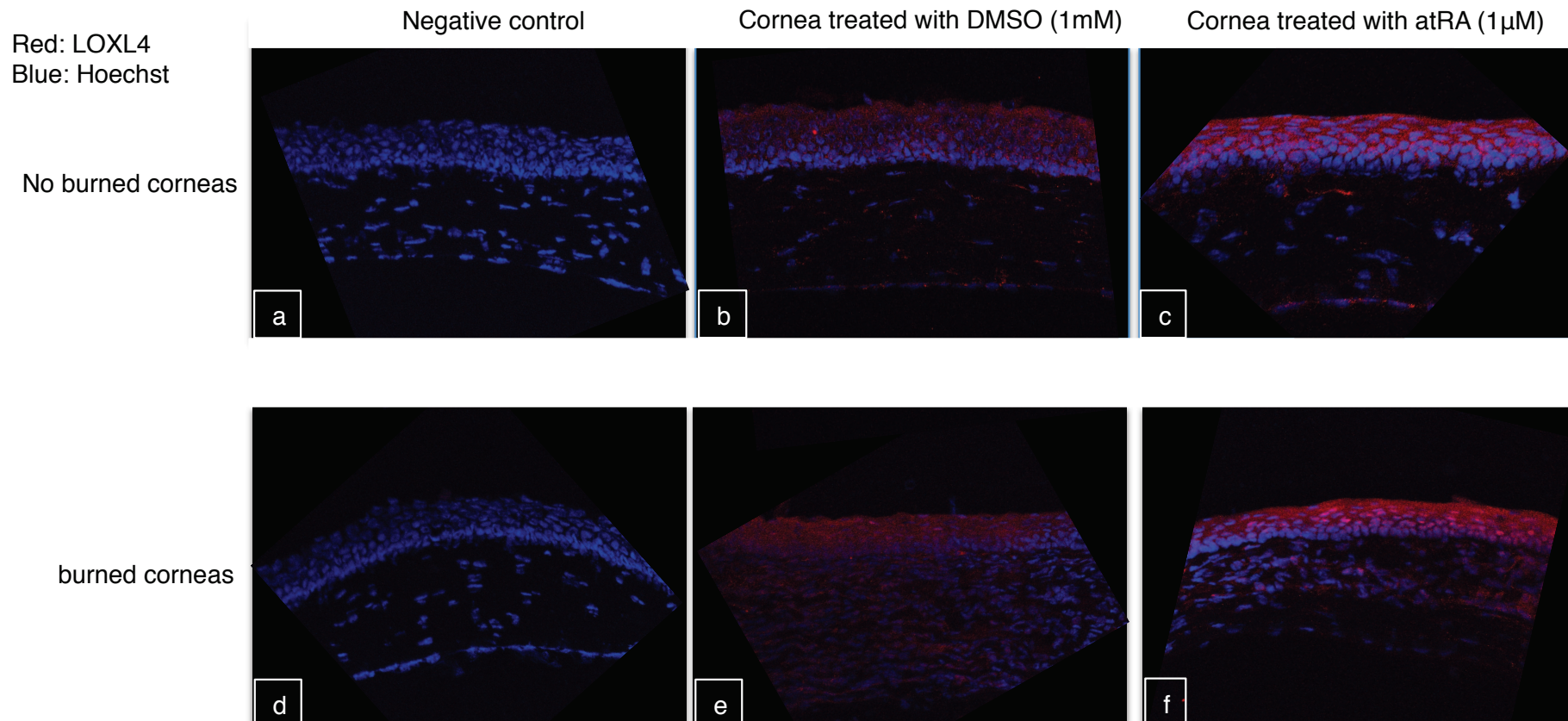


Figure 5, Comptour *et al.*



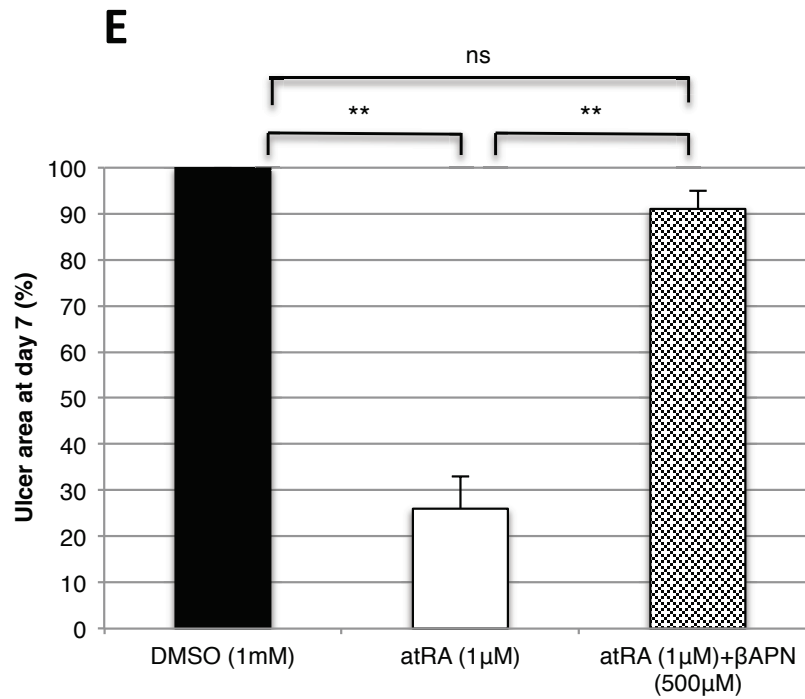
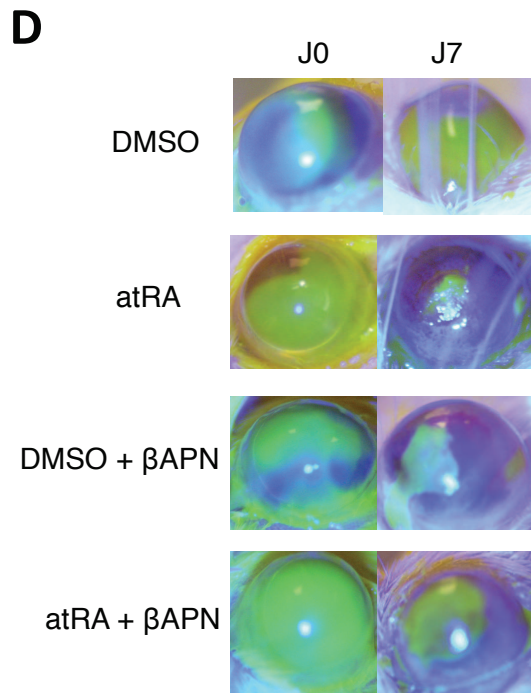
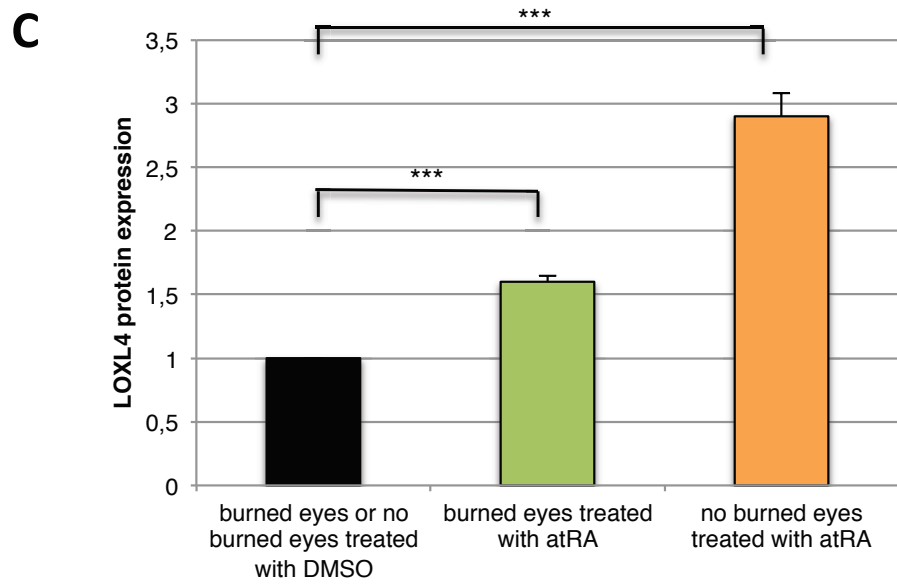


Figure 5, Comptour *et al.*



## Annexe n°2

(Publication en préparation)

### **« Cigarette smoke condensate affects the retinoid pathway in human amnion. »**

**Rouzaire M, Comptour A, Belville C, Bouvier D, Sapin V, Gallot D and Blanchon L.**

A côté de leur rôle crucial dans la placentation et le développement, les rétinoïdes sont de plus en plus décrits dans les membranes fœtales, où ils permettent la régulation de gènes impliqués dans des fonctions essentielles à leur physiopathologie telle que l'homéostasie du liquide amniotique ou l'intégrité de la MEC. La RPM (rupture prématurée des membranes) est une pathologie commune en obstétrique qui est due à une fragilisation des membranes survenant suite à une dégradation de leur MEC. Le tabagisme étant un des facteurs de risque principaux de RPM, des études commencent à s'intéresser à son impact sur les membranes d'un point de vue moléculaire. Dans ce contexte, ce travail visait à tester les effets de la fumée de cigarette sur la voie des rétinoïdes au sein de l'amnios, considéré comme le feuillet le plus résistant. Nous avons ainsi pu démontrer qu'un traitement au condensé de fumée de cigarette (CSC) altérait la transduction du signal de la voie des rétinoïdes en inhibant l'activation des éléments de réponse aux acides rétinoïques dans les cellules épithéliales amniotiques. Sachant que l'amnios est un tissu directement exposé aux composants issus de la fumée de cigarette se trouvant dans le liquide amniotique des fumeuses et que la voie des rétinoïdes est importante pour son intégrité, cette étude propose un lien entre rétinoïdes, tabagisme maternel, fragilisation de la MEC et survenue d'une RPM spontanée.



