



HAL
open science

Rôle des protéines NLRP dans la physiopathologie des membranes foetales humaines.

Marilyne Lavergne

► **To cite this version:**

Marilyne Lavergne. Rôle des protéines NLRP dans la physiopathologie des membranes foetales humaines.. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS025 . tel-03020761

HAL Id: tel-03020761

<https://theses.hal.science/tel-03020761>

Submitted on 24 Nov 2020

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

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

***ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT***

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne

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

Spécialité Sciences de la Vie et Santé

Soutenue publiquement le 15 novembre 2019 par

Marilyne LAVERGNE

**ROLE DES PROTEINES NLRP DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE
DES MEMBRANES FOETALES HUMAINES**

Directeur de thèse et membre du jury : Dr. Loïc BLANCHON

Rapporteur et membre du jury : Pr. Marie-Noëlle DIEUDONNE

Rapporteur et membre du jury : Pr. Jean GUIBOURDENCHE

Rapporteur et membre du jury : Dr. Céline MEHATS

Membre du jury : Pr. Pascale GUEIRARD

Membre du jury : Pr. Vincent SAPIN

Equipe 10 du Laboratoire Génétique, Reproduction et Développement (GReD)
UMR/CNRS 6293, INSERM U1103, Université Clermont-Auvergne
Centre de Recherche Bioclinique
28, Place Henri Dunant
63000 Clermont-Ferrand (France)

SOMMAIRE

Liste des tableaux et illustrations	1
Abréviations	3
Résumé de la thèse / Thesis abstract	9

***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE* 10**

Avant-propos	11
--------------------	----

PARTIE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DES MEMBRANES FŒTALES 12

I – Formation et structure des membranes fœtales humaines 13

1) <u>Développement embryonnaire des membranes fœtales</u>	13
i) Premières étapes de développement et implantation de l'œuf dans l'utérus	13
ii) Formation de l'amnios et du chorion	14
iii) Accolement des feuillets et membranes fœtales à terme	15
2) <u>Structure, propriétés et fonctions des membranes fœtales</u>	16
i) Structure de l'amnios à terme	17
ii) Structure du chorion à terme	18
iii) Propriétés biophysiques des membranes fœtales	19
iv) Fonctions des membranes fœtales	20

II – Rupture des membranes fœtales 23

1) <u>Rupture physiologique des membranes fœtales</u>	23
i) Chronologie de la rupture	23
ii) Etiologie de la rupture	24
iii) Modélisation de la rupture	33

2) <u>Rupture pathologique des membranes fœtales</u>	35
i) Les ruptures prématurées et leurs conséquences	35
ii) Facteurs de risque	37
iii) Mécanismes moléculaires de la rupture prématurée	41
<u>PARTIE 2 : LES INFLAMMASOMES</u>	46
I – Acteurs et fonctionnement des inflammasomes	47
1) <u>Acteurs moléculaires des inflammasomes</u>	47
i) Les récepteurs	47
ii) L'adaptateur ASC	50
iii) La Caspase-1	51
2) <u>Fonctionnement et régulation des inflammasomes NLRP</u>	53
i) Fonctionnement des inflammasomes NLRP	53
ii) Régulation des inflammasomes	56
3) <u>Inflammasomes et pathologies</u>	58
II – Inflammasomes et grossesse	59
1) <u>Inflammasomes et grossesse normale</u>	60
2) <u>Inflammasomes et grossesse pathologique</u>	61
III – La protéine NLRP7	64
1) <u>Structure et fonctions de NLRP7</u>	64
i) Gène et protéine NLRP7	64
ii) Rôles de NLRP7 dans l'inflammation	65
iii) Autres fonctions de NLRP7	67
2) <u>NLRP7 et développement embryonnaire</u>	68
<i>OBJECTIFS DE THESE</i>	71

RESULTATS 73

ARTICLE 75

« Human Amnion Epithelial Cells (AEC) respond to the *Mycoplasma salivarium*-derived ligand FSL-1 by engaging the NLRP7 inflammasome »

Marilyne LAVERGNE, Corinne BELVILLE, Héléna CHOLTUS, Christelle GROSS, Régine MINET-QUINARD, Denis GALLOT, Vincent SAPIN, Loïc BLANCHON.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 75

Profil d'expression des transcrits et protéines NLRP dans les membranes f etales humaines à terme 76

Immortalisation des trophoblastes chorioniques 78

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 81

Remerciements 90

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 92

ANNEXES 136

Participation aux congrès 137

Participation aux publications 138

LISTE DES TABLEAUX ET

ILLUSTRATIONS

Figure 1 : La cavité utérine chez la femme enceinte au cours du 9^{ème} mois de grossesse.

Figure 2 : Blastocyste (5^{ème} jour de développement embryonnaire).

Figure 3 : Implantation du blastocyste (8^{ème} jour de développement embryonnaire).

Figure 4 : Formation de la cavité amniotique et de la membrane de Heuser (9-10^{ème} jour de développement embryonnaire).

Figure 5 : Apparition du mésoblaste extra-embryonnaire (11^{ème} jour de développement embryonnaire).

Figure 6 : Formation de la cavité chorale (17^{ème} jour de développement embryonnaire).

Figure 7 : L'embryon à la troisième semaine de développement.

Figure 8 : Expansion de la cavité amniotique.

Figure 9 : Développement du fœtus dans la cavité utérine entre le 3^{ème} et le 5^{ème} mois de grossesse.

Figure 10 : Structure des membranes fœtales humaines à terme.

Figure 11 : Structure schématique du placenta à terme.

Figure 12 : Organisation tridimensionnelle des collagènes de type I et III des couches compacte et spongieuse de l'amnios.

Figure 13 : Les étapes de la rupture des membranes fœtales humaines à terme.

Figure 14 : Représentation schématique des membranes fœtales humaines délimitant la cavité amniotique.

Figure 15 : Coupes histologiques des Zones de Morphologie Intacte et Altérée.

Tableau 1 : Marqueurs de la sénescence étudiés au niveau des membranes fœtales ou de leurs cellules.

Figure 16 : Modèle représentant les signaux impliqués dans la maturation des membranes fœtales à terme ainsi que leur propagation aux tissus voisins.

Figure 17 : Fonctionnement schématique d'un inflammasome.

Tableau 2 : Sous-familles et membres des Récepteurs de type NOD (NLR) identifiés chez l'Homme.

Figure 18 : Représentation schématique des récepteurs de type NLRP chez l'Homme.

Figure 19 : Représentation schématique de l'adaptateur ASC chez l'Homme.

Figure 20 : Représentations schématiques du speck, d'un inflammasome et d'un filament d'ASC (domaines PYD).

Figure 21 : Structure de la caspase-1 et modèle d'activation chez la souris.

Figure 22 : Voie canonique d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Figure 23 : Représentation schématique du gène et de la protéine NLRP7 chez l'Homme.

Figure 24 : Structure des lipopeptides FSL-1 et MALP-2.

Tableau 3 : Résultats des RT-PCR pour l'expression des transcrits des quatorze gènes NLRP dans les membranes fœtales humaines à terme obtenus grâce aux amorces spécifiques de chaque gène.

Figure 25 : Effet du travail sur l'expression des transcrits et protéines de NLRP1, NLRP2, NLRP3 et NLRP7 à terme dans l'amnios et le chorion.

Figure 26 : Comparaison de l'expression des transcrits et protéines de NLRP1, NLRP2, NLRP3 et NLRP7 à terme entre l'amnios et le chorion.

Figure 27 : Marquage des cellules avec des anticorps anti-cytokératine 7 et anti-vimentine après purification des trophoblastes.

Figure 28 : Marquage d'une coupe de membranes fœtales et de choriondécidue avec des anticorps anti-cytokératine 7 et anti-vimentine.

Figure 29 : Marquage avec des anticorps anti-cytokératine 7 et anti-vimentine des cellules de deux clones obtenus après dilution limite et dosage de la β -HCG.

Figure 30 : Assemblage de l'inflammasome NLRP7 dans les AEC.

Figure 31 : Mesure de la mortalité cellulaire des AEC par coloration au bleu Trypan et dosage de la lactate déshydrogénase (LDH).

Figure 32 : Expression des transcrits de TLR2 dans les AEC traitées ou non avec le ligand FSL-1.

ABREVIATIONS

Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ mètre)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEC	Amniotic Epithelial Cell = Cellule Epithéliale Amniotique
AGE	Advanced Glycation End products = produits Terminaux de Glycation Avancée
AIF	Apoptosis-Inducing Factor = Facteur Inducteur de l'Apoptose
AIM	Absent-In-Melanoma = gènes Absents dans les Mélanomes
ALR	Absent-In-Melanoma (AIM)-Like Receptor = Récepteur de type AIM
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain = protéine associée à l'Apoptose formant un Grain dans la cellule et contenant un domaine CARD
ATP	Adénosine Triphosphate
AV3	lignée épithéliale amniocytaire humaine
β-HCG	Hormone Chorionique Gonadotrope β
Bax	Bcl-2-associated X protein = protéine X associée à Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 = Deuxième protéine découverte en lien avec le lymphome folliculaire humain à cellules B
BRCC3	BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3 = Sous-unité 3 du Complexe Contenant BRCA1/BRCA2 (Breast Cancer 1 and 2 proteins)
Ca ²⁺	ion Calcium
CAPS	Cryopyrine-Associated Periodic Syndrome = Syndrome Périodique Associé à la Cryopyrine
CARD	Caspase Recruitment Domain = Domaine de Recrutement de Caspase
Caspase	CysteinyI-aspartate-cleaving rotease = Protéase à cystéines spécifique de l'aspartate
CCL	CC motif chemokine Ligand = Chimiokine au motif CC (deux Cystéines adjacentes en région amino-terminale)
CD	Cluster of Differentiation = Cluster de Différenciation
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A (= p19 ^{Arf}) = inhibiteur de Kinase 2A Dépendante de Cyclines
CDL	CARD Domain Linker = Connecteur de la pro-caspase-1 entre les domaines CARD et p20
cIAP-2	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2 = Protéine 2 cellulaire Inhibitrice de l'Apoptose
CIITA	Class II major histocompatibility complex Transactivator = Transactivateur de la Classe II du complexe majeur d'histocompatibilité
CK7	Cytokératine 7
CLR	C-type Lectin Receptor = Récepteur Lectine de type C

COP	CARD-Only Protein = Protéine contenant Seulement un domaine CARD
COX-2	Cyclooxygénase 2
CpG	dinucléotides « cytosine–phosphate–guanine » distribués en îlots dans le génome
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone = Corticolibérine
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9 = Courtes Répétitions Palindromiques Groupées et Régulièrement Espacées / protéine 9 associée aux CRISPR
CRP	C-Reactive Protein = Protéine C Réactive
CSC	Cigarette Smoke Condensate = Condensé de Fumée de Cigarette
CSE	Cigarette Smoke Extract = Extrait de Fumée de Cigarette
C-terminal	domaine carboxy-terminal protéique
CXCL	C-X-C motif chemokine Ligand = Chimiokine au motif C-X-C (Cystéine-X-Cystéine en région amino-terminale)
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern = Motif Moléculaire Associé aux Dommages cellulaires
DMR	Differentially Methylated Regions = Régions Différentiellement Méthylées
<i>e. g.</i>	<i>exempli gratia</i> = par exemple
EGF	Epidermal Growth Factor = Facteur de Croissance Epidermique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = Dosage d'Immunoabsorption par Enzyme Liée
EpiPAGE	Etude Epidémiologique sur les petits âges gestationnels (étude française)
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain = protéine associée à Fas portant des Domaine de Mort
FAF1	Fas Associated Factor 1 = Facteur 1 Associé à Fas
Fas	FS-7-associated surface antigen = antigène de surface découvert après immunisation de souris avec la lignée fibroblastique FS-7
FIIND	Function-to-Find Domain = Domaine dont la fonction est à trouver
FL	lignée épithéliale amniocytaire humaine
FoxO	Forkhead box class O proteins = Protéines de la Classe O du groupe « Forkhead » (découvert chez un insecte ayant la tête fourchue (« fork-headed ») en cas de mutation)
FSL-1	Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1 = Lipopeptide 1 Stimulant les Fibroblastes (dérivé d'une lipoprotéine de <i>Mycoplasma salivarium</i>)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor = Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et de Macrophages
HEK293	lignée épithéliale humaine issue du rein
HET-E	Heterokaryon incompatibility protein E = protéine E responsable de l'incompatibilité d'hétéro-noyaux
HLA	Human Leukocyte Antigen = Antigène reconnu par un Leucocyte Humain
HMGB1	High Mobility Group Box 1 protein = Protéine B1 du Groupe de Haute Mobilité
HSP	Heat Shock Protein = Protéine de Choc Thermique

<i>i. e.</i>	<i>id est</i> = c'est-à-dire
IDL	Interdomain Linker = Connecteur de la pro-caspase-1 entre les domaines p20 et p10
IκB	Inhibitor of kappa B = Inhibiteur de NF-κB
IL	Interleukine
Indel	Insertion-délétion
JNK	c-Jun N-terminal Kinases = Kinases de la famille des MAPK identifiées au départ comme des kinases phosphorylant le domaine N-terminal de la protéine c-Jun
K ⁺	ion Potassium
KHDC3L	KH Domain Containing 3-Like protein (= C6orf221) = protéine 3 Contenant un Domaine KH (domaine identifié sur la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène K)
LDH	Lactate Déshydrogénase
LL-37	domaine de la cathélicidine LL-37 formée de 37 acides aminés, dont deux Leucines
LOX	Lysyl Oxydase
LOXL1	Lysyl Oxidase-Like 1 = Homologue 1 de la Lysyl Oxydase
LP-44	Lipoprotein-44kDa = Lipoprotéine de <i>Mycoplasma salivarium</i> de 44 kDa
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine Rich Repeat = Répétition Riche en Leucine
LUBAC	Linear Ubiquitin Assembly Complex = Complexe d'Assemblage d'Ubiquitines Linéaires
MALP-2	Macrophage-Activating Lipopeptide-2kD = Lipopeptide de 2 kDa Activant les Macrophages (dérivé d'une lipoprotéine de <i>Mycoplasma fermentans</i>)
MAMP	Microorganism-Associated Molecular Pattern = Motif Moléculaire Associé aux Micro-organismes
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase = Protéine Kinase Activée par un Mitogène
MAVS	Mitochondrial Anti-Viral Signaling protein = protéine Mitochondriale de Signalisation Anti-Virale
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 = Protéine 1 Chimioattractante des Monocytes
MMP	Matrix Metalloproteinase = Métalloprotéase Matricielle
MSU	Monosodium Urate crystals = cristaux d'Urate Monosodique
MTT	Methyl Tetrazolium = Tétrazolium de Méthyle
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88 = réponse primaire de Différenciation Myéloïde 88
Na ⁺	ion Sodium
NACHT	Acronyme pour les protéines <u>N</u> AIP (Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein), <u>C</u> IITA (Class II major histocompatibility complex Transactivator), <u>H</u> ET-E (Heterokaryon incompatibility protein E), <u>I</u> P1 (Telomerase-associated Protein 1)
NAD	NACHT-Associated Domain = Domaine Associé à NACHT
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein = Protéine Neuronale Inhibitrice de l'Apoptose
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells = Facteur de transcription découvert chez les lymphocytes B actives impliqué dans la transcription des chaînes légères de type kappa

NLR	Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor = Récepteur de type NOD
NLRA	NLR, Acidic transactivation Domain (AD) containing protein = NLR contenant un domaine AD
NLRB	NLR, Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat (BIR) containing protein = NLR contenant un domaine BIR
NLRC	NLR, Caspase Recruitment Domain (CARD) containing protein = NLR contenant un domaine CARD
NLRP	NLR, Pyrin Domain (PYD) containing protein (= PYPAF = NALP) = NLR contenant un domaine PYD
NLRP12-APS	NLRP12-Associated Periodic Syndrome = Syndrome Périodique Associé à NLRP12
NLRX	NLR, CARD-related X effector domain containing protein = NLR contenant un domaine proche de CARD
NOD	Nucleotide-binding and Oligomerization Domain = Domaine de liaison aux Nucléotides et d'Oligomérisation
ns	non significatif
N-terminal	domaine amino-terminal protéique
Oligo-dT	petite séquence composée de désoxythymidines
p	p-value = p-valeur
P2X7R	member 7 of Purinergic type 2 X ligand-gated ion channels Receptor family = member 7 des Récepteurs Purinergiques de type 2, des canaux ioniques ouverts par des ligands
p53	protein-53kDa = protéine de 53kDa (facteur de transcription)
PADI6	Peptidyl Arginine Deiminase 6 = Déiminase 6 des Arginines de Peptides
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern = Motif Moléculaire Associé aux Pathogènes
PARP-1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 = Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1
PGE ₂	Prostaglandin E ₂ = Prostaglandine E ₂
PM _{2,5}	Particulate Matter 2.5µm = Particule fine dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 2,5µm
POD	PYD-Only Protein = Protéine contenant seulement un domaine PYD
pPROM	preterm Prelabor Rupture Of Membranes = Rupture Avant travail et avant terme des Membranes fœtales
PROM	Prelabor Rupture Of Membranes = Rupture Avant travail des Membranes fœtales
PRR	Pattern Recognition Receptor = Récepteur de Reconnaissance de Motifs moléculaires
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type 22 = Protéine 22 de Type Phosphatase à Tyrosine, non récepteur
PYD	Pyrin Domain = Domaine Pyrine
(q)PCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction = Réaction de Polymérase en Chaîne (quantitative)
RAGE	Receptor of Advanced Glycation End products = Récepteur aux Produits Terminaux de Glycation Avancée
RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene-I = Gène I induit par l'acide Rétinoïque

RLR	Retinoic acid-Inducible Gene-I (RIG-I)-Like Receptor = Récepteur de type RIG-I
RT	Reverse Transcription = Rétrotranscription
S100	Protéines fixant le calcium, solubles dans du sulfate d'ammonium Saturé à 100% à pH neutre
SA	Semaine d'Aménorrhée
SAA1	Serum Amyloid A1 = Amyloïde Sérique A1
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype = Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
SA- β -gal	Senescence-Associated β -galactosidase = β -galactosidase Associée à la Sénescence
SCMC	Subcortical Maternal Complex = Complexe Maternel Subcortical
SERPINH1	Serine Protease Inhibitor Family H Member 1 = Membre 1 de la famille H des Inhibiteurs de Protéase à Sérine
sICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 = Molécule d'Adhésion Intercellulaire 1 soluble
SLIT3	Slit guidance ligand 3 = Homologue 3 de la protéine Slit (découverte chez la drosophile)
SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor = Inhibiteur de Protéases Sécrétées par les Leukocytes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism = Polymorphismes d'un Seul Nucléotide
STAMPB	Signal Transducing Adapter Molecule (STAM)-binding protein = protéine se liant à la Molécule Adaptatrice de Transduction du Signal
SYK	Spleen tyrosine Kinase = tyrosine Kinase découverte dans la Rate
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
Tera-1	cellules épithéliales isolées d'un carcinome testiculaire
THP-1	lignée monocytaire
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase = Inhibiteur de Métalloprotéase spécifique d'un Tissu
TLR	Toll-Like Receptor = Récepteur de Type Toll
TME	Transition Mésenchymo-Epithéliales
TNF α	Tumor Necrosis Factor α = Facteur de Nécrose Tumorale α
TP1	Telomerase-associated Protein 1 = Protéine 1 associée à la Télomérase
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6 = Facteur 6 associé au Récepteur du TNF α
TRIF	Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain-containing adaptor protein inducing interferon- β = protéine adaptatrice contenant un domaine TIR et induisant la synthèse de l'interféron β
Triple I	Inflammation et/ou Infection Intra-utérine
TWIK2	member 2 of Two-pore (TP) domain K ⁺ channel family = membre 2 de la famille des canaux à Potassium possédant un domaine TP
UMR	Unité Mixte de Recherche
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor = Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Vim	Vimentine
vs	<i>versus</i>
WISH	human amnion-derived Wistar Institute Susan Hayflick epithelial cell line = lignée épithéliale amniocytaire humaine
YY1	Yin Yang 1 transcriptional repressor factor = répresseur transcriptionnel Yin Yang 1
ZAM	Zone of Altered Morphology = Zone de Morphologie Altérée
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain-containing protein 16 = protéine 16 à doigts de Zinc et au domaine BTB
ZIM	Zone of Intact Morphology = Zone de Morphologie Intacte

RESUME DE LA THESE

L'inflammation joue un rôle central dans la rupture des membranes fœtales (MF), que celle-ci ait lieu à terme ou prématurément, mais l'ensemble des mécanismes reste encore à élucider. Dans ce contexte, les études sur les inflammasomes, un des acteurs clés de l'inflammation, se sont récemment intensifiées. Ces plateformes intracellulaires, formées suite à un signal pro-inflammatoire, sont impliquées dans la mise en place et la propagation d'une réaction inflammatoire. Leur fonction au sein des MF commence à être décrite mais de nombreuses zones d'ombre persistent. L'objectif de ce travail a donc été de compléter la caractérisation des processus inflammatoires dépendant des inflammasomes dans les MF, en se focalisant sur les inflammasomes de type NLRP.

Les inflammasomes NLRP sont constitués d'un récepteur NLRP, de l'adaptateur ASC et de la pro-caspase-1. Après avoir vérifié la présence de ces acteurs dans les MF à terme, un intérêt particulier a été porté à l'inflammasome de type NLRP7. En effet, sa fonction a déjà été étudiée dans la sphère placentaire mais jamais dans les MF. La stimulation de cellules épithéliales amniocytaires primaires avec un ligand spécifique de l'inflammasome NLRP7 a permis de montrer (i) l'augmentation du niveau protéique des trois acteurs de cet inflammasome (NLRP7, ASC et pro-caspase-1), (ii) la formation de l'inflammasome par co-localisation entre NLRP7 et ASC, (iii) l'activation de cet inflammasome montré par le clivage de deux effecteurs terminaux, la pro-caspase-1 et la gasdermine D. Ces résultats indiquent pour la première fois que les MF sont capables de mettre en jeu la signalisation de l'inflammasome NLRP7 en réponse à un signal pro-inflammatoire.

En parallèle, deux activateurs naturels de l'inflammasome NLRP7 ont été identifiés pour la première fois dans les MF humaines à terme : il s'agit de *Mycoplasma salivarium* et *Mycoplasma fermentans*. Leur présence suggère le fait que l'inflammasome NLRP7 puisse jouer un rôle majeur dans les processus inflammatoires au sein des MF.

L'ensemble de ce travail suggère donc fortement l'implication de l'inflammasome NLRP7 dans la physiopathologie de la rupture des membranes fœtales humaines, qui pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour prévenir les ruptures prématurées dans membranes fœtales.

THESIS ABSTRACT

Inflammation plays a pivotal role in term or preterm fetal membranes (FM) rupture, but the detailed mechanisms remain unclear. In this context, studies on inflammasomes, one of the key inflammation actors, recently intensified. These intracellular platforms, formed following a pro-inflammatory signal, are involved in the establishment and propagation of an inflammatory reaction. Their functions in FM begin to be described but grey areas remain. Thus, the aim of this work was to complete the characterization of inflammasomes-dependent inflammatory processes, focusing on NLRP inflammasomes.

NLRP inflammasomes are composed of a NLRP receptor, the adapter ASC and the pro-caspase-1. After verifying the presence of these actors in term human FM, we focused our interest on NLRP7 inflammasome. Indeed, its function has been studied in the placental area but never in FM. The stimulation of primary amnion epithelial cells with an NLRP7 inflammasome specific ligand demonstrated (i) an increased protein level of the three actors of this inflammasome (NLRP7, ASC and pro-caspase-1), (ii) the formation of this inflammasome by NLRP7 and ASC colocalization and (iii) the activation of this inflammasome, by cleavages of two end-effectors, pro-caspase-1 and gasdermin D. These results indicate for the first time that FM are able to activate NLRP7 inflammasome signalization in response to a pro-inflammatory signal.

Moreover, two natural activators of NLRP7 inflammasome have been newly identified in term human FM: *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*. Their presence suggests that NLRP7 inflammasome could play an essential role in inflammatory processes in FM.

All this work strongly suggests the involvement of NLRP7 inflammasome in pathophysiology of human FM rupture, that could be a potential therapeutic target to prevent premature rupture of FM.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

AVANT-PROPOS

Les membranes fœtales humaines, aussi appelées membranes amniotiques ou plus communément « poche des eaux », délimitent la cavité amniotique dans laquelle se développe le bébé au cours de la grossesse. Tout d'abord considérées comme « un vulgaire sac » par la communauté scientifique et médicale, les membranes fœtales font plus particulièrement l'objet d'attention depuis une trentaine d'années. Les premiers travaux ont permis d'en décrire la structure et les fonctions au cours de la grossesse. Puis, leur rôle central à la fin de la grossesse, dans l'initiation de l'accouchement, a rapidement émergé.

L'un des tournants dans la compréhension de la biologie de ce tissu a été la mise en évidence d'une maturation biochimique des membranes fœtales peu avant le terme. Parmi les divers mécanismes impliqués dans cette maturation, l'inflammation est sans doute le plus important. En effet, l'inflammation des membranes fœtales ayant lieu à la fin de la grossesse (i) permet la propagation de signaux à l'utérus qui contribuent à la maturation du col utérin et à la mise en place du travail, et (ii) participe à la rupture des membranes fœtales, ce qui permet la naissance du bébé. Ainsi, la mise en place précoce d'une inflammation (par exemple due à une infection ou une consommation de tabac) peut conduire à un travail prématuré et/ou une rupture prématurée des membranes fœtales.

De nombreuses équipes se sont donc intéressées à ces phénomènes inflammatoires et ont étudié entre autres les ligands responsables de cette inflammation, les cellules immunitaires recrutées et les conséquences d'un tel phénomène sur les tissus constituant les membranes fœtales, mais aussi les tissus avoisinants. Récemment, un intérêt particulier a été porté à une plateforme de signalisation intracellulaire nommée « inflammasome » et connue pour être au cœur de voies de signalisation inflammatoires. N'étant pas encore complètement caractérisée, la fonction de l'inflammasome dans la physiopathologie des membranes fœtales humaines a fait l'objet de ce travail de thèse.