## **Cigarette smoke condensate affects the retinoid pathway in human amnion.**

Marion ROUZAIRE <sup>a</sup>, Aurélie COMPTOUR <sup>a</sup>, Corinne BELVILLE <sup>a, b</sup>, Damien BOUVIER <sup>a, c</sup>, Vincent SAPIN <sup>a, c</sup>, Denis GALLOT <sup>a, d</sup> and Loïc BLANCHON <sup>a</sup>

a] Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 - Retinoids Reproduction Developmental Diseases, Medicine School, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

b] Clermont Université, Université d'Auvergne, GReD, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

c] CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

d] CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

Corresponding author and reprint request: Professor Vincent Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 place Henri-Dunant, BP38, F-63001 Clermont-Ferrand Cedex, France, Tel: +33 4 73 17 81 74, Fax: +33 4 73 27 61 32, E-mail: [vincent.sapin@udamail.fr](mailto:vincent.sapin@udamail.fr)





## **Abstract**

### Introduction

The preterm premature rupture of membranes (PPROM) is a frequent pathology responsible of more than 30% of preterm birth. Among the numerous risk factor identified, tobacco smoking is one of the most described and may contribute to the weakening of fetal membranes before the term. As previously demonstrated, *all-trans* retinoic acid (atRA) regulates several genes involved in the extracellular matrix dynamics, an essential actor of the fetal membranes rupture. Here, we hypothesis that cigarette smoke may negatively affects the retinoid pathway in human amnion and investigate the mechanism involved.

### Methods

Amnion was obtained from full-term fetal membranes collected from healthy pregnancy of non-smoking women after cesarean births and used either as tissue explants or for the isolation of amnion derived epithelial cells. The pro-healing and transcriptomic effects of atRA were studied by scratch assay experiment and quantitative RT-PCR respectively, after treatment with DMSO, atRA, DMSO + CSC (cigarette smoke condensate) or atRA + CSC.

### Results

Our results show a strong alteration of the retinoid pathway after CSC treatment on amnion derived epithelial cells and explants. We have first demonstrated that CSC inhibits the activity of synthetic RARE in primary amniocytes. Then, the effects of atRA on both transcription and wound healing were demonstrated to be inhibited or at least decreased by the CSC in human amnion.

### Discussion

Here, we demonstrated that CSC altered the retinoid signal, already known to have roles in fetal membrane physiopathology, in human amnion. These results bring new elements on the negative action that could have maternal smoking on molecular and cellular signaling pathways and more generally on pregnancy.



## **Introduction**

Although the dangerous known effects of tobacco during pregnancy, maternal smoking still concerns 10 to 20% of women in high-income countries (1,2) and is responsible of numerous pathologies affecting all the actors of the *in-utero* life. Cigarette smoke is composed of a complex mixture embracing more than 4000 compounds (3), most of which passing easily through the placental barrier (4). Many of them are thereby present in the amniotic fluid such as cadmium (5) and cotinine (6), which is the main metabolite of nicotine. By this way, cigarette smoke compounds can reach the fetus and the embryonary annexes and lead to an increase of 33% of perinatal and neonatal mortality among smokers (7,8). Moreover, maternal smoking has long been associated with several adverse pregnancy outcomes such as spontaneous abortion, placental abruption, placenta previa, fetal growth restriction, childhood cancer or , more recently, with preterm premature rupture of membrane (PPROM) (9–13).

Fetal membranes are composed of two distinct layers: the internal layer, called the amnion, is in contact with the amniotic fluid, and the underlying chorion is in contact with the maternal deciduas (14,15). They both play a crucial role in human pregnancy especially by protecting the fetus against mechanical pressure or external pathogens and by regulating the amniotic fluid homeostasis (16–18). The PPRM, which is defined as their rupture before 37 weeks of gestation is thus considered as a serious pathology, which can lead to preterm birth (1/3 of them are due to PPRM) and perinatal mortality in the most severe cases (19–21). Several factors have been identified to predispose to PPRM, including choriodecidua infection, pollutants exposure and smoking for the most described (22,23). In addition to increasing the risk of PPRM (12,24,25), cigarette smoke seems to have a dose-dependent effect, thus stepping up the risk of developing PPRM at earlier gestational stages among heavy smokers (considered at more than 10 cigarettes per day) (26).

Physiologically, the rupture of the membranes occurs at the end of the pregnancy just after the onset of labor. This phenomenon is highly regulated and involves a step by step mechanism ending with the amnion fracture (27). Several elements contribute to this rupture. First, internal pressures greatly increase during labor due to the uterine contractions but also to the fetal movements. Beside these mechanical factors, fetal membranes undergo drastic histological and biochemical modifications leading to their weakening at the end of pregnancy, thus enabling the rupture (28). The extracellular matrix (ECM) dynamic plays a major role in this programmed weakening process. Indeed, an imbalance between the ECM production and degradation at the end of the pregnancy has been widely demonstrated in the literature and appears as one of the main factor responsible of fetal membranes weakening allowing the rupture (29,30).



Vitamin A and its active derivatives are well described to have a role in the regulation of the extracellular matrix in many tissues both during the development and the adulthood (31–35). More importantly, the retinoid pathway is functional in human fetal membranes (36) and appears as a modulator of genes involved in important physiologic processes such as amniotic fluid homeostasis (37) and interestingly ECM dynamics (38,39).

Based on that and on the involvement of vitamin A in fetal membranes physiopathology, we have investigated the effect of cigarette smoke on the retinoid pathway in human fetal membranes and especially in the amnion, often considered as the strongest layer. In this study, we demonstrate that cigarette smoke condensate (CSC) treatment affects the response to atRA, the active derivative of Vitamin A, both in amnion derived epithelial cells and explants. Indeed, our results show that CSC treatment decreases the activation of synthetic retinoic acid response element (RARE) transfected in primary derived amniocytes. In accordance with this result, CSC is also able to decrease previously demonstrated effects of atRA on human amnion such as its ability to induce its target genes and to promote wound healing.

## **Methods**

### **Chemicals**

All-trans retinoic acid (atRA) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Cell culture media were obtained from Gibco®, Life Technologies (Carlsbad, United States). Fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (streptomycin and penicillin) were purchased from GE healthcare (Buckinghamshire, United Kingdom). Collagen I was obtained from Stemcell (Grenoble, France). Superscript IV First-Strand-Synthesis System for RT-PCR, taq polymerase and lipofectamine3000 were obtained from Life Technologies. CSC (40 mg/ml in DMSO) was obtained from Murty Pharmaceuticals (Lexington, KY, USA). It was prepared from Kentucky standard cigarettes 3R4F (University of Kentucky, KY) which were smoked using a Phipps-Bird 20-channel smoking machine designed for Federal Trade Commission testing. The particulate matter was then trapped onto filters and dissolved in DMSO.

### **Samples collection**

Full-term fetal membranes were collected from healthy pregnancies of non-smoking women after cesarean births (Centre Hospitalier Universitaire Estaing, Clermont-Ferrand, France) and informed consent of the mother. The research protocol was approved by the institutional regional ethics committee. Amnion was dissociated from the chorion and used, on the one hand as tissue explants, and on the other hand, for the culture of primary amniocytes.



## **Cell and tissue culture**

Amnion explants and primary amniocytes were cultivated under standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air, 37°C) in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 nutrient mixture (DMEM-F12 + GlutaMAX™-I) supplemented with 10% FBS, 50 mg/ml of streptomycin and 50 IU/ml of penicillin.

Amnion explants were prepared by cutting squares of 1cm<sup>2</sup> after three washes in PBS. The isolation of primary amniotic epithelial cells was conducted by several trypsinization steps and scraping of the amnion. Cells were filtered to remove the collagen, centrifuged 5 min at 1000 rpm and grown on culture dishes coated with collagen I (BioCoat™, Spectralab, Markham, Canada) in complete media.

## **Scratch assay experiments**

Primary amniocytes were grown to 100% confluence on 4-well plates coated with collagen I and a wound was made using a pipette tip to scratch the cell layer. Then cells were treated with either atRA (1 μM) or DMSO (vehicle of atRA) in equal quantity, with atRA (1 μM) and CSC (100 μg/ml) or with DMSO and CSC (100 μg/ml). Treatments were repeated at 24 h. Wound pictures were done after 24 and 48 h under microscope using a 100X objective. Wound areas were measured using imageJ software, normalized to the initial area (t<sub>0</sub>) and compare to the control condition (DMSO or DMSO+CSC). Experiment was repeated four times (four independent areas per scratch were quantified).