PARTIE 1

PHYSIOPATHOLOGIE DES MEMBRANES FOETALES

I - FORMATION ET STRUCTURE DES MEMBRANES FŒTALES HUMAINES

1) DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES MEMBRANES FŒTALES

- i) PREMIERES ETAPES DE DEVELOPPEMENT ET IMPLANTATION DE L'ŒUF DANS L'UTERUS
- ii) FORMATION DE L'AMNIOS ET DU CHORION
- iii) ACCOLEMENT DES FEUILLETS ET MEMBRANES FŒTALES A TERME

2) STRUCTURE, PROPRIETES ET FONCTIONS DES MEMBRANES FŒTALES

- i) STRUCTURE DE L'AMNIOS A TERME
- ii) STRUCTURE DU CHORION A TERME
- iii) PROPRIETES BIOPHYSIQUES DES MEMBRANES FŒTALES
- iv) FONCTIONS DES MEMBRANES FŒTALES

II – RUPTURE DES MEMBRANES FOETALES

1) RUPTURE PHYSIOLOGIQUE DES MEMBRANES FOETALES

- i) CHRONOLOGIE DE LA RUPTURE
- ii) ETIOLOGIE DE LA RUPTURE
- iii) MODELISATION DE LA RUPTURE

2) RUPTURE PATHOLOGIQUE DES MEMBRANES FOETALES

- i) LES RUPTURES PREMATUREES ET LEURS CONSEQUENCES
- ii) FACTEURS DE RISQUE
- iii) MECANISMES MOLECULAIRES DE LA RUPTURE PREMATUREE

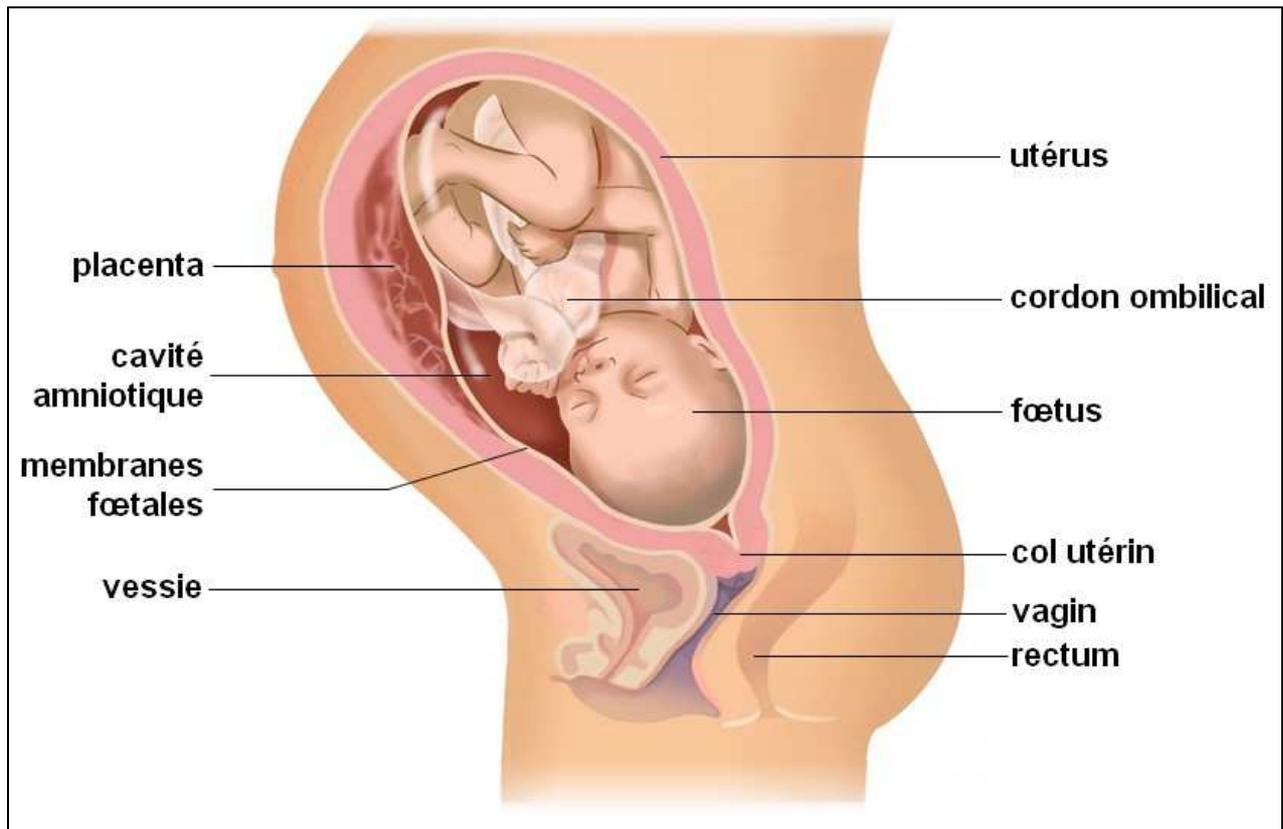
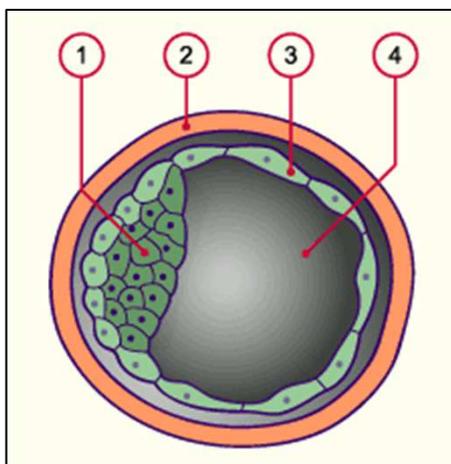


Figure 1 : La cavité utérine chez la femme enceinte au cours du 9^{ème} mois de grossesse.

Le placenta est ancré à l'utérus dans sa partie supérieure. Les membranes fœtales, rattachées au placenta, tapissent la paroi interne de l'utérus et délimitent la cavité amniotique dans laquelle se trouve le fœtus.

(Adapté de www.babyspace.fr)



1. Bouton embryonnaire
2. Zone pellucide
3. Trophoblaste
4. Blastocèle

Figure 2 : Blastocyste (5^{ème} jour de développement embryonnaire).

A ce stade, le blastocyste est encore entouré par la zone pellucide, une matrice extracellulaire sécrétée par l'ovocyte et enveloppant celui-ci.

(Adapté de www.embryology.ch)

I - FORMATION ET STRUCTURE DES MEMBRANES FŒTALES HUMAINES

Les membranes fœtales et le placenta font partie des annexes embryonnaires, structures transitoires formées au cours d'une grossesse chez la femme. Le placenta est ancré à la partie supérieure de l'utérus, alors que les membranes fœtales, qui sont rattachées au placenta, tapissent la paroi interne de l'utérus (**Figure 1**). Ces deux structures permettent d'établir une véritable interface entre la mère et son bébé tout au long du développement *in utero*.

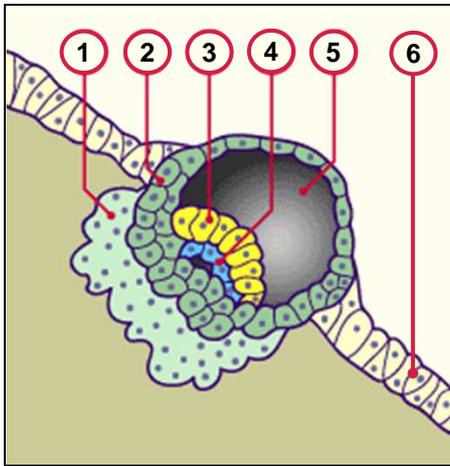
Les membranes fœtales sont constituées de deux feuillets accolés, l'amnios et le chorion, et sont d'origine embryonnaire. Le placenta, quant à lui, est formé à partir de tissus embryonnaires et maternels. Ces annexes se développent donc à partir du zygote – cellule œuf provenant de la fusion des deux gamètes – mais ne participent pas à proprement parlé à la formation de l'embryon et du fœtus. Leur rôle est d'accompagner le développement embryonnaire puis fœtal en assurant des fonctions essentielles au maintien et au bon déroulement de la grossesse telles que la nutrition, la respiration, l'excrétion des déchets, la protection et la communication cellulaire. Les membranes fœtales et le placenta ont aussi un rôle prépondérant dans le phénomène de parturition.

1) DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES MEMBRANES FŒTALES

Le développement embryonnaire humain regroupe de nombreuses étapes, impliquant des processus cellulaires et moléculaires complexes, relativement bien connus aujourd'hui. Dans cette partie, seules les étapes permettant de comprendre l'origine et la formation des membranes fœtales sont traitées et synthétisées. (1–4)

i) PREMIERES ETAPES DE DEVELOPPEMENT ET IMPLANTATION DE L'ŒUF DANS L'UTERUS

Cinq jours après la fécondation et suite à plusieurs cycles de division cellulaire, l'œuf est appelé blastocyste. Il est composé d'un amas de cellules internes nommé bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne, et d'une cavité, le blastocèle, le tout étant délimité par une couche de cellules externes, les trophoblastes (**Figure 2**). Le bouton embryonnaire sera à l'origine de l'embryon, tandis que le trophoblaste formera une partie du placenta. Ces deux types de cellules participeront également à la formation des membranes fœtales.

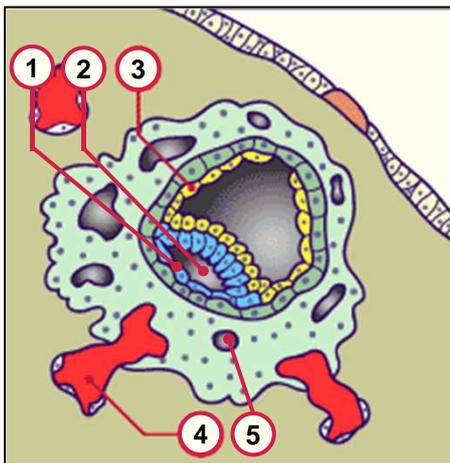


1. Syncytiotrophoblaste
2. Cytotrophoblaste
3. Hypoblaste
4. Epiblaste
5. Blastocèle
6. Epithélium de la muqueuse utérine

Figure 3 : Implantation du blastocyste (8^{ème} jour de développement embryonnaire).

Au cours de son implantation dans la muqueuse utérine, le blastocyste voit son trophoblaste se différencier en deux types cellulaires : le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste. Le bouton embryonnaire se différencie aussi pour donner l'hypoblaste et l'épiblaste, formant ainsi un disque embryonnaire didermique.

(Adapté de www.embryology.ch)

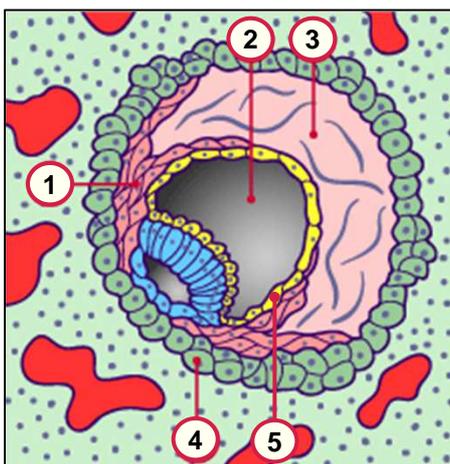


1. Amnioblaste
2. Cavité amniotique
3. Hypoblaste en prolifération (pour former la membrane de Heuser)
4. Vaisseau sanguin maternel érodé par le syncytiotrophoblaste
5. Lacune du syncytiotrophoblaste

Figure 4 : Formation de la cavité amniotique et de la membrane de Heuser (9-10^{ème} jour de développement embryonnaire).

La cavité amniotique se forme dans l'épiblaste. Peu après, la membrane de Heuser se forme à partir des cellules hypoblastiques en prolifération.

(Adapté de www.embryology.ch)



1. Mésoblaste extra-embryonnaire
2. Vésicule vitelline primitive
3. Réticulum extra-embryonnaire
4. Cytotrophoblaste
5. Membrane de Heuser

Figure 5 : Apparition du mésoblaste extra-embryonnaire (11^{ème} jour de développement embryonnaire).

Le réticulum extra-embryonnaire s'insinue entre la membrane de Heuser et le cytotrophoblaste. Les cellules du mésoblaste extra-embryonnaire envahissent ensuite ce réticulum.

(Adapté de www.embryology.ch)

La couche trophoblastique permet au blastocyste de s'implanter dans la muqueuse utérine, entre le sixième et le huitième jour après la fécondation, établissant ainsi la première interaction avec la mère. A partir de ce stade, de nombreuses modifications vont avoir lieu au niveau de l'utérus et de l'œuf.

Au site d'implantation, la réaction déciduale transforme l'endomètre utérin en décidue ou caduque. Cette couche est caractérisée notamment par une accumulation de lipides et de glycogène, assurant la nutrition de l'œuf dans les premiers stades de développement, ainsi qu'une importante vascularisation, permettant l'établissement d'une circulation sanguine fœto-placentaire par la suite. Cette transformation se propage ensuite à l'ensemble de l'utérus, sauf au col utérin.

Le trophoblaste de l'œuf, quant à lui, se différencie en deux types cellulaires : (i) le cytotrophoblaste, une couche de cellules mononucléées qui délimitent le blastocyste et seront impliquées dans la formation du chorion, et (ii) le syncytiotrophoblaste, une couche de cellules multinucléées issues de la fusion de cellules cytotrophoblastiques, ayant une activité lytique invasive permettant à la fois la progression du blastocyste dans la muqueuse utérine et la mise en place de la circulation sanguine fœto-placentaire (**Figure 3**).

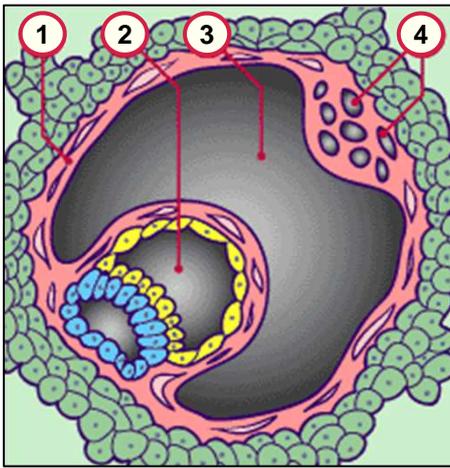
Enfin, les cellules du bouton embryonnaire se différencient et se réarrangent pour former un disque didermique, constitué de deux types cellulaires : l'épiblaste, qui contribuera à la formation de l'amnios, et l'hypoblaste (**Figure 3**).

ii) FORMATION DE L'AMNIOS ET DU CHORION

La formation de l'amnios et du chorion débute au cours de la quatrième semaine d'aménorrhée (SA), soit la deuxième semaine de développement embryonnaire. L'apparition de ces deux structures a lieu de façon concomitante.

A partir du huitième jour de développement, les cellules épiblastiques prolifèrent et du liquide s'insinue entre elles. Ces cellules se déplacent et délimitent une nouvelle cavité, la cavité amniotique. Les cellules repoussées contre le cytotrophoblaste prennent le nom d'amnioblastes et seront à l'origine des cellules épithéliales de l'amnios (**Figure 4**).

Le jour suivant, les cellules de l'hypoblaste prolifèrent également et migrent de façon à tapisser l'intérieur du blastocèle. Ces cellules délimitent ainsi une nouvelle cavité, la vésicule vitelline primitive, formée aux alentours du dixième jour après la fécondation. La couche de cellules hypoblastiques en contact avec le cytotrophoblaste est appelée membrane de Heuser (**Figures 4 et 5**).



1. Mésoblaste extra-embryonnaire
2. Vésicule vitelline secondaire
3. Cavité chorale
4. Résidus de la vésicule vitelline primitive

Figure 6 : Formation de la cavité chorale (17^{ème} jour de développement embryonnaire).

Les vacuoles formées dans le réticulum extra-embryonnaire fusionnent pour former la cavité chorale. Suite à un étranglement de la vésicule vitelline primitive par le mésoblaste extra-embryonnaire, la vésicule vitelline secondaire est formée.

(Adapté de www.embryology.ch)

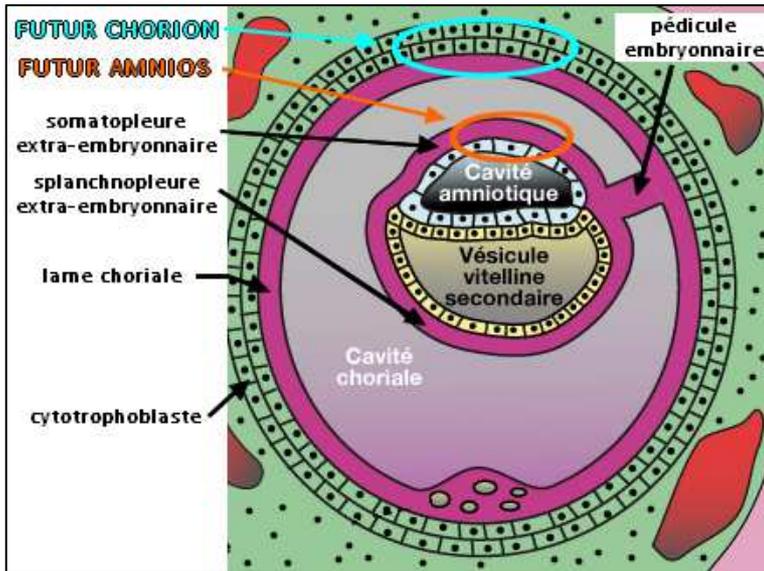
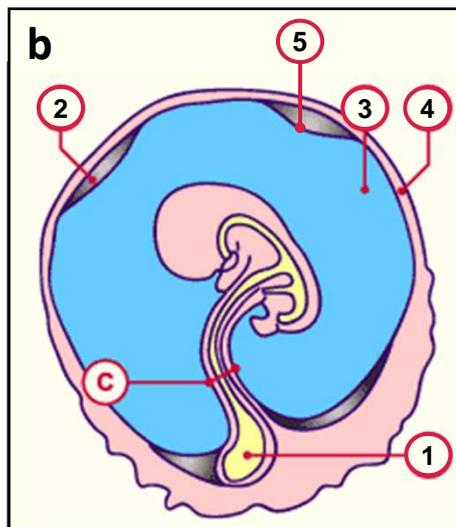
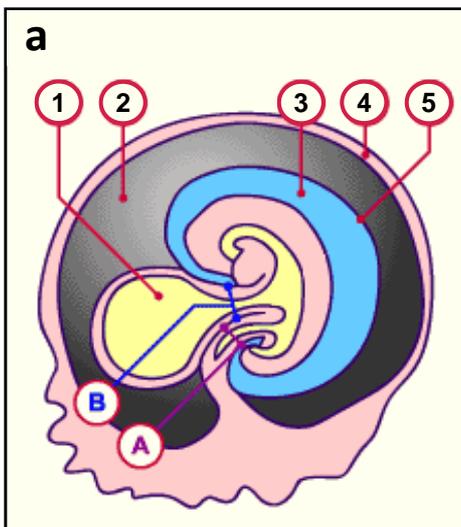


Figure 7 : L'embryon à la troisième semaine de développement.

A ce stade, l'embryon est suspendu par le pédicule embryonnaire dans la cavité chorale. La paroi de la vésicule vitelline secondaire est en contact avec la splanchnopleure extra-embryonnaire.

Les amnioblastes sont, quant à eux, en contact avec la somatopleure extra-embryonnaire ; ces deux couches formeront respectivement les parties épithéliale et mésenchymateuse de l'amnios. Le cytotrophoblaste est en contact avec la lame chorale ; ils formeront les parties épithéliale et mésenchymateuse du futur chorion, respectivement.

(Adapté de www.vetopsy.fr)



1. Vésicule vitelline
2. Cavité chorale
3. Cavité amniotique
4. Chorion
5. Amnios

- A. Pédicule embryonnaire
- B. Pédicule vitellin
- C. Cordon ombilical

Figure 8 : Expansion de la cavité amniotique.

L'expansion de la cavité amniotique entre la quatrième (a) et la huitième semaine (b) de développement embryonnaire repousse l'amnios qui entre en contact avec le chorion. Les pédicules embryonnaire et vitellin forment le cordon ombilical.

(Adapté de www.embryology.ch)

Par la suite, le réticulum extra-embryonnaire, une matrice lâche produite par le cytotrophoblaste et la membrane de Heuser, apparaît et sépare ces deux couches cellulaires. Il est vite envahi par les cellules du mésoblaste extra-embryonnaire qui recouvrent la face interne du cytotrophoblaste et les faces externes de la vésicule vitelline et de la cavité amniotique. L'origine de ces cellules n'est, à ce jour, pas encore déterminée (différentes théories ont été énoncées, proposant une origine épiblastique, hypoblastique ou cytotrophoblastique aux cellules du mésoblaste extra-embryonnaire) (**Figure 5**).

A partir du douzième jour de développement, des vacuoles apparaissent dans le réticulum extra-embryonnaire et fusionnent pour former la cavité chorale (**Figure 6**). Cette cavité se développe largement et englobe la vésicule vitelline secondaire – qui remplace la vésicule vitelline primitive – et la cavité amniotique. L'embryon didermique est suspendu dans la cavité chorale par le pédicule embryonnaire, formé de mésoblaste extra-embryonnaire. Les cellules du mésoblaste extra-embryonnaire prennent alors différents noms selon leur localisation : (i) les cellules en contact avec le cytotrophoblaste forment la lame chorale, impliquée par la suite dans le support des cellules trophoblastiques du chorion, (ii) les cellules tapissant la cavité amniotique forment la somatopleure extra-embryonnaire, qui constituera le support des cellules épithéliales de l'amnios, et (iii) les cellules tapissant la vésicule vitelline secondaire forment la splanchnopleure extra-embryonnaire (**Figure 7**).

A partir de la quatrième semaine de développement, une importante production de liquide amniotique augmente progressivement le volume de la cavité amniotique qui comble alors presque entièrement la cavité chorale à la huitième semaine de développement. La cavité amniotique englobe totalement l'embryon, à l'exception du cordon ombilical (formé à partir des pédicules embryonnaire et vitellin). A ce stade, l'épithélium amniotique et la somatopleure extra-embryonnaire (futur amnios) sont en contact avec la lame chorale et les cytotrophoblastes sous-jacents (futur chorion) (**Figure 8**).

iii) ACCOLEMENT DES FEUILLETS ET MEMBRANES FŒTALES A TERME

A la fin du premier trimestre de grossesse, lorsque l'amnios et le chorion se retrouvent accolés, les couches de mésoblaste extra-embryonnaire tapissant ces deux feuillets (*i. e.* la somatopleure et la lame chorale, respectivement) fusionnent. La fusion est complète à la quatorzième semaine de développement, soit au début du deuxième trimestre de grossesse. Une séparation entre le chorion et l'amnios après cette période, due à une fusion incomplète des feuillets ou une séparation des membranes fusionnées, est considérée comme anormale. Cette anomalie est associée notamment à des taux plus importants de travail prématuré, de rupture prématurée des membranes fœtales et d'accouchement prématuré (5–9).

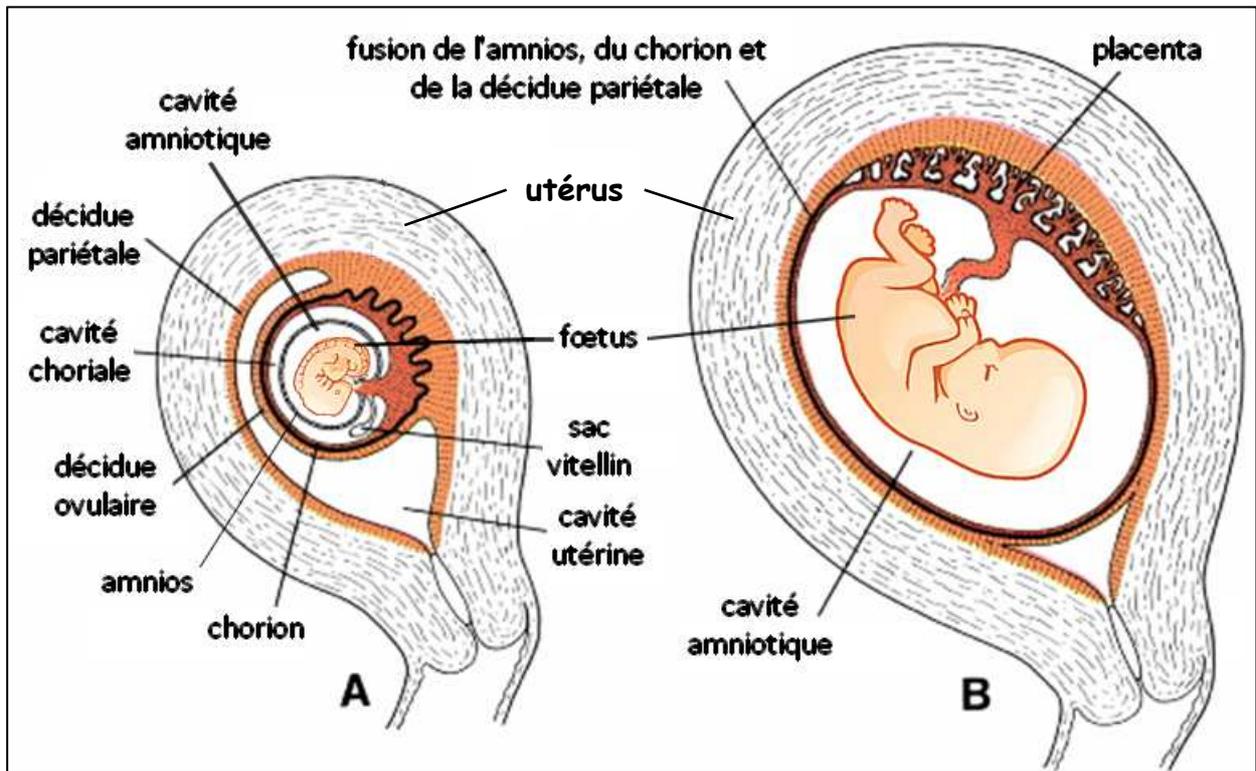


Figure 9 : Développement du fœtus dans la cavité utérine entre le 3^{ème} (A) et le 5^{ème} mois (B) de grossesse.