## **RT-PCR and quantitative RT-PCR**

Human amnion and primary amniocytes were treated with either DMSO (vehicle of atRA) or atRA (1 μM) or with DMSO or atRA (1 μM) in combination with CSC (100 μg/ml for primary amniocytes, 250 μg/ml for amnion explants). Total RNA were extracted from human amnion and primary amniocytes using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit and RNeasyMini Kit, respectively (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The reverse transcription was made from 1 μg of RNA using a Superscript IV First-Strand-Synthesis System for RT-PCR. The induction of *RARβ*, *STRA6*, *SPOCK2*, *LOXL4* and *GALNT12* by atRA were assessed at transcriptomic level by quantitative RT-PCR performed using sensifast™SYBR (Bioline, Paris France) (only for *RARβ*) or Light Cycler®480 SYBR Green I Master (Roche, Lyon, France) after 48 h of treatment. Transcripts quantification was made three times on at least 4 independent experiments. Results were normalized to the housekeeping genes (acidic ribosomal phosphoprotein P0; *RPLP0* and ribosomal protein S17; *RPS17*). Primers sequences are detailed in table 1. All the steps followed the MIQE guidelines (40).





## **CAT assay**

Primary amniocytes were grown at 70% confluence in 6-well plates and transfected with 1 µg of a plasmid expressing the CAT (chloramphenicol acetyltransferase) reporter gene under control of 3 retinoic acid responsive element (DR5), 0.5 µg of human *RARα* and *RXRα* expression plasmid, and 0.05 µg of pCH110 vector which express the β-galactosidase, allowing the normalization of the results to the transfection efficiency. Transfections were performed using 3.75 µl of Lipofectamine3000 and 5 µl of Reagent3000 per well. Cells were treated either with DMSO, atRA, DMSO and CSC or atRA and CSC 6 h after the transfection during 48 h (treatment was repeated after 24 h). Then, the expression of CAT and β-galactosidase were measured using the colorimetric immunoassay from Roche (Lyon, France) and a β-galactosidase assay kit (Agilent, Santa Clara, United States) respectively, according to the manufacturer protocol. This experiment was repeated three times (each condition in duplicate).

## **Statistical analysis**

The data expressed as means ± SDs are an average of duplicates or triplicates of at least four independent experiments. Comparison of means was performed by ANOVA test (Kruskal-wallis) followed by a Dunn's test using GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc.). For all studies, values were considered significantly different at:  $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*).

## **Results**

### **CSC inhibits retinoic acid response element (RARE) activation by atRA on primary derived amniocytes.**

In this context, the effect of CSC on the activation of RARE was assessed by an *in-vitro* system using a reporter plasmid expressing the CAT gene under control of a strong atRA responsive promoter (Fig.1a). The experiments conducted on amnion derived epithelial cells exhibit a strong induction of the CAT reporter gene after atRA treatment compared to DMSO, confirming the reliability of this system. At the opposite, the CAT reporter plasmid construction does not respond anymore to atRA when cells were treated with atRA or DMSO in combination with CSC (Fig.1b).

### **CSC affects the transcriptional effects of atRA on its target genes on primary amniocytes and amnion explants.**

Based on this result demonstrating that CSC negatively affect the response to atRA at transcriptomic level, RT-qPCR experiments were conducted to investigate the effects of CSC on the transcription of atRA target genes previously identified in human amnion (Rouzaiere *et al.*, submitted). The retino-induction of these genes was



confirmed by RT-qPCR on primary amniotic epithelial cells (Fig.2a) and amnion explants (Fig.2b) treated with DMSO or atRA. Such experiment conducted in the same time in combination with a CSC treatment clearly show an inhibition or a decrease of these retino-inductions (still significant) on all the atRA target genes tested, including genes involved in the extracellular matrix (Fig.2a and b, lower panels) as well as genes involved in the retinoid pathway: *RARβ* and *STRA6*, which are well-known atRA induced genes (Fig.2a and b, upper panels).

### **CSC inhibits the pro-healing action of atRA on amnion derived epithelial cells.**

Finally, the effect of CSC on the retinoid pathway was assessed at functional level by scratch assay experiments as previously done (Rouzaire *et al.*, submitted). As expected, scratch assay performed on primary amniocytes treated with atRA or DMSO (vehicle) showed a significant reduction of the wound area in the atRA condition, compare to DMSO after 24 and 48 h of treatment. This pro-healing effect of atRA was completely lost when the scratch assay experiments were conducted with DMSO or atRA in combination with cigarette smoke condensate (CSC), demonstrated that CSC clearly affects the previously demonstrated action of atRA on wound healing (Fig.3).

## **Discussion**

Here, we demonstrate that CSC alters the retinoid pathway in human amnion. Such a path appearing important for the physiopathology of human fetal membranes and especially for the regulation of the extracellular matrix dynamics, these results provide new elements to understand the effects of maternal smoking on this tissue whose integrity is essential for an healthy pregnancy. A couple of *in vitro* studies have already been conducted on amnion derived cells and explants to investigate the effects of cigarette smoke on human fetal membranes. One of the hypotheses suggests that cadmium, a cigarette smoke component, is able to decrease copper availability by increasing metallothioneins synthesis in amnion derived cells. This might affect the activity of copper-dependant enzymes such as lysyl oxidases, which are essential for collagen cross-link and thus for amnion integrity (41). Beside this study, Menon et al. have demonstrated that cigarette smoke extract lead to oxidative damages and cell apoptosis on amnion derived cells and explants (42,43). Thereby, cigarette smoke could conduct to a weakening of fetal membranes and promote the rupture. This pathophysiologic pathway seems to be independent of the infection one, which is the other important factor predisposing to PPRM (44).



Here, we found clear evidence that the retinoid signal is affected by CSC whether at the transcriptional level, as showed by the study of atRA target genes, or at functional level, demonstrated by *in vitro* wound healing assay. Given the numerous effects of vitamin A in various important biological functions, the effect of cigarette smoke on the retinoid pathway has already been investigated by other teams. These studies, mostly conducted on lung tissues, clearly demonstrate an alteration of the retinoid pathway after cigarette smoke exposure, which seems to affect numerous actors of the pathway, including catabolic enzymes (45), retinoic acid receptors (RAR $\alpha$  and  $\beta$ ) (46) and retinol level itself (47). Moreover, vitamin A supplementation or retinoic acid treatments seem able to restore some of the defects caused by cigarette smoke in particular on pneumocytes adherence (48) and cardiac remodeling (49). In accordance with these results (46), we found that CSC affects the activation of the retinoic acid response element in human amnion derived epithelial cells. This molecular mechanism already described in the lung explain the CSC mediated alteration of the retinoid signal in human amnion, which is known to be exposed to cigarette smoke components presents in the amniotic fluid. Thus, the retinoid pathway may possibly be affected in the amnion of smokers and contribute to the predisposition to PPRM by disrupting an important path known to regulate the extracellular matrix and thus the integrity of the amnion. Nevertheless, this study based on an *in-vitro* model needs further investigation to conclude on the effects of tobacco smoke exposure on the retinoid pathway in the amnion and its integrity. Indeed, cigarette smoke exposure is here substituted by cigarette smoke condensate which contains all the particulate matter of a standard cigarette smoke without containing the gaseous phase. Moreover, the dose and the frequency of the CSC treatment do not mimic the exposition undergone by the amnion of smokers making necessary to further study these effects *in-vivo*. However, the results found here constitute the first evidence of the disruption of the retinoid pathway by CSC in human amnion, addressing the question of a potential link between maternal smoking and the weakening of the extracellular matrix characteristics of PPRM.



## References

1. Miyazaki Y, Hayashi K, Imazeki S. Smoking cessation in pregnancy: psychosocial interventions and patient-focused perspectives. *Int J Womens Health*. 2015;7:415-27.
2. Wagijo M-A, Sheikh A, Duijts L, Been JV. Reducing tobacco smoking and smoke exposure to prevent preterm birth and its complications. *Paediatr Respir Rev*. 21 sept 2015;
3. Haussmann H-J. Use of hazard indices for a theoretical evaluation of cigarette smoke composition. *Chem Res Toxicol*. 16 avr 2012;25(4):794-810.
4. Caserta D, Graziano A, Monte GL, Bordi G, Moscarini M. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17:2198-206.
5. Siegers CP, Jungblut JR, Klink F, Oberheuser F. Effect of smoking on cadmium and lead concentrations in human amniotic fluid. *Toxicol Lett*. déc 1983;19(3):327-31.
6. Jordanov JS. Cotinine concentrations in amniotic fluid and urine of smoking, passive smoking and non-smoking pregnant women at term and in the urine of their neonates on 1st day of life. *Eur J Pediatr*. juill 1990;149(10):734-7.
7. Walsh RA. Effects of maternal smoking on adverse pregnancy outcomes: examination of the criteria of causation. *Hum Biol*. déc 1994;66(6):1059-92.
8. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev*. nov 2007;83(11):699-706.
9. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, et al. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 4 févr 1999;340(5):333-9.
10. Meyer MB, Jonas BS, Tonascia JA. Perinatal events associated with maternal smoking during pregnancy. *Am J Epidemiol*. mai 1976;103(5):464-76.
11. Kilpatrick SJ. Re: « Prenatal exposure to parents' smoking and childhood cancer ». *Am J Epidemiol*. 15 mars 1992;135(6):712; author reply 714-5.
12. Castles A, Adams EK, Melvin CL, Kelsch C, Boulton ML. Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses. *Am J Prev Med*. avr 1999;16(3):208-15.
13. Wong MK, Barra NG, Alfaidy N, Hardy DB, Holloway AC. Adverse effects of perinatal nicotine exposure on reproductive outcomes. *Reprod Camb Engl*. déc 2015;150(6):R185-93.
14. Bourne G. The Foetal Membranes. *Postgrad Med J*. avr 1962;38(438):193-201.