En parallèle de l'expansion de la cavité amniotique, le fœtus se développe dans l'utérus permettant à la décidue ovulaire d'entrer en contact avec la décidue pariétale. Les deux décidues fusionnent et oblitèrent complètement la cavité utérine au cours du cinquième mois de grossesse. Par la suite, la décidue ovulaire dégénère.

(Adapté de Sadler TW., *Langman's Medical Embryology*, 8th edition, p. 140, 2000)

En parallèle de la fusion des membranes, l'embryon se développe dans l'utérus et est séparé de la cavité utérine par la décidue ovulaire, en contact avec les trophoblastes du chorion. Cette couche cellulaire s'approche de la décidue pariétale (qui tapisse l'intérieur de la cavité utérine) au fur et à mesure du développement, oblitérant complètement l'utérus au cours du cinquième mois de grossesse (**Figure 9**). Par la suite, la décidue ovulaire se désintègre et les trophoblastes chorioniques envahissent la décidue pariétale sous-jacente, permettant ainsi au chorion de s'ancrer fermement à cette décidue (10). Après cette invasion, la couche de cellules trophoblastiques tend à se condenser, laissant apparaître une frontière bien définie entre ces cellules et la décidue pariétale (11).

La croissance des membranes fœtales cesse dans la seconde moitié de la grossesse (12). Au cours des derniers mois de grossesse, la structure des membranes fœtales reste donc constante jusqu'à subir des modifications en vue de préparer l'accouchement, peu avant la fin de la grossesse. A terme, les membranes fœtales humaines ont une surface comprise entre 1000 et 1200cm² (13,14) pour une épaisseur d'environ 500µm (15) et contiennent environ 800mL de liquide amniotique (16). Une faible proportion de leur surface recouvre le placenta (30%), le reste des membranes fœtales interagit avec la décidue maternelle, ou décidue pariétale, et représente les membranes réfléchies (14).

2) STRUCTURE, PROPRIETES ET FONCTIONS DES MEMBRANES FŒTALES

Les membranes fœtales à terme sont constituées de deux feuillets accolés, l'amnios et le chorion. L'amnios, feuillet le plus interne, est en contact direct avec le liquide amniotique. Le chorion, feuillet le plus externe, est accolé à la décidue maternelle. Il est à noter que, l'adhérence entre le chorion et la décidue étant assez solide, certains auteurs parlent de « chorioidécidue ». L'amnios et le chorion sont des feuillets constitués d'une partie épithéliale (dérivant des amnioblastes et des trophoblastes, respectivement) qui repose sur une partie mésenchymateuse (dérivant de la somatopleure et de la lame choriale, respectivement). Les mésenchymes se font donc face du fait d'une polarité inverse, l'amnios étant orienté vers le fœtus et le chorion vers la décidue maternelle.

L'anatomie et l'histologie des membranes fœtales ont été décrites pour la première fois par Gordon Bourne dans les années soixante (17–19). Depuis, de nombreuses études sont venues enrichir ces premières observations, apportant aujourd'hui une description détaillée de la structure et des propriétés biophysiques de chacun des deux feuillets.

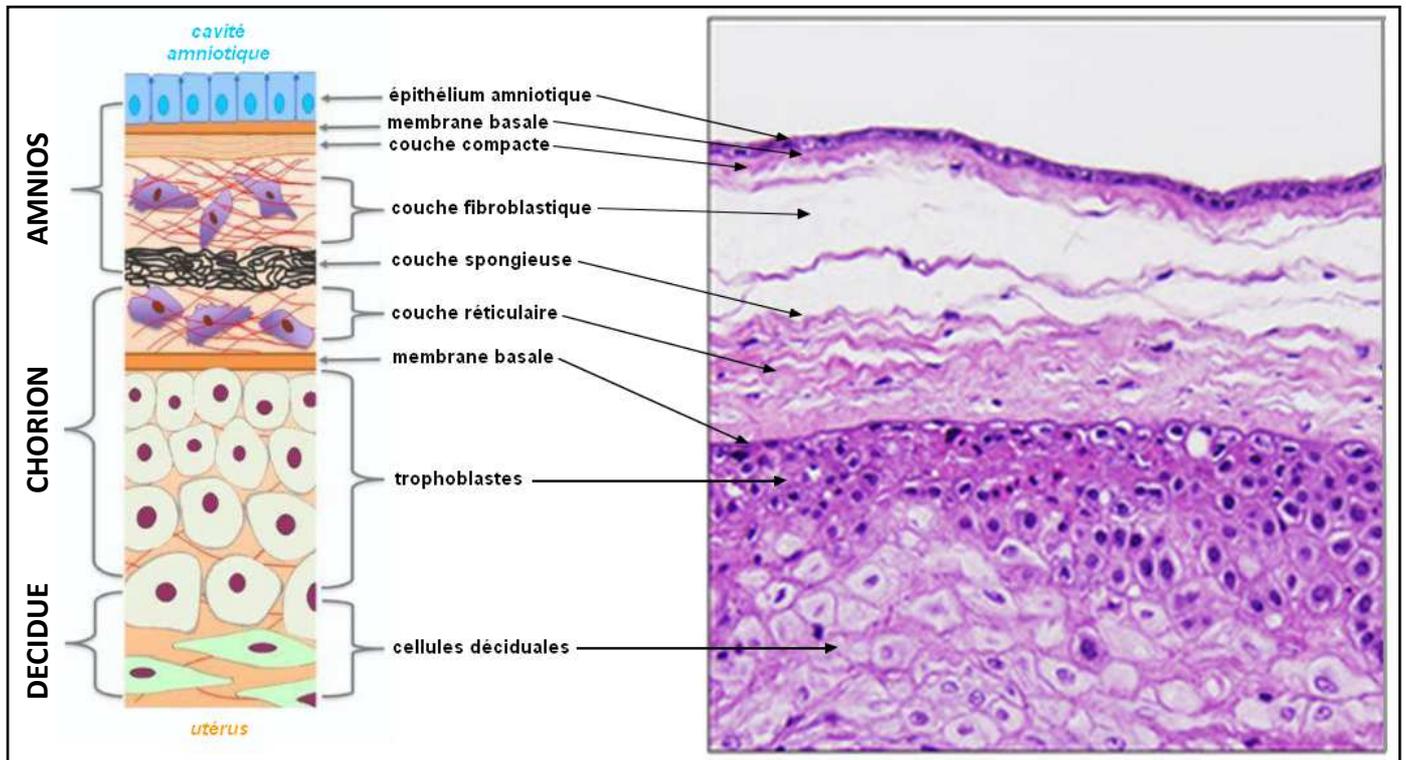


Figure 10 : Structure des membranes fœtales humaines à terme.

L'amnios est composé de cinq couches. La couche la plus superficielle, formée de cellules épithéliales, est directement en contact avec le liquide amniotique. Le chorion, quant à lui, est composé de trois couches. Les trophoblastes, constituant la couche la plus profonde des membranes fœtales, sont en contact direct avec la décidue maternelle. La coupe de membrane fœtale est colorée à l'hématoxyline et l'éosine (grossissement x200).

(Adapté de Menon R. et Richardson L., *Preterm Prelabor Rupture of the Membranes: A Disease of the Fetal Membranes*, 2017 ; Lannaman *et al.*, *Fetal death: An extreme manifestation of maternal anti-fetal rejection*, 2017)

i) STRUCTURE DE L'AMNIOS A TERME

L'amnios est un feuillet translucide, d'une épaisseur de 100µm environ (15). Il est composé de cinq couches, nommées et décrites comme suit (17,20,21), du versant fœtal vers le versant maternel (**Figure 10**) :

- *L'épithélium amniotique* : En contact direct avec le liquide amniotique, il s'agit d'une monocouche de cellules épithéliales cubiques, pourvues de microvillosités apicales.

- *La membrane basale amniotique* : Fine couche acellulaire, elle est composée de fibres de collagènes (de type III, IV et V) et de glycoprotéines non-collagéniques (telles que la laminine et la fibronectine). L'entremêlement de ces fibres avec des projections de membranes plasmiques provenant de la partie basale des cellules épithéliales permet une forte adhérence entre l'épithélium et la membrane basale (22).

- *La couche compacte* : Dépouvue de cellule, elle est composée de collagènes (majoritairement de type I et III) et de fibronectine. La couche compacte forme le squelette fibreux principal de l'amnios et représente la couche la plus résistante à l'étirement de ce feuillet (23).

- *La couche fibroblastique* : Couche la plus épaisse de l'amnios, elle est composée de fibroblastes enchâssés dans une matrice extracellulaire constituée de collagènes et molécules non-collagéniques.

- *La couche intermédiaire ou spongieuse* : Contenant quelques fibroblastes, cette couche est majoritairement composée de collagènes (de type I, III et IV) et de protéoglycanes. Bien qu'elle ait été décrite initialement comme une couche appartenant à l'amnios, elle est aujourd'hui considérée comme une zone intermédiaire située entre les deux feuillets des membranes fœtales (21,24,25). L'importante hydratation de la couche spongieuse permet à l'amnios de glisser sur le chorion sous-jacent.

Les cellules épithéliales et fibroblastiques contribuent toutes deux à la synthèse et la sécrétion des composants collagéniques et non-collagéniques des différentes couches de l'amnios (22,26,27).

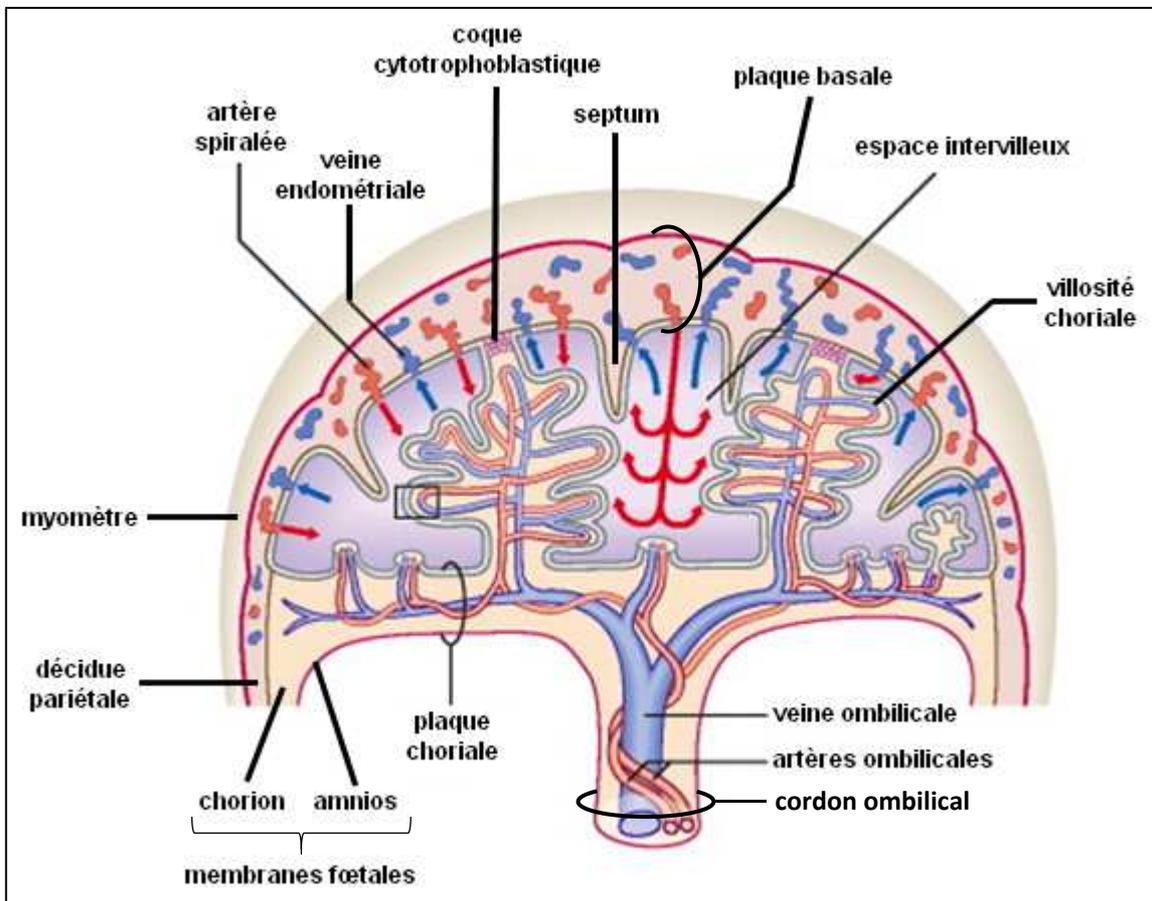


Figure 11 : Structure schématique du placenta à terme.

Le placenta est formé d'une partie fœtale, la plaque choriale, et d'une partie maternelle, la plaque basale. La plaque choriale correspond à l'amnios et au chorion recouvrant le placenta. Le mésenchyme de la plaque choriale contient les vaisseaux fœtaux qui relient le cordon ombilical et les villosités choriales. L'amnios et le chorion se prolongent de part et d'autre du placenta et recouvrent la décidue maternelle (décidue pariétale). Elles sont alors appelées membranes réfléchies, ou plus communément, membranes fœtales.