15. Pasquier J-C, Doret M. [Fetal membranes: embryological development, structure and the physiopathology of the preterm premature rupture of membranes]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* oct 2008;37(6):579-88.
16. Sangwan VS, Basu S. Antimicrobial properties of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol.* janv 2011;95(1):1-2.
17. Prat C, Blanchon L, Borel V, Gallot D, Herbet A, Bouvier D, et al. Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biol Reprod.* févr 2012;86(2):48.
18. Bouvier D, Rouzair M, Marceau G, Prat C, Pereira B, Lemarié R, et al. Aquaporins and Fetal Membranes From Diabetic Parturient Women: Expression Abnormalities and Regulation by Insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2015;100(10):E1270-9.
19. Moutquin J-M. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* avr 2003;110 Suppl 20:30-3.
20. Simhan HN, Canavan TP. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mars 2005;112 Suppl 1:32-7.
21. Blanchon L, Accoceberry M, Belville C, Delabaere A, Prat C, Lemery D, et al. [Rupture of membranes: pathophysiology, diagnosis, consequences and management]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* avr 2013;42(2):105-16.
22. Hadley CB, Main DM, Gabbe SG. Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol.* oct 1990;7(4):374-9.
23. Dadvand P, Basagaña X, Figueras F, Martinez D, Beelen R, Cirach M, et al. Air pollution and preterm premature rupture of membranes: a spatiotemporal analysis. *Am J Epidemiol.* 15 janv 2014;179(2):200-7.
24. Williams MA, Mittendorf R, Stubblefield PG, Lieberman E, Schoenbaum SC, Monson RR. Cigarettes, coffee, and preterm premature rupture of the membranes. *Am J Epidemiol.* 15 avr 1992;135(8):895-903.
25. Ekwo EE, Gosselink CA, Woolson R, Moawad A. Risks for premature rupture of amniotic membranes. *Int J Epidemiol.* juin 1993;22(3):495-503.
26. England MC, Benjamin A, Abenhaim HA. Increased risk of preterm premature rupture of membranes at early gestational ages among maternal cigarette smokers. *Am J Perinatol.* nov 2013;30(10):821-6.
27. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta.* déc 2006;27(11-12):1037-51.



28. El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod.* mars 2005;72(3):720-6.
29. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta.* janv 1998;19(1):1-11.
30. Strauss JF. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod Sci* Thousand Oaks Calif. févr 2013;20(2):140-53.
31. Barber T, Esteban-Pretel G, Marín MP, Timoneda J. Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients.* nov 2014;6(11):4984-5017.
32. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat.* mars 1953;92(2):189-217.
33. Pan L, Eckhoff C, Brinckerhoff CE. Suppression of collagenase gene expression by all-trans and 9-cis retinoic acid is ligand dependent and requires both RARs and RXRs. *J Cell Biochem.* avr 1995;57(4):575-89.
34. Cohen AJ, Lassová L, Golden EB, Niu Z, Adams SL. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. *J Cell Biochem.* 1 sept 2006;99(1):269-78.
35. Kaya G, Grand D, Hotz R, Augsburger E, Carraux P, Didierjean L, et al. Upregulation of CD44 and hyaluronate synthases by topical retinoids in mouse skin. *J Invest Dermatol.* janv 2005;124(1):284-7.
36. Marceau G, Gallot D, Borel V, Lémercy D, Dastugue B, Dechelotte P, et al. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 11 août 2006;346(4):1207-16.
37. Prat C, Bouvier D, Comptour A, Marceau G, Belville C, Clairefond G, et al. All-trans-retinoic acid regulates aquaporin-3 expression and related cellular membrane permeability in the human amniotic environment. *Placenta.* août 2015;36(8):881-7.
38. 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.* juin 2010;14(6B):1793-805.
39. 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]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* juin 2011;39(6):370-2.
40. 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.* avr 2009;55(4):611-22.



41. King LA, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of metallothionein expression in human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Am J Obstet Gynecol.* déc 1997;177(6):1496-501.
42. Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, et al. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. *Placenta.* avr 2011;32(4):317-22.
43. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettini J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* juin 2014;184(6):1740-51.
44. Menon R, Fortunato SJ. Distinct pathophysiologic pathways induced by in vitro infection and cigarette smoke in normal human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2009;200(3):334.e1-8.
45. Liu C, Russell RM, Wang X-D. Exposing ferrets to cigarette smoke and a pharmacological dose of beta-carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J Nutr.* janv 2003;133(1):173-9.
46. Manoli SE, Smith LA, Vyhldal CA, An CH, Porrata Y, Cardoso WV, et al. Maternal smoking and the retinoid pathway in the developing lung. *Respir Res.* 2012;13:42.
47. Li T, Molteni A, Latkovich P, Castellani W, Baybutt RC. Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with the development of emphysema in rats. *J Nutr.* août 2003;133(8):2629-34.
48. Xue Y, Williams TL, Li T, Umbehr J, Fang L, Wang W, et al. Type II pneumocytes modulate surfactant production in response to cigarette smoke constituents: restoration by vitamins A and E. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* déc 2005;19(8):1061-9.
49. Oliveira LC, Azevedo PS, Minicucci ME, Rafacho BPM, Duarte DR, Matsubara LS, et al. Retinoic acid prevents ventricular remodelling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Acta Cardiol.* févr 2011;66(1):3-7.



## **Legends**

Table 1 Sequences of oligonucleotides used for RT-qPCR.

Figure 1 CSC inhibits retinoic acid response element (RARE) activation by atRA on primary derived amniocytes.

CAT activity was measured in primary amniocytes transfected with a CAT reporter plasmid controlled by a strong atRA responsive promoter (DR5-tk CAT) (a) and treated either with DMSO, atRA, DMSO + CSC or atRA + CSC. Comparison of means of three independent experiments was performed by Kruskal Wallis test followed by a Dunn's test (b); \*\*\* means  $p < 0.001$  and \*:  $p < 0.5$

Figure 2 CSC decreases the transcriptional effects of atRA on its target genes on primary amniocytes and amnion explants.

The expression of atRA target genes involved in the retinoid pathway (upper panels) or in the extracellular matrix dynamics (lower panels) was measured in primary amniocytes (a) and amnion explants (b) treated with DMSO, atRA, DMSO + CSC or atRA + CSC. Comparison of means of four independent experiments was performed by Kruskal Wallis test followed by a Dunn's test; \*\*\* means  $p < 0.001$ ; \*\* means  $p < 0.01$  and \*:  $p < 0.5$ .

Figure 3 CSC inhibits the pro-healing action of atRA on primary amniocytes.

Scratch assay experiments were performed on primary amniocytes treated either with DMSO or atRA, or with DMSO + CSC or atRA + CSC, representative photographs are shown in (a). Wounds area were measured and normalized to the  $t=0$  and then reported to the DMSO condition ( $n=3$ , photographs were made on 4 distinct area per scratch) (b). Comparison of means was performed by Kruskal Wallis test followed by a Dunn's test; \*\*\* means  $p < 0.001$ ; \*\* means  $p < 0.01$ .

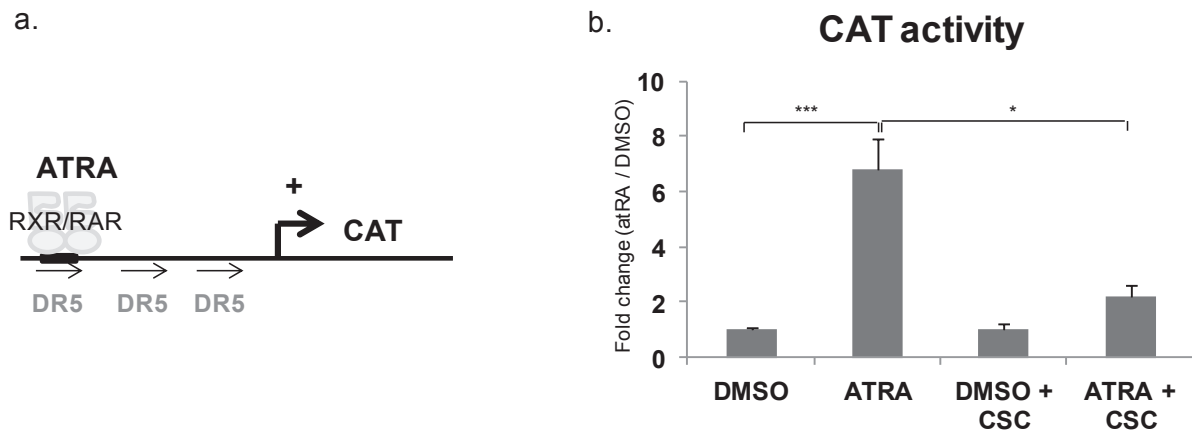




**Table 1**

GENES	Sequence (5'-3')		Product size (bp)
	Forward	Reverse	
human RAR $\beta$	ATGGATGTTCTGTCAGTGAG	CATAGTGGTACCCTGATGAT	268
human STRA6	GCAGCCCATTTGGGTCTTCCT	TGGCGTTGTAGAGGGCAGAG	141
human SPOCK2	ATGCCCGGGCTCTACTGCT	TGGCTTCTTCTGGCCGGCCT	110
human GALT12	Commercial (QIAGEN)		68
human LOXL4	Commercial (QIAGEN)		146
human RPS17	TGCGAGGAGATCGCCATTATC	AAGGCTGAGACCTCAGGAAC	169
human RPLP0	AGGCTTTAGGTATCACCACT	GCAGAGTTTCCTCTGTGATA	219

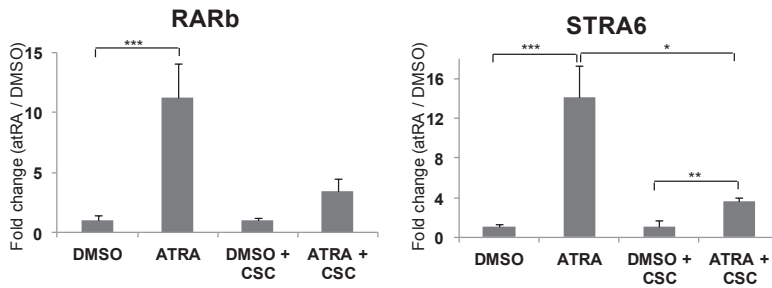
**Figure 1**



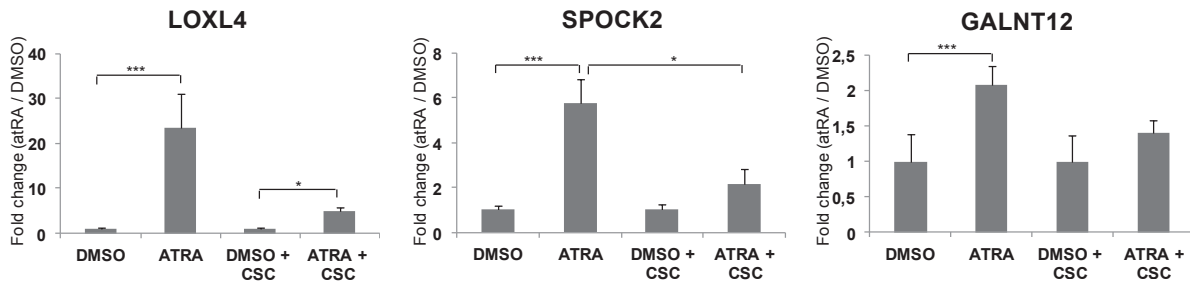


**Figure 2**

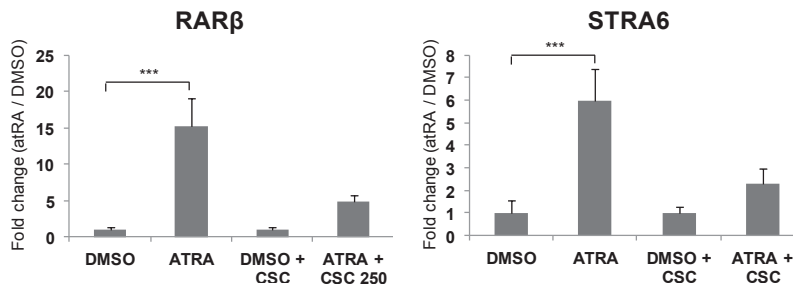
**a. atRA target genes involved in the retinoid pathway**



**atRA target genes involved in the extracellular matrix formation and dynamics**



**b. atRA target genes involved in the retinoid pathway**



**atRA target genes involved in the extracellular matrix formation and dynamics**

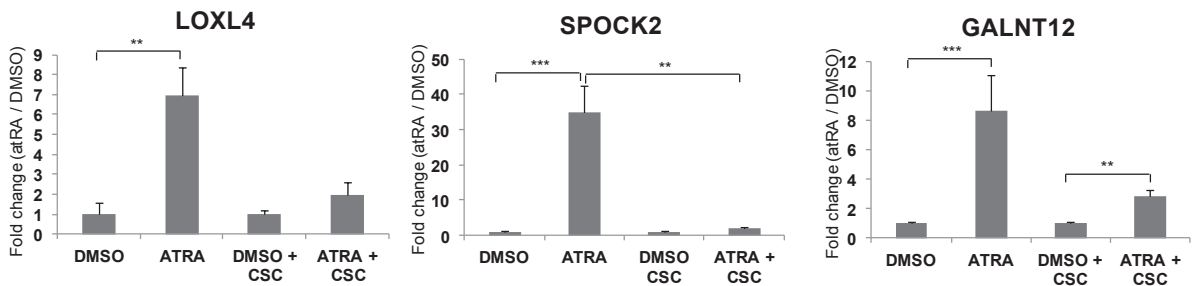
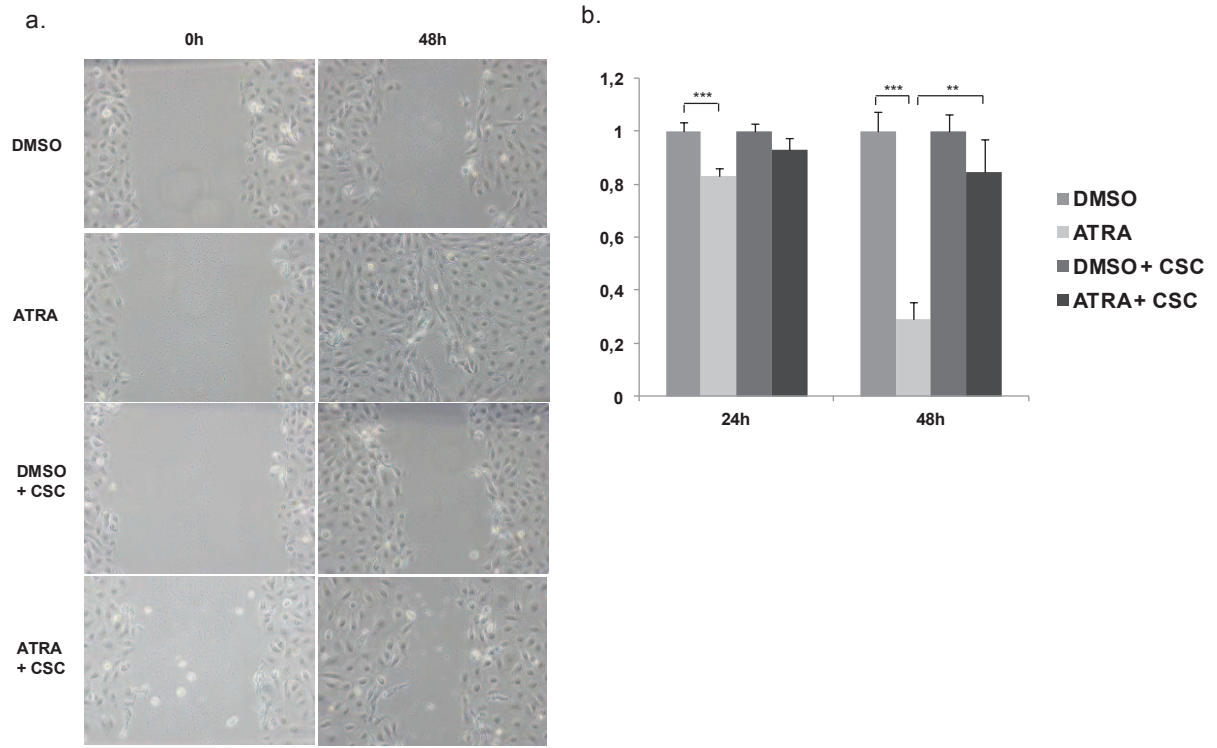




Figure 3





## Annexe n°3

(Communication affichée)

# « **Retinoic Acids Pathway in the Amnion Implications in VEGF Regulation of Amniotic Fluid Transport.** »

Cheung C, Anderson D, Rouzaire M, Blanchon L, Sapin V, Brace R.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Ceci Cheung et Robert Brace localisée à l'Université de Portland. Il a fait suite à une étude de notre équipe qui avait démontré un rôle des rétinoïdes dans la régulation d'un membre de la famille des aquaporines (AQP3), canaux transmembranaires impliqués dans la régulation du volume du liquide amniotique (LA).

La régulation de l'homéostasie du LA est un phénomène physiologique essentiel au développement harmonieux de la grossesse. Toute dérégulation peut être à l'origine de pathologies du volume de LA lors de la grossesse, comme l'oligohydramnios ou le poly-hydramnios. Des études réalisées sur le modèle ovin ont établi qu'une grande partie de cette régulation s'établissait par transfert intramembranaire de la cavité amniotique vers la circulation fœtale. Cette voie de transport étant médiée par un mécanisme de transcytose vésiculaire au niveau des cellules épithéliales amniotiques, et le facteur VEGF étant un régulateur connu de cette voie, l'équipe de Portland s'est intéressée à la régulation de ce gène par les acides rétinoïques au sein des membranes fœtales des ovins. Ce travail a tout d'abord permis de démontrer que la voie des rétinoïdes était présente et fonctionnelle dans les membranes fœtales de ce modèle animal. Puis, la rétino-induction directe de VEGF a été établie dans les cellules épithéliales amniotiques ovines, suggérant un rôle (indirect) des rétinoïdes dans la régulation du transport vésiculaire médié par VEGF. Dans une seconde partie, nous avons aussi démontré que des modifications du volume de LA entraînaient une induction de VEGF et de RAR $\beta$  dont les expressions sont ainsi corrélées.