(Adapté de Mitchell B. et Sharma R., *Embryology*, 2nd édition, 2009)

ii) STRUCTURE DU CHORION A TERME

Le chorion est un feuillet plus épais – 400µm environ (15) – et plus opaque que l'amnios. Il est composé de trois couches, nommées et décrites comme suit, du versant foetal vers le versant maternel (17,20,21) (**Figure 10**) :

- *La couche réticulaire* : Cette couche riche en collagènes et protéoglycanes contient quelques fibroblastes et forme la majorité de l'épaisseur du chorion.
- *La membrane basale choriale* : Cette strate acellulaire adhère fermement à la couche réticulaire et constitue un support pour la couche trophoblastique sous-jacente. Elle est composée de collagène de type IV, de laminine et fibronectine.
- *La couche trophoblastique* : Elle est constituée d'un empilement de deux à dix couches de cellules trophoblastiques. Les trophoblastes les plus profonds sont en contact direct avec les cellules de la décidue maternelle.

Les cellules fibroblastiques et trophoblastiques contribuent toutes deux à la synthèse et la sécrétion des composants des matrices extracellulaires constituant le chorion.

Comme évoqué précédemment, l'amnios et le chorion recouvrant la décidue maternelle forment les membranes réfléchies. Elles ne contiennent ni nerfs, ni vaisseaux sanguins. Les nutriments et l'oxygène sont apportés à l'amnios par diffusion depuis la choriodécidue et le liquide amniotique, alors que le chorion est nourri et oxygéné grâce aux vaisseaux sanguins de la décidue maternelle sous-jacente (28).

L'amnios et le chorion recouvrant le placenta forment quant à eux la plaque choriale, qui correspond à la partie foetale du placenta (**Figure 11**). La couche mésenchymateuse de la plaque choriale contient des vaisseaux foetaux qui relient le cordon ombilical aux villosités choriales (29). Les cellules amniotiques et chorioniques de la plaque choriale sont donc facilement nourries et oxygénés grâce à l'important réseau vasculaire placentaire présent à ce niveau.

Enfin, des cellules macrophagiques d'origine foetale, les cellules de Hofbauer, sont retrouvées au niveau des membranes réfléchies dans les couches fibroblastique et spongieuse de l'amnios, ainsi que dans les couches réticulaire et trophoblastique du chorion

(17). Ces cellules jouent un rôle dans l'élimination du méconium, contenu intestinal du fœtus déversé dans le liquide amniotique (19,30). Au niveau de la plaque chorale, les cellules de Hofbauer sont présentes dans la partie mésenchymateuse des villosités chorales où elles joueraient un rôle dans l'angiogenèse et la morphogenèse placentaire, la régulation immunitaire, le contrôle du contenu en eau dans les villosités ou encore le transport d'ions à travers la barrière materno-fœtale (31).

iii) PROPRIETES BIOPHYSIQUES DES MEMBRANES FŒTALES

Au cours de la grossesse, les membranes fœtales doivent s'adapter aux mouvements du bébé, à l'évolution du volume de liquide amniotique et de la taille du bébé, ainsi qu'aux tensions de l'utérus en croissance auquel les membranes sont accolées. En effet, les travaux de Parry-Jones (12) et Millar (13) ont démontré que la surface de la cavité utérine à terme est environ deux fois plus importante que la surface des membranes fœtales. Une autre équipe a mesuré la surface des membranes fœtales à terme avant et après accouchement, estimant la surface *in vivo* trois fois plus importante que la surface après délivrance (32). Ces travaux mettent ainsi en évidence l'état distendu des membranes fœtales dans la cavité utérine, plus particulièrement à la fin de la grossesse. A cette contrainte physique s'ajoutent les mouvements fœtaux ; il a notamment été démontré qu'un coup de pied donné par un fœtus de cinq mois déplace la cavité utérine et les membranes fœtales de 7mm environ (33). Enfin, le liquide amniotique, dont le volume augmente progressivement jusqu'à la trente-quatrième semaine de grossesse environ (16), exerce une pression dans la cavité utérine qui tend à augmenter avec l'âge gestationnel (34–36).

De nombreuses équipes ont donc cherché à déterminer les propriétés physiques des membranes fœtales – essentiellement dans le but d'en comprendre les ruptures prématurées – mais peu d'entre elles se sont intéressées aux liens existant entre ces propriétés physiques et la biochimie ou l'histologie des membranes. Pourtant, la composition des matrices extracellulaires des membranes fœtales joue un rôle clé dans leur adaptation aux contraintes physiques et le maintien de leur intégrité.

Le groupe Lavery-Miller a été un des premiers à étudier les propriétés physiques des membranes fœtales, démontrant ainsi leurs propriétés viscoélastiques en réponse à une déformation (37–39). En d'autres termes, les membranes sont caractérisées par (i) des propriétés de fluage, soit une augmentation de leur déformation dans le temps sous une charge constante, (ii) des propriétés de relaxation des contraintes, correspondant à une

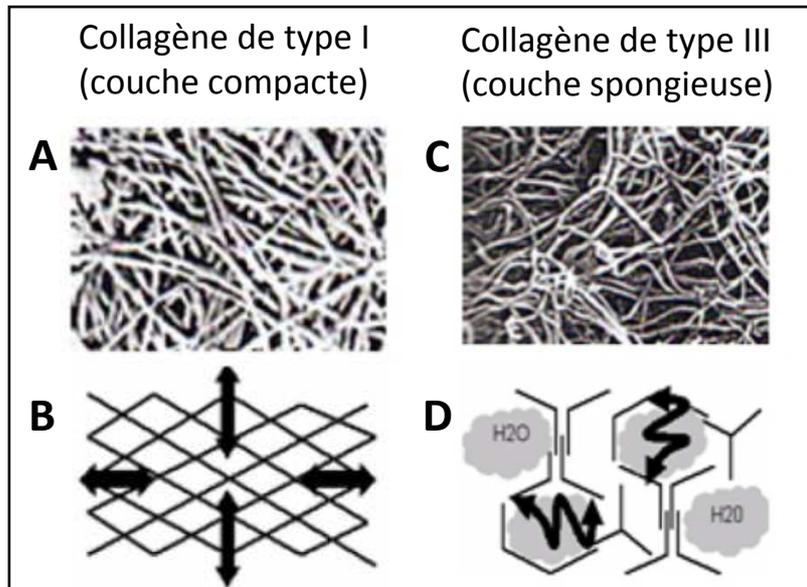


Figure 12 : Organisation tridimensionnelle des collagènes de type I (A, B) et III (C, D) des couches compacte et spongieuse de l'amnios.

Cette figure montre des photographies en microscopie électronique de la couche compacte (A) et de la couche spongieuse (C) de l'amnios, ainsi qu'une représentation schématique du réseau en treillis formé par le collagène de type I, principal constituant de la couche compacte (B) et du réseau lâche et hydraté formé par le collagène de type III, principal constituant de la couche spongieuse (D).

(Adapté de Schmidt W., *The amniotic fluid compartment: the fetal habitat*, 1992 ; Méhats et al., *Biochimie de la rupture des membranes fœtales*, 2011)

diminution de la charge dans le temps nécessaire pour maintenir une déformation constante et (iii) après une déformation, elles sont plus fines et ne récupèrent pas complètement leur forme. Aucune corrélation entre ces caractéristiques et la composition des membranes fœtales n'a été étudiée au cours de ces travaux.

Par la suite, plusieurs études ont montré que, malgré sa plus faible épaisseur, l'amnios est plus résistant aux forces de tension que le chorion (40–42) et qu'il constitue le composant structural principal des membranes fœtales (43). En effet, le collagène de type I de la couche compacte forme un réseau en treillis responsable de la force limite élastique des membranes. Cette organisation permet l'allongement et l'affinement de la couche compacte, avec une certaine limite intrinsèque (**Figure 12, A et B**) (44,45). La solidité de l'amnios est aussi assurée par des ponts de collagènes de types IV et V qui relient la membrane basale aux couches profondes de l'amnios (46). De plus, la couche spongieuse est formée d'un réseau lâche de collagène de type III et possède des protéoglycanes hydratés. Les molécules d'eau présentes dans ce réseau lui permettent d'absorber les chocs et de glisser sur le chorion (**Figure 12, C et D**) (40,44,45). Il est à noter que la résistance aux forces de tension diminue avec l'âge gestationnel, qu'il s'agisse de l'amnios ou du chorion (40).

Enfin, des travaux ont montré que la résistance aux forces de tension des membranes fœtales n'est pas homogène sur toute leur surface. En effet, des morceaux de membranes fœtales prélevés au niveau du site de rupture à terme sont moins résistants par rapport à des morceaux prélevés en dehors de cette zone (47–49). Ceci est dû à la mise en place d'un programme de fragilisation de ces tissus, peu avant le terme de la grossesse, associant des modifications biochimiques et cellulaires dans la future zone de rupture des membranes fœtales. Les caractéristiques de ce programme de fragilisation seront détaillées dans la *PARTIE 1, II. Rupture des membranes fœtales*.

iv) FONCTIONS DES MEMBRANES FŒTALES

Les membranes fœtales ne sont pas simplement un tissu délimitant la cavité amniotique dans laquelle se développe le bébé. Elles remplissent de nombreuses fonctions essentielles au maintien et au bon déroulement de la grossesse.

Protection mécanique :

La composition des membranes fœtales, et leurs caractéristiques biomécaniques évoquées précédemment, permettent de protéger le fœtus contre les chocs extérieurs. Néanmoins, les traumatismes physiques – qui correspondent principalement aux accidents de

la route, aux chutes et aux coups et blessures – compliquent 6 à 7% des grossesses et sont la cause d'avortements spontanés, de travail avant terme, de ruptures prématurées des membranes fœtales ou encore d'atteintes placentaires ou utérines (50–53).

Protection contre les infections :

Les membranes fœtales protègent aussi le fœtus contre les infections bactériennes, virales et fongiques. En effet, étant donné qu'elles constituent une barrière physique imparfaite laissant passer certains pathogènes (54), les membranes assurent un rôle de défense en produisant des molécules antimicrobiennes en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. De plus, des cellules immunitaires sont recrutées dans les membranes fœtales pour faire face à une infection. L'inflammation de l'amnios, du chorion et/ou du placenta est définie sous le terme médical de chorioamniotite.

Les travaux de Zare-Bidaki *et al.* (55) et Kjaergaard *et al.* (56) ont mis en évidence les propriétés antimicrobiennes d'explants d'amnios et de chorion placés au contact de souches bactériennes en évaluant l'inhibition de croissance de ces bactéries sur des boîtes de Pétri. Il a aussi été démontré que l'expression des transcrits et protéines de l'Inhibiteur de Protéases Sécrétées par les Leucocytes (SLPI), molécule impliquée dans la protection des tissus épithéliaux en cas d'inflammation, est augmentée dans les cellules épithéliales amniotiques traitées avec des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1 α , IL-1 β ou le Facteur de Nécrose Tumorale α (TNF α) (57). De même, la stimulation d'explants d'amnios avec IL-1 α conduit à la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que l'élafine, les β -défensines 2 et 3 et la cathélicidine LL-37 (58). Enfin, King *et al.* ont démontré la présence de l'élafine et des β -défensines 1, 2 et 3 par immunohistochimie dans des membranes fœtales à terme. Ils ont également constaté une augmentation du niveau d'expression des transcrits de la β -défensine 2 et l'élafine dans des trophoblastes chorioniques primaires traités avec IL-1 β (59).

En cas de chorioamniotite, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation du niveau d'expression de molécules antimicrobiennes dans les membranes fœtales, telles que les défensines ou encore S100A9 (60,61). Cette inflammation est aussi caractérisée par une infiltration de leucocytes maternels dans les membranes fœtales, provenant des vaisseaux sanguins de la décidue (62). Les neutrophiles fœtaux ont, quant à eux, été uniquement détectés dans la plaque choriale du placenta – une fois le système immunitaire du fœtus mature, soit aux alentours de la vingtième semaine de développement – et pas dans les membranes fœtales (63). Ceci peut être expliqué par le fait que les membranes fœtales réfléchies et la décidue pariétale ne contiennent pas de vaisseaux sanguins fœtaux.

Il est à noter que l'étude des fonctions antimicrobiennes des membranes fœtales ont surtout porté sur le feuillet amniotique car il est largement utilisé dans le domaine médical, par exemple en chirurgie ophtalmique pour le traitement d'ulcères cornéens, en chirurgie dentaire pour le traitement de déchaussements dentaires ou encore en dermato-chirurgie pour le traitement de brûlures (64).

Homéostasie du liquide amniotique :

En plus de leur fonction protectrice, les membranes fœtales jouent un rôle dans la régulation fine du volume du liquide amniotique.

A partir du huitième jour post-fécondation, le liquide amniotique commence à apparaître et serait sécrété par les amnioblastes, futures cellules épithéliales de l'amnios, mais cela n'a pas été formellement démontré à ce jour. De plus, au début de la grossesse, des sécrétions utérines participent à la formation du liquide amniotique (65). Par la suite, une diffusion bidirectionnelle de liquide et solutés se met en place entre le liquide de la cavité amniotique et la vascularisation fœtale. Ils traversent la peau non kératinisée du fœtus ainsi que l'amnios situé autour du cordon ombilical et recouvrant la plaque chorale du placenta (66). La traversée de l'amnios est nommée dans ce cas « voie intramembranaire » et concerne 200 à 500mL de liquide par jour (67). Une autre diffusion bidirectionnelle de liquide amniotique a lieu entre les membranes fœtales et la circulation maternelle utérine. Cette « voie transmembranaire » ne représente qu'environ 10mL de liquide échangé par jour (68). Dans la seconde moitié de la grossesse, le liquide amniotique est principalement formé d'urine et de sécrétions pulmonaires du fœtus (69).

Afin de comprendre l'aspect mécanistique des flux de liquide amniotique, les aquaporines ont été la cible de nombreuses études. Il s'agit de protéines transmembranaires impliquées dans le transport d'eau et/ou de petites molécules (urée, glycérol). Des travaux ont notamment démontré leur présence dans les membranes fœtales et le placenta de diverses espèces (70–76) ainsi que leur implication dans la régulation du volume de liquide amniotique (77–81). De plus, la transcytose vacuolaire, un mécanisme de transport de molécules d'un pôle à l'autre d'une cellule via des vacuoles, est impliquée dans la diffusion par la voie intramembranaire (82) et serait régulée par le Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (VEGF), comme démontré sur le modèle ovin (83–88).

Une quantité trop faible (oligohydramnios) ou trop importante (polyhydramnios) de liquide amniotique peut avoir de graves conséquences sur la grossesse. Pour l'oligohydramnios, ces conséquences regroupent le risque de fausse couche, de retard de croissance intra-utérin ou encore de détresse fœtale due à la compression du cordon ombilical

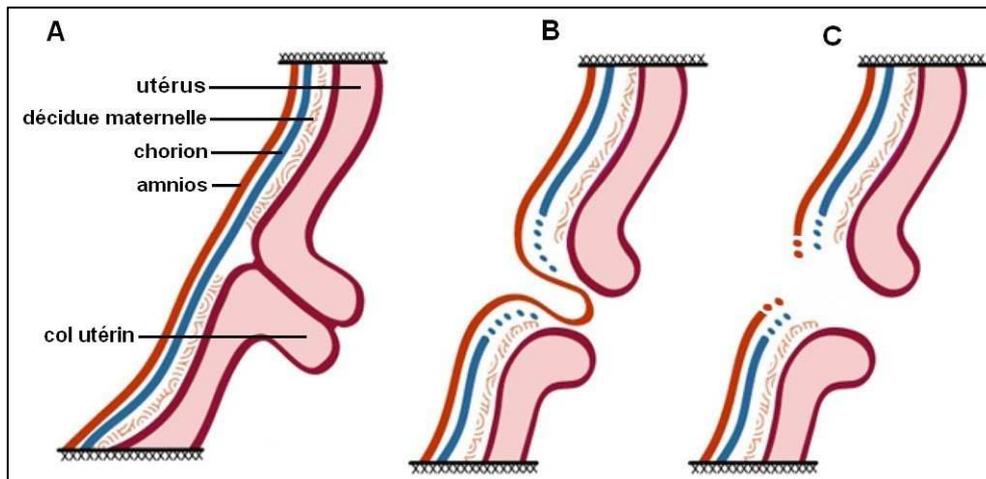


Figure 13 : Les étapes de la rupture des membranes fœtales humaines à terme.

Tout au long de la grossesse, l'amnios et le chorion sont fermement accolés l'un à l'autre (A). Au cours du travail, le col utérin s'ouvre progressivement, les membranes fœtales se distendent et les deux feuillets se séparent. Le chorion rompt en premier (B), puis, l'amnios fait une évagination dans la brèche ainsi formée et rompt à son tour (C).

(Adapté de Méhats *et al.*, *Biochimie de la rupture des membranes fœtales*, 2011)

(89). Pour le polyhydramnios, des cas de rupture prématurée des membranes fœtales, de travail avant terme ou d'hémorragie maternelle post-partum peuvent survenir (90).

Participation à l'accouchement :

La rupture des membranes fœtales à terme constitue, avec les contractions utérines et la dilatation du col de l'utérus, un des événements les plus importants de l'accouchement. La préparation des membranes fœtales et les étapes de leur rupture à terme sont traitées ci-après.

II – RUPTURE DES MEMBRANES FŒTALES

La rupture des membranes fœtales correspond à la rupture du chorion et de l'amnios, suivi par l'écoulement du liquide amniotique. Elle se produit de façon physiologique et spontanée à terme, au cours du travail obstétrical. Mais dans certains cas, cette rupture a lieu avant le terme et est appelée rupture prématurée des membranes fœtales. Les étapes et mécanismes impliqués dans ces deux types de rupture sont traités ici.

1) RUPTURE PHYSIOLOGIQUE DES MEMBRANES FŒTALES

i) CHRONOLOGIE DE LA RUPTURE

La rupture spontanée des membranes fœtales est programmée pour survenir au cours du travail, à terme. Si ce n'est pas le cas, une rupture artificielle des membranes fœtales, ou amniotomie, peut être effectuée par les cliniciens dans le but d'induire ou d'accélérer le travail (91). Cet acte simple peut tout de même conduire à quelques complications, notamment le prolapsus du cordon ombilical (92) et la chorioamniotite (93,94). Chez 8 à 10% des femmes accouchant à terme, la rupture survient spontanément avant le début du travail (95). Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que la rupture des membranes fœtales n'est pas uniquement causée par les contractions utérines (96).

Arikat *et al.* ont déterminé la séquence des événements impliqués dans la rupture des membranes fœtales humaines (**Figure 13**) (49). Tout d'abord, les membranes fœtales se distendent. Puis, le chorion et l'amnios se séparent au niveau de la couche spongieuse et le

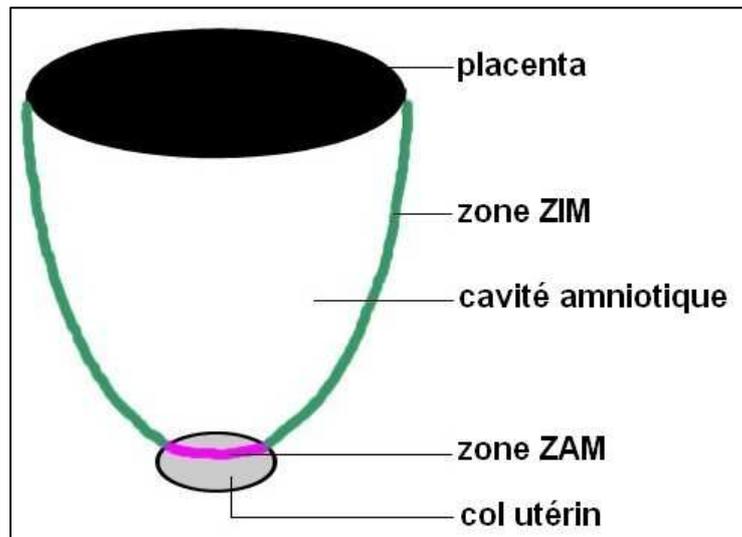


Figure 14 : Représentation schématique des membranes fœtales humaines délimitant la cavité amniotique.

La Zone de Morphologie Altérée (ZAM), en rose, se trouve en regard du col utérin. Les membranes fœtales en dehors de cette région constituent la Zone de Morphologie Intacte (ZIM), en vert.

(Adapté de McLaren *et al.*, *Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix*, 1999)

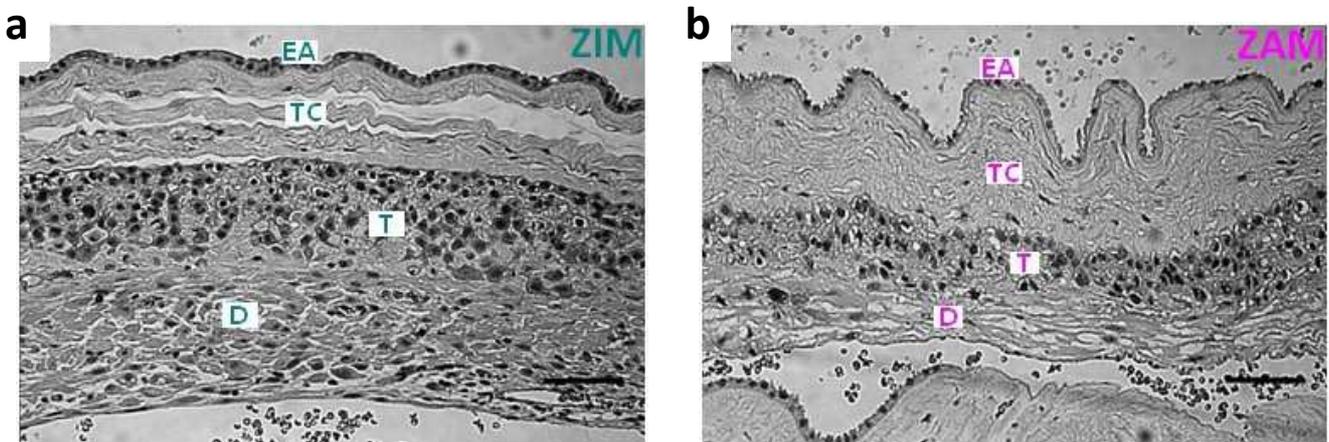


Figure 15 : Coupes histologiques des Zones de Morphologie Intacte (a) et Altérée (b).

Par rapport à la ZIM (a), l'épithélium amniotique (EA) de la ZAM (b) est plus fin et semble s'invaginer dans les couches inférieures. Ces couches de tissu conjonctif (TC), sous-jacentes à l'épithélium amniotique, sont plus épaisses par rapport à la ZIM. La couche trophoblastique (T) du chorion et la décidue maternelle (D) sont, quant à elles, plus fines par rapport à la ZIM. De manière générale, la ZAM est plus fine que la ZIM.

Les coupes de membrane fœtale sont colorées à l'hématoxyline et l'éosine. Echelle = 100µm.

(D'après McLaren *et al.*, *Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix*, 1999)

chorion rompt. L'amnios se distend davantage, de manière non-élastique, et fait hernie dans la déchirure du chorion avant de rompre à son tour.

Les travaux du groupe Malak et Bell ont permis de démontrer la présence d'une zone de « morphologie extrêmement altérée », localisée le long de la ligne de rupture des membranes fœtales sur des échantillons récupérés à terme, après accouchement par voie basse. Ils l'ont nommée Zone de Morphologie Altérée (ZAM), en opposition aux tissus situés en dehors de cette région, soit la Zone de Morphologie Intacte (ZIM) (**Figure 14**) (97). Par la suite, ils ont constaté la présence d'une ZAM dans les membranes fœtales avant le travail, en regard du col utérin. Ceci suggère que la ZAM, située dans la région para-cervicale, constitue le site d'initiation de la rupture des membranes fœtales et qu'elle n'est pas générée par l'action du travail (98).

D'un point de vue histologique, la ZAM est globalement plus fine que la ZIM. Ceci est dû à un amincissement de la couche trophoblastique du chorion ; la décidue est elle aussi plus fine, voire absente en ZAM. L'épithélium amniotique est également plus fin dans la ZAM et semble s'invaginer dans les couches de tissu conjonctif sous-jacentes. Ce tissu conjonctif, comprenant les couches situées entre les membranes basales amniotique et chorionique, est désorganisé et épais en ZAM par rapport à la ZIM où il est dense et compacte (**Figure 15**) (98). La ZAM représente environ 10% de la surface totale des membranes réfléchies (99).

De nombreuses études ont permis de caractériser les facteurs impliqués dans la mise en place de la ZAM et dans la rupture des membranes fœtales.

ii) ETIOLOGIE DE LA RUPTURE

Deux types de facteurs sont retrouvés dans l'étiologie de la rupture des membranes fœtales à terme. Tout d'abord, des modifications biochimiques et cellulaires se mettent en place au sein des membranes fœtales peu de temps avant le terme de la grossesse et constituent le facteur biologique. Principal facteur impliqué dans la rupture, ces modifications constituent en effet un réel « programme de maturation » des membranes fœtales. Puis, l'étirement croissant des membranes fœtales dans la cavité utérine constitue le facteur physique. Ces deux facteurs conduisent à la fragilisation des membranes fœtales, puis à leur rupture à terme.

Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur dégradation par les systèmes antioxydants, conduisant à une accumulation de ces radicaux. Les radicaux libres peuvent dériver de l'oxygène ou de l'azote et sont donc appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Espèces Réactives de l'Azote. Ils sont cytotoxiques car ils oxydent les lipides, les protéines et les acides nucléiques des cellules (100).

Le stress oxydatif fluctue au cours de la grossesse dans la cavité utérine jusqu'à atteindre son maximum à terme. Ceci est notamment dû à une demande métabolique du fœtus qui augmente, un apport de substrats maternels qui lui reste inchangé, une quantité d'antioxydants également inchangée dans les tissus fœtaux et maternels à terme, et une augmentation de la quantité d'ERO dans le liquide amniotique à terme par rapport à d'autres périodes de la grossesse (101).

Plusieurs travaux ont porté sur l'effet d'un stress oxydatif sur les membranes fœtales. Pour l'heure, une seule étude s'est intéressée aux différences entre les zones ZAM et ZIM, montrant une activité réduite d'enzymes antioxydantes et une libération plus importante de 8-isoprostane, un marqueur de peroxydation des lipides, en ZAM par rapport à la ZIM avant le travail (102). Ceci suggère que la ZAM serait plus sensible au stress oxydatif que la ZIM.