### Background

Abnormalities in amniotic fluid volume occur in 5%-10% of pregnancies and are associated with maternal morbidity, poor perinatal outcome and adverse long-term health consequences. Current therapeutic treatments are largely ineffective in correcting abnormal amniotic fluid volumes including conditions of polyhydramnios and oligohydramnios. The concept of amniotic fluid volume regulation, based on animal studies, states that amniotic fluid volume is regulated by intramembranous (IM) transport of amniotic fluid across the amnion from the amniotic fluid cavity into the underlying fetal blood vessels. This transport pathway is mediated by a vesicular transcytotic process, and vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of this pathway. However, the molecular mechanisms that activate this VEGF-mediated transport pathway have not been identified, and the biological signals that induce VEGF expression in the amnion are not known. Recently, a retinoic acid (RA) metabolic and signaling pathway has been described in human amnion and may play an important role in amnion function. The retinoids have been implicated in placental and fetal development. They exert their biological effects through binding to their receptors (RAR $_{\alpha, \beta, \gamma}$  and RXR $_{\alpha, \beta, \gamma}$ ) that are ligand-activated nuclear transcription factors that interact with the retinoic acid response element, DR5, in the promoter region of target genes. Thus, in the

### Hypothesis

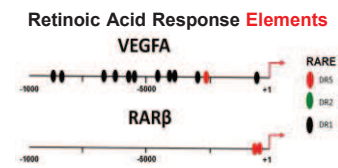
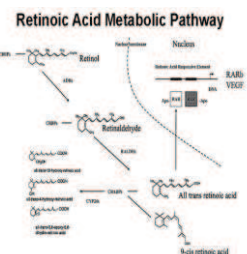
We hypothesized that in the amnion, retinoic acid acting through its respective receptors induces VEGF transcription and up-regulates VEGF gene expression thereby initiating IM transport.

### Objective

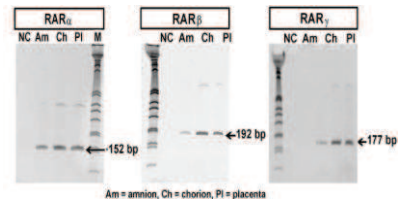
To test this hypothesis using the ovine fetus as the animal model, our objectives were 1) to determine whether VEGF is a target gene inducible by retinoic acid, 2) to analyze the gene expression profiles of VEGF<sub>164</sub> and RAR $_{\beta}$  in the amnion of ovine fetuses under normal conditions and during experimental modifications of IM transport rate and amniotic fluid volume, 3) to explore the relationship between VEGF and RAR $_{\beta}$  expression under conditions of normal and altered IMA rate or AFV volume.

### Methods

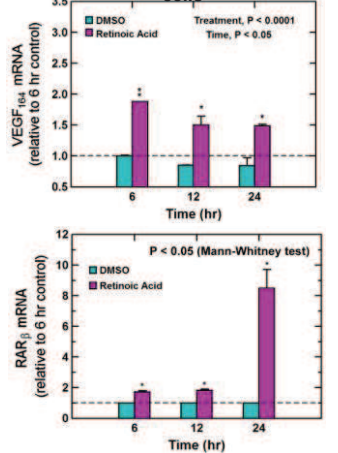
Sixteen late gestation fetal sheep were subjected to one of four 2-day protocols (n=4 per group) 1) control (C), 2) continuous urine drainage (UD), 3) urine drainage plus isovolumic replacement with lactated Ringer's solution (UDR), and 4) intra-amniotic infusion of 2 L/day of Ringer's (IA). These experimental conditions were chosen in order to vary IMA rate independent of AFV. After 2 days, the amnion was collected in RNA later or frozen in liquid nitrogen. VEGF<sub>164</sub>, RA receptors and metabolic enzyme RALDH2 mRNA levels were determined by real time RT-qPCR, using Taqman gene expression assays with custom designed ovine specific primers and probes. Two housekeeping genes, 18s rRNA and RPLP0, were used as internal references. The relative quantities of mRNA were determined by the comparative C<sub>T</sub> method after PCR efficiency correction and normalization to the geometric mean of the two internal references. For comparison of expression levels, fold change was calculated using the control group as the calibrator.



Retinoic Acid Receptor Expression In Ovine Fetal Membranes

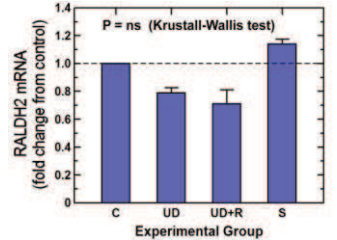
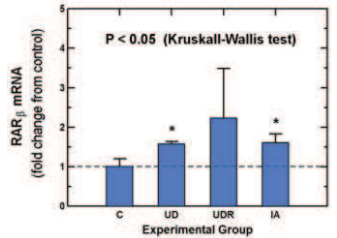
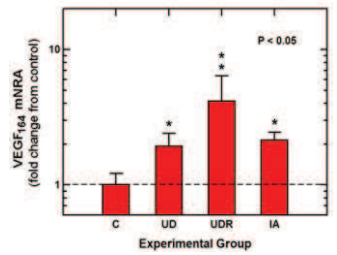


Retinoic Acid (1 μmol/L) Treatment in Ovine amnion cells



Intramembranous Transport Changes in Experimental Conditions

Control Conditions (C)	Urine Drainage (UD)	Urine Replacement (UDR)	Intra-amniotic Fluid Infusion (IA)	P value
AFV = 800 ml	↓	↑	↑	<b>P &lt; 0.0001</b>
IM transport = 800 ml/day	↓	↓	↑	<b>P &lt; 0.01</b>



### Statistical Analysis

Results are presented as mean ± SE. One-factor ANOVA was used to compare mRNA levels among groups and two-factor ANOVA among groups over time. Fisher's least significant difference was used for post hoc testing. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used when appropriate. P ≤ 0.05 was considered significant.

### Results

1. Retinoic acid receptors (RARs) are expressed in ovine amnion, consistent with their expression profile in human amnion.
2. Gene sequence analysis showed that in ovine amnion, the VEGF promoter consists of one copy of retinoic acid response element DR5, while the RAR $_{\beta}$  promoter contains two repeats of DR5.
3. In ovine amnion cells, retinoic acid treatment up-regulated the gene expression of RAR $_{\beta}$ , consistent with the known ligand activation of RAR $_{\beta}$  in human amnion.
4. Further, retinoic acid treatment up-regulated the gene expression of VEGF-A including VEGF<sub>164</sub> in ovine amnion cells.
5. In ovine fetuses, increases in IM transport mediated by intra-amniotic fluid infusion (IA) induced RAR $_{\beta}$  mRNA expression in the amnion, and this was paralleled by a significant increase in VEGF<sub>164</sub> mRNA levels.
6. In fetuses subjected to urine drainage, RAR $_{\beta}$  and VEGF<sub>164</sub> expression levels were elevated, whereas urine replacement increased VEGF<sub>164</sub> mRNA significantly while the increase in RAR $_{\beta}$  mRNA level was non-significant.
7. The expression level of the retinoic acid oxidative enzyme RALDH2, the rate-limiting biosynthetic enzyme, was not significantly altered when IM transport was modified.

### Summary

Our studies demonstrated that retinoic acid receptors and one of the most important biosynthetic enzymes (RALDH2), components of the retinoic acid pathway, are expressed in the ovine amnion. The retinoic acid nuclear receptor RAR $_{\beta}$  is responsive to retinoic acid treatment, suggesting ligand activation upon binding. In addition to RAR $_{\beta}$ , VEGF<sub>164</sub> is shown to be a target gene for retinoic acid in ovine amnion. During experimental manipulation of increases in IM transport, the gene expressions of RAR $_{\beta}$  as well as VEGF<sub>164</sub> were upregulated.

### Conclusions

The findings in this study support the presence of a nuclear retinoid signaling pathway in ovine amnion that is functional in response to ligand activation. The observation that increases in IM transport up-regulated RAR $_{\beta}$  and VEGF<sub>164</sub> gene expression suggests that modifications in the transport rate of amniotic fluid could be associated with induction of the nuclear retinoid signaling pathway. These findings support the hypothesis that IM transport, and thus AFV homeostasis, is modulated through activities of retinoic acid and its nuclear receptor RAR $_{\beta}$  to induce VEGF transcription thereby regulating IM transport.



## Annexe n°4

(Communication affichée)

**« ATRA promotes wound healing of primary amniocytes layer in an in-vitro model through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family. »**

**Rouzaire M, Comptour A, Belville C, Bouvier D, Clairefond G, Ponelle F, Sapin V,  
Gallot D, Blanchon L.**

La publication n°2, constituant la part la plus importante de mon travail de thèse, a fait l'objet d'une communication affichée sous forme de poster au congrès international du SRI (Société d'Investigation de la Reproduction). Cela m'a permis d'interagir avec d'autres chercheurs dans mon domaine et m'a apporté un regard extérieur sur mes travaux.



# ATRA promotes wound healing of primary amniocytes layer in an in-vitro model through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family.

Marion Rouzaire<sup>1</sup>, Aurélie Comptour<sup>1</sup>, Corinne Belville<sup>1,2</sup>, Damien Bouvier<sup>1</sup>, Gaël Clairefond<sup>1</sup>, Flora Ponelle<sup>1</sup>, Vincent Sapin<sup>1</sup>, Denis Gallot<sup>1</sup>, Loïc Blanchon<sup>1</sup>.

1. EA 7281 R2D2, Medical Biochemistry Laboratory, School of Medicine, Auvergne University, Clermont-Ferrand, France.  
2. GREd, School of Medicine, Clermont-Ferrand, France.



## INTRODUCTION

30% of preterm births are the direct consequence of a **preterm premature rupture of fetal membranes (pPROM)**.

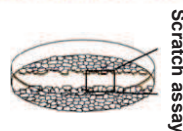


- Actual clinical management proposes the use of a **collagen plug** to avoid the loss of amniotic fluid.
- In order to improve this technique remaining poorly efficient, **vitamin A and its active derivatives (atRA)**, as well-known healing substances, could be proposed as an adjuvant of this collagen plug to promote wound healing of the amnion.

✓ In this context, the aim of this work was to test the **pro-healing properties of atRA on amnion derived epithelial cells** and to investigate the **molecular mechanisms involved**.

- All the fetal membranes were collected from healthy pregnancy after informed consent (n=12).
- The effect of atRA on wound healing was tested by scratch assay experiment followed by proliferation or migration assays.
- Transcriptomic study was done on primary amniocytes, amnion and chorion treated with atRA or its diluent (DMSO) for 24h.

## METHODS

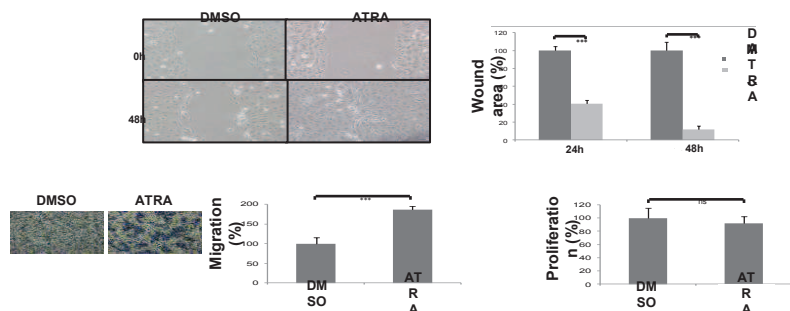


Scratch assay

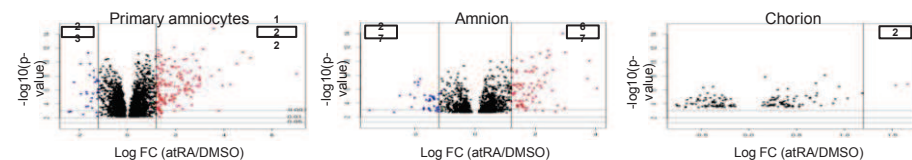
- Induction of LOXL4 by atRA (all-trans Retinoic acid) was checked by **RT-qPCR and immunocytochemistry** after 6, 12, 24 or 48h of treatment. Luciferase reporter gene was used for the promotology experiments.
- Scratch assay were realized using either a **global inhibitor of the lysyl oxidase activity (βAPN)** or **siRNA specifically targeting LOXL4**.
- Statistical analysis were using Mann-Whitney or Krustall Wallis tests.

## RESULTS

### 1) AtRA promotes wound healing by inducing cell migration of primary amniotic cells.

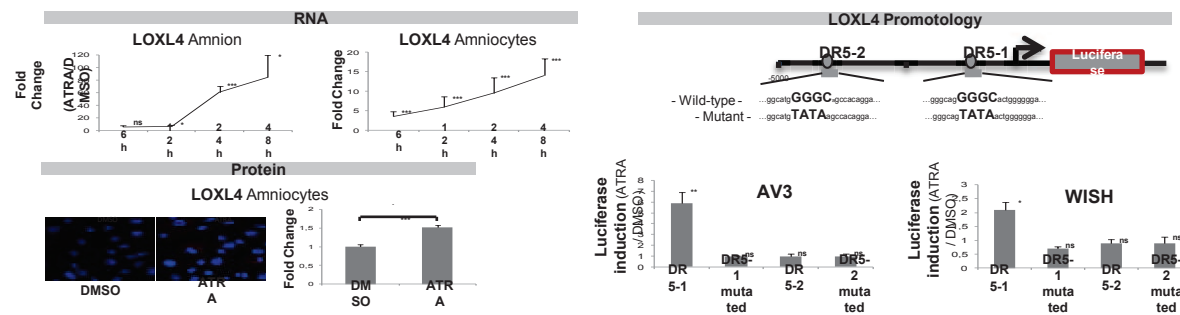


### 2) Transcriptomic study of atRA effects on human fetal membranes.

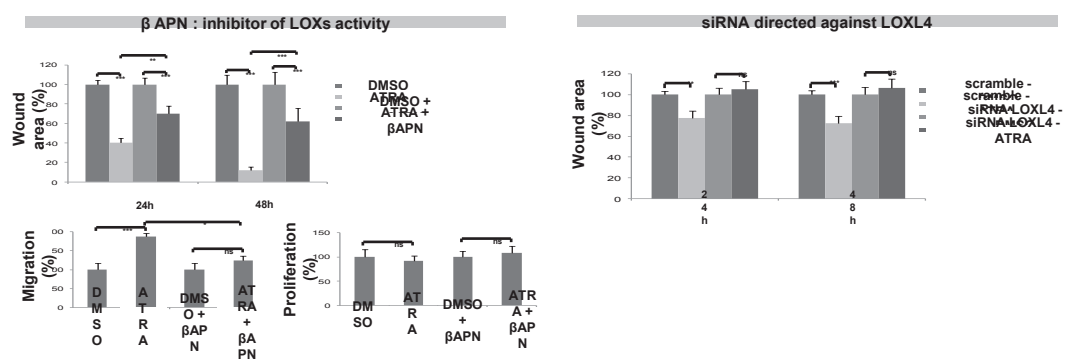


Genes id	Amnion		Primary amniocytes		Gene name	Genbank Accession
	FC	LogFC	FC	LogFC		
LOXL4	16,394	4,035	34,422	5,105	lysyl oxidase-like 4	NM_032211

### 3) LOXL4 induction by atRA at transcriptional and protein level.



### 4) LOXL4 induced by atRA is involved in the pro-healing properties of atRA.



## CONCLUSION

Our results show that **atRA**, with its pro-migratory effect on primary amniotic epithelial cells, leads to a **healing improvement of up to 80%** compare to DMSO (vehicle). Furthermore, we demonstrate that these effects are mediated, in part, by the induction at transcript (using one DR5 motif) and protein level of the **LOXL4 gene**, belonging to the lysyl oxidase family. Besides providing new elements to understand how atRA exerts their pro-healing properties, this work proposes atRA as a promising candidate to improve the clinical management of pPROM by promoting re-epithelialization of the amnion.



## Annexe n°5

Tout au long de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres travaux de recherche initiés par des membres de l'équipe du Pr. V. Sapin. Ces études, publiées (n=2) ou en cours de soumission (n=1) ne seront pas détaillées et seule la première page des deux articles déjà disponibles sont incluses dans ce manuscrit.

### **- Autres travaux de recherche –**

**« Aquaporins and Fetal Membranes From Diabetic Parturient Women: Expression Abnormalities and Regulation by Insulin. »**

Bouvier D, Rouzaire M, Marceau G, Prat C, Pereira B, Lemarié R, Deruelle P, Fajardy I, Gallot D, Blanchon L, Vambergue A, Sapin V (2015) *J Clin Endocrinol Meta.* 100(10):E1270-9.

**« Preanalytical, analytical, gestational and pediatric aspects of the S100B immunoassays. »**

Bouvier D, Duret T, Rouzaire P, Jabaudon M, Rouzaire M, Nourrisson C, Bourgne C, Pereira B, Evrard B, Sapin V (2015) *Clin chem lab med.* doi: 10.1515/cclm-2015-0771.

**« Global transcriptomic and methylomic profile of human fetal membrane prior to labor reveal a differential epigenetic regulation of TLR4 between amnion and chorion at the site of rupture. »**

Belville, C, Ponelle-chachuat F, Rouzaire M, Clairefond G, Gross C, Pereira B, Gallot D, Sapin V, Blanchon L. *En cours de soumission.*





## Aquaporins and Fetal Membranes From Diabetic Parturient Women: Expression Abnormalities and Regulation by Insulin

Damien Bouvier, Marion Rouzaire, Geoffroy Marceau, Cécile Prat, Bruno Pereira, Romain Lemarié, Philippe Deruelle, Isabelle Fajardy, Denis Gallot, Loïc Blanchon, Anne Vambergue,\* and Vincent Sapin\*

Retinoids, Reproduction Developmental Diseases (D.B., M.R., G.M., C.P., D.G., L.B., V.S.), School of Medicine, Clermont Université, Université d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France; Biochemistry and Molecular Biology Department (D.B., G.M., R.L. V.S.), CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France; Biostatistics Unit Department (B.P.), CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France; School of Medicine Henri-Warembourg (P.D., I.F.), Université Lille 2, PRES Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; and Integrative Genomics and Modelization of Metabolic Diseases (A.V.), 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 AQPs 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, type 2 [T2D], and gestational diabetes [GD]), we established an expression AQP 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 Outcomes and Measures:** The expression of transcripts and proteins of AQPs was studied by quantitative RT-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, 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 phosphatidylinositol 3-kinase 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. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: E1270–E1279, 2015)

**D**iabetes mellitus is one of the world's most widespread chronic illnesses. The World Health Organization estimated that the total number of cases of adult diabetes

is expected to continue rising and 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

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.

First Published Online July 24, 2015

\* A.V. and V.S. are co-last authors.

Abbreviations: AKT, kinase B protein; AQP, aquaporin; BMI, body mass index; GD, gestational diabetes; GSK, glycogen synthase kinase; IGF, insulin-like growth factor; mRNA, messenger RNA; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; T1D, type 1 diabetes; T2D, type 2 diabetes; TSC, tuberous sclerosis complex.



Damien Bouvier, Thomas Duret, Paul Rouzaire, Matthieu Jabaudon, Marion Rouzaire, Céline Nourrisson, Céline Bourgne, Bruno Pereira, Bertrand Evrard and Vincent Sapin\*

# Preanalytical, analytical, gestational and pediatric aspects of the S100B immuno-assays

DOI 10.1515/cclm-2015-0771

Received August 10, 2015; accepted September 11, 2015; previously published online October 17, 2015

## Abstract

**Background:** Traumatic brain injury management is a tricky issue in children and pregnant women (due to adverse effects of computer tomography). To facilitate management, we report the main analytical performances and reference ranges for blood tests for the well-established S100B biomarker in under-16 children on a DiaSorin® Liaison XL analyzer and in pregnant women on DiaSorin® Liaison XL and Roche Diagnostics® Cobas e411 analyzers.

**Methods:** Serum S100B concentrations were determined by chemiluminescent immunoassay on a DiaSorin® analyzer in a population of 409 healthy children aged 0–16 years and on DiaSorin®/Roche Diagnostics® instruments in a

population of 50 pregnant women (one blood sample for each trimester). The analytical performances of both instruments and the influence of blood cells and skin pigmentation on the assay were also studied.

**Results:** For children, four age-groups emerged, i.e. 0–3 months (mean: 0.97 µg/L; standard deviation (SD): 0.36; 95th percentile: 1.55), 4–9 months (mean: 0.58 µg/L; SD: 0.30; 95th: 1.18), 10–24 months (mean: 0.31 µg/L; SD: 0.12; 95th: 0.54) and 2–16 years (mean: 0.20 µg/L; SD: 0.07; 95th: 0.32). For pregnant women, serum S100B concentrations were similar to defined ranges for adults and not significantly different between trimesters on DiaSorin® (p=0.652)/Roche Diagnostics® (p=0.877) analyzers. We also found S100B expression (protein, total mRNA) in lymphocytes, an influence of skin pigmentation, and good analytical performances for both instruments.

**Conclusions:** Data provided here is useful for interpreting serum S100B test results, in terms of preanalytical conditions, analytical performances, pediatric and pregnancy environment.

**Keywords:** children; lymphocyte; pregnancy; reference ranges; S100B.

\*Corresponding author: Professor Vincent Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 place Henri-Dunant, BP38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France, Phone: +33 47 317 8174, Fax: +33 47 327 6132, E-mail: vincent.sapin@udamail.fr; CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, Clermont-Ferrand, France; and Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 – Retinoids, Reproduction, Developmental Diseases, Faculty of Medicine, Clermont-Ferrand, France

**Damien Bouvier:** CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, Clermont-Ferrand, France; and Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 – Retinoids, Reproduction, Developmental Diseases, Faculty of Medicine, Clermont-Ferrand, France

**Thomas Duret:** CHU Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department, Clermont-Ferrand, France

**Paul Rouzaire and Bertrand Evrard:** CHU Clermont-Ferrand, Immunology Department, Clermont-Ferrand, France

**Matthieu Jabaudon and Marion Rouzaire:** Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7281 – Retinoids, Reproduction, Developmental Diseases, Faculty of Medicine, Clermont-Ferrand, France

**Céline Nourrisson:** CHU Clermont-Ferrand, Parasitology and Mycology Department, Clermont-Ferrand, France

**Céline Bourgne:** CHU Clermont-Ferrand, Hematology Biology Department, Clermont-Ferrand, France

**Bruno Pereira:** CHU Clermont-Ferrand, Biostatistics Department (DRCI), Clermont-Ferrand, France

## Introduction

Clinical diagnosis of mild traumatic brain injury (mTBI) is difficult in children (a very exposed population) and pregnant women, as cranial computed tomography (CCT) is strongly limited due to increased tumor risk in children [1] or teratogenic effects in the embryo and fetus [2]. An alternative strategy to CCT has been developed based on blood biomarkers, with S100B protein emerging as the most sensitive and specific candidate biomarker in children and adults [3, 4]. S100B is one of a multigenic family of calcium-binding proteins and is predominantly expressed by central nervous system cells (mainly astroglial but also neuronal cells) [5]. S100B plays a trophic role in age dependent manner and correlates with parameters suggestive of growth as height growth velocity [6] or head circumference [7] in a gender dependent manner [6]. S100B





## Résumé

La vitamine A et ses dérivés actifs (les rétinoïdes) sont des molécules essentielles à la vie et ce dès la période embryonnaire. Molécules de choix dans de nombreuses applications thérapeutiques, notamment dans les domaines de la dermatologie et de l'ophtalmologie, elles sont le plus couramment utilisées pour leurs propriétés pro-cicatrisantes. Malgré cette utilisation courante en clinique, les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant aux rétinoïdes de promouvoir un processus de cicatrisation restent encore mal connus. Afin de mieux appréhender ces mécanismes, mais aussi afin d'élargir leur utilisation clinique à la rupture prématurée des membranes (RPM), je me suis intéressée aux propriétés pro-cicatrisantes de l'atRA (l'un des dérivés actifs de la vitamine A) sur les membranes fœtales.

Alors que l'amnios et le chorion sont physiologiquement incapables d'initier un processus de cicatrisation suite à une lésion, nos résultats démontrent un effet positif de l'atRA sur la migration des cellules épithéliales amniotiques (amniocytes primaires), conduisant ainsi à une potentialisation de la cicatrisation de plus de 80% *in vitro*. Ce travail, complété par une analyse transcriptomique réalisée sur des membranes fœtales et des amniocytes primaires traités ou non à l'atRA, a permis d'identifier de nombreux gènes régulés par l'atRA au sein de l'amnios et des amniocytes. Parmi ces gènes, je me suis intéressée à un membre de la famille des lysyl oxydases, LOXL4, qui joue un rôle clé dans la dynamique de la matrice extracellulaire en régulant la réticulation du collagène. Une étude de régulation transcriptionnelle associée à de la promotologie ont tout d'abord permis de montrer que l'atRA induisait l'expression du gène LOXL4 de manière directe. Puis, l'inhibition de la protéine LOXL4 lors de tests de blessure (par le  $\beta$ -aminopropionitrile et par un siARN spécifique) nous a permis de démontrer que l'effet pro-cicatrisant de l'atRA était médié, au moins en partie, par la rétino-induction de LOXL4.

Ces nouveaux éléments apportés par ce travail dans la compréhension des mécanismes moléculaires utilisés par l'atRA afin de promouvoir la cicatrisation permettent d'envisager son utilisation future dans la prise en charge clinique des ruptures prématurées.

Mots clés : membranes fœtales, rétinoïdes, lysyl oxydases, cicatrisation

## Abstract

Vitamin A and its active derivatives (retinoids) are essential molecules for life from the embryonic development to the adulthood. Because of these numerous functions and especially because of their pro-healing properties, they are commonly used in clinic in dermatology and ophthalmology in particular. Despite this routine clinical use, the molecular and cellular mechanisms used by retinoids to promote a healing process remain unclear. To better understand these mechanisms, but also to expand its clinical use to the premature rupture of fetal membranes (PROM), we looked to pro-healing properties of atRA (active derivative of vitamin A) on the human fetal membranes.

While amnion and chorion are unable to initiate a physiological process of healing after injury, our results demonstrate a positive effect of atRA on the migration of primary amniocytes, leading to an healing improvement of up to 80% *in vitro*. This work, completed by a transcriptomic analysis performed on fetal membranes and primary amniocytes treated or not with atRA, allowed the identification of many genes regulated by atRA within the amnion and the amniocytes. Among these genes, we looked to a member of the lysyl oxidase family, LOXL4, which plays a key role in the dynamic of the extracellular matrix by regulating collagen crosslinking. First, transcription and promotology experiments have shown that atRA strongly induced the expression of LOXL4 in a direct manner. Then, the inhibition of the LOXL4 protein in scratch assay experiments (using  $\beta$ -aminopropionitrile or a specific siRNA) allowed us to demonstrate that the pro-healing effect of atRA was mediated, at least in part, by the retinoid-induction of this gene.

Besides providing new elements to understand how atRA exerts their pro-healing properties, this work proposes atRA as a promising candidate to improve the clinical management of premature rupture of the fetal membranes by promoting re-epithelialization of the amnion.

Key words: fetal membranes, retinoids, lysyl oxidases, wound healing