Afin d'étudier l'impact d'un stress oxydatif sur des cellules, des explants tissulaires ou encore des modèles animaux, de nombreuses équipes utilisent le Condensé ou l'Extrait de Fumée de Cigarette (CSC ou CSE), deux inducteurs bien connus du stress oxydatif (103–107). Ainsi, des cellules mésenchymateuses amniotiques, des trophoblastes chorioniques et des cellules déciduales traités avec du CSE augmentent leur production d'ERO (108). De même, des cellules épithéliales amniotiques exposées à du CSE voient leur niveau d'ERO augmenter, des cassures de l'ADN induites par les ERO sont également détectées et la quantité de 8-oxoguanine (guanine oxydée) est augmentée (109). De plus, des explants de membranes fœtales stimulés avec le CSE répondent par une augmentation du F2-isoprostane, un marqueur de peroxydation des lipides (110). Enfin, l'induction d'un stress oxydatif dans la cavité utérine de souris gestantes conduit à la peroxydation de protéines dans les membranes fœtales (106).

Le stress oxydatif induit donc de nombreux dommages cellulaires au sein des membranes fœtales.

Marqueur de la sénescence	Abréviation	Fonction
Taille des télomères		La réduction de la taille des télomères induit la sénescence.
Protéines Kinases Associées à un Mitogène p38	MAPK-p38	Enzymes activées par phosphorylation en réponse à un stress, elle sont impliquées dans la mise en place de la sénescence. Quatre MAPK-p38 ont été identifiées à ce jour (α , β , γ et δ).
β -galactosidase Associée à la Sénescence	SA- β -gal	Enzyme dont l'activité n'est observée que dans les cellules en sénescence.
Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence	SASP	Les cellules en sénescence acquièrent un SASP et libèrent des protéines spécifiques (notamment des protéines pro-inflammatoires et des protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire).
Inhibiteur de Kinase 2A Dépendante de Cyclines	CDKN2A ou p19 ^{Arf}	Protéine activée par les MAPK-p38 et impliquée dans la sénescence.
Laminine B1	Laminine B1	Constituant de la face interne de la membrane nucléaire, la laminine B1 est perdue en cas de sénescence.

Tableau 1 : Marqueurs de la sénescence étudiés au niveau des membranes fœtales ou de leurs cellules.

La réduction de la taille des télomères, la SA- β -gal, la laminine B1 et les molécules du SASP sont des marqueurs connus de la sénescence. Les MAPK-p38 et p19^{Arf} sont des protéines dont l'implication dans la sénescence a été montrée et sont donc fréquemment étudiées dans ce contexte.

(Adapté de Bernadotte *et al.*, *Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence*, 2016 ; Dimri *et al.*, *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*, 1995 ; Coppé *et al.*, *The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression*, 2010 ; Freund *et al.*, *Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker*, 2012)

Sénescence :

La sénescence est une réponse cellulaire permettant l'élimination de cellules endommagées en induisant un remodelage tissulaire qui comprend divers processus. Tout d'abord, il y a un arrêt stable du cycle cellulaire de la cellule endommagée. Puis, cette cellule acquiert un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) ; il s'agit de sécrétions spécifiques de la sénescence permettant de recruter les cellules immunitaires et de modifier la matrice extracellulaire. Enfin, des cellules progénitrices sont mobilisées pour repeupler le tissu. L'accumulation de cellules sénescents contribue au vieillissement global d'un tissu, et plus largement d'un organisme (111–114).

Il existe deux types de sénescence : (i) la sénescence répllicative, qui correspond à la capacité de prolifération limitée d'une cellule et dépend de la réduction de la longueur des télomères à chaque cycle cellulaire ; et (ii) la sénescence induite par un stress au cours de laquelle divers facteurs, comme le stress oxydatif, provoquent ou accélèrent la sénescence (115,116).

Des études ont montré que la longueur des télomères des cellules de membranes fœtales humaines (117) et murines (118,119) diminue avec l'âge gestationnel. Ceci peut être causé par le stress oxydatif – qui augmente au cours de la grossesse – car les télomères sont très sensibles aux lésions de type oxydatif (120). Mais ces résultats suggèrent également que les membranes fœtales soient programmées pour avoir une durée de vie relativement courte, correspondant à la durée de la grossesse. De plus, la longueur des télomères est plus grande dans l'amnios par rapport au chorion chez des femmes à terme (121), laissant penser que le chorion subit plus de stress et/ou a une durée de vie plus courte que l'amnios.

Plusieurs marqueurs de la sénescence ont été étudiés au niveau des membranes fœtales à terme ou suite à l'induction d'un stress oxydatif (**Tableau 1**). Ainsi, des études sur les membranes fœtales ont démontré que le travail à terme est associé à la sénescence via l'observation de la réduction de la taille des télomères, la présence de la β -galactosidase Associée à la Sénescence (SA- β -gal), enzyme spécifiquement activée en cas de sénescence, et l'expression de gènes impliqués dans le SASP. Une plus forte concentration de marqueurs du SASP a également été observée dans le liquide amniotique prélevé après le travail, comparé à celui prélevé avant le travail à terme (122,123). Le laboratoire de R. Menon a observé davantage de facteurs associés à la sénescence (plus de 85% de cellules positives pour la SA- β -gal et une perte presque totale de la laminine B1), à terme après travail, dans les membranes fœtales surplombant le col utérin, comparé aux échantillons prélevés dans une région plus éloignée, suggérant une sénescence accrue en ZAM par rapport à la ZIM (données non publiées, citées dans (124)).

Afin de confirmer l'implication du stress oxydatif dans la mise en place de la sénescence, R. Menon et ses collaborateurs ont utilisé du CSE pour induire un stress oxydatif et étudier la sénescence au sein des membranes fœtales. Ainsi, des cellules mésenchymateuses amniotiques, des trophoblastes chorioniques et des cellules déciduales traités avec du CSE présentent une activation par phosphorylation des Protéines Kinases Associées à un Mitogène p38 (MAPK-p38), MAPK recrutées en réponse à un stress et impliquées dans la mise en place de la sénescence. Dans les cellules de l'amnios et du chorion, l'activité de la SA- β -gal est augmentée par le CSE (108). De plus, la stimulation par le CSE de cellules épithéliales amniotiques conduit à une augmentation de la quantité des protéines MAPK-p38 phosphorylées et de l'Inhibiteur de Kinase 2A Dépendante de Cyclines (CDKN2A ou p19^{Arf}), toutes deux connues pour être impliquées dans la sénescence. Une plus forte activité de la SA- β -gal et la réduction de la taille des télomères sont aussi observées (109,122,125,126). De même, sur des explants de membranes fœtales traités avec du CSE, le nombre de cellules positives pour la SA- β -gal et la perte de la laminine B1 sont augmentés, les MAPK-p38 sont phosphorylées et des gènes du SASP sont plus exprimés par rapport à des explants non traités (122). Enfin, un modèle murin d'induction de stress oxydatif a également démontré la mise en place d'une sénescence dans les membranes fœtales, révélée par la présence de la SA- β -gal et la phosphorylation des MAPK-p38 dans ces tissus (106).

L'ensemble de ces données indique que le stress oxydatif provoque la sénescence des membranes fœtales. Cependant, certains auteurs ont aussi proposé que les membranes fœtales aient une durée de vie limitée, correspondant à la durée totale de la grossesse, soit environ quarante semaines. Ils suggèrent ainsi que, comme tout autre organe, les membranes fœtales subissent un vieillissement naturel qui contribue à leur rupture normale à terme, ce phénomène étant accentué par le stress oxydatif à la fin de la grossesse (124).

Dégradation de la matrice extracellulaire :

Tout au long de la grossesse, l'intégrité des membranes fœtales est maintenue en partie 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 matricielles (MMP), et de leurs inhibiteurs (TIMP). Le profil d'expression des MMP dans les membranes fœtales a été largement étudié aussi bien en cas de rupture normale à terme, qu'en cas de rupture prématurée (127). De même, tous les membres des inhibiteurs de métalloprotéases identifiés à ce jour (TIMP-1, 2, 3 et 4) sont exprimés dans les membranes fœtales (128,129).

Plusieurs études ont porté sur le remodelage de la matrice extracellulaire des membranes fœtales dans la ZAM. En effet, l'expression et l'activité enzymatique de la protéine MMP-9 sont augmentées alors que l'expression de TIMP-3 est diminuée dans la ZAM par rapport à la ZIM (48,130,131). De même, l'amnios de la ZAM présente une diminution significative de l'abondance des fibulines 1, 3 et 5, composants de la matrice extracellulaire, par rapport à la ZIM (132). Une étude transcriptomique réalisée entre les zones ZAM et ZIM a révélé que, dans le chorion, l'expression de gènes impliqués dans le processus biologique « interactions matrice extracellulaire-récepteur » est la plus impactée au niveau du site de rupture (133). Tous ces travaux, réalisés sur des échantillons prélevés à terme avant le travail, mettent en évidence un remodelage de la matrice extracellulaire des membranes fœtales, plus particulièrement en ZAM, à la fin de la grossesse. Ceci est corroboré par des études chez le rat qui montrent que les collagènes de type I et IV sont fortement dégradés, et que les MMP-1, 2 et 9 sont plus exprimées dans l'amnios juste avant le début du travail par rapport à des stades de gestation plus précoces (134,135). Enfin, indépendamment des zones ZAM et ZIM, de nombreuses études ont fait état d'une importante dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que d'une dérégulation de l'expression et/ou de l'activité des acteurs responsables de son maintien, au sein des membranes fœtales, après le travail comparé à avant le travail (129,136–142).

Des expériences menées *in vitro* ont permis d'étudier l'impact de divers stimuli, associés à la grossesse et la parturition, sur la matrice extracellulaire des membranes fœtales. Ainsi, suite à l'induction d'un stress oxydatif, l'importante production d'ERO stimule l'expression de la protéine MMP-9 dans des explants de membranes fœtales (108) et l'activité de cette enzyme est augmentée (143). De plus, des données disponibles dans la littérature ont montré que l'enzyme responsable de la synthèse du cortisol, la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, est de plus en plus exprimée dans les membranes fœtales au cours de la grossesse (144). De plus, ces tissus possèdent la plus grande capacité de conversion du cortisol à partir du métabolite inactif, la cortisone, parmi les tissus fœtaux en fin de grossesse (145,146). Etant donné que le cortisol est impliqué dans la maturation des poumons du fœtus en fin de grossesse (147), une équipe chinoise a suggéré qu'il puisse également jouer un rôle dans la parturition, et plus particulièrement dans la rupture des membranes fœtales. Ainsi, dans l'amnios, le cortisol conduit à la dégradation des collagènes de type III (136) et I (137), l'induction de la MMP-7 (138) et la diminution d'expression de la lysyl oxydase LOX, appartenant à un groupe de protéines impliquées dans la formation de pontages entre les collagènes et l'élastine (139). Cette même équipe s'est aussi intéressée aux rôles de l'amyloïde sérique A1 (SAA1), dont la concentration protéique augmente avec le travail dans l'amnios. La SAA1 conduit à une augmentation d'expression des MMP-1, 2, 8, 9 et 13, à une

diminution d'expression de la lysyl oxydase LOXL1, à une activité plus importante des MMP-2 et 9 et à une dégradation du collagène de type I (148,149).

L'ensemble de ces travaux montre que la dégradation de la matrice extracellulaire, qui connecte l'amnios et le chorion, est un événement clé dans la rupture des membranes fœtales à terme.

Apoptose :

Plusieurs travaux ont porté sur l'établissement de l'apoptose, une mort cellulaire programmée, au sein des membranes fœtales à terme. En effet, Runić *et al.* ont prouvé la mise en place d'une apoptose dans les membranes fœtales à terme, notamment par l'observation de noyaux apoptotiques et l'expression du récepteur Fas, acteur majeur de cette mort cellulaire. L'index apoptotique est également plus important dans le chorion à terme par rapport à des échantillons prélevés plus précocement (150). De plus, des fragments de cellules, ou corps apoptotiques, ont été retrouvés dans les membranes fœtales à terme prélevées avant travail, majoritairement dans la couche trophoblastique du chorion et dans la ZAM (151). Les travaux de M. El Khwad et ses collaborateurs ont montré que les formes totale et clivée de la protéine PARP-1 – dont le clivage empêche son activité de réparation de l'ADN et constitue un événement caractéristique de l'apoptose – sont davantage retrouvées en ZAM par rapport à la ZIM à terme (48,131). L'équipe de M. Lappas a mis en évidence une importante apoptose en ZAM (152), et notamment une plus forte expression de marqueurs apoptotiques dans le chorion en ZAM rapport à la ZIM, que ce soit avant ou après le travail (142). Elle a également démontré que les facteurs de transcription FoxO1 acétylé, FoxO3 et FoxO4, connus pour être impliqués dans des phénomènes d'apoptose, sont plus exprimés dans la ZAM que dans la ZIM (153,154). Harirah *et. al* ont aussi démontré de l'apoptose dans la ZIM. En effet, l'index apoptotique est trois fois plus important dans la couche trophoblastique de la ZIM après travail vs avant travail. La choriodécidue de la ZIM présente aussi une plus forte expression de la Caspase-3 active (pro-apoptotique) et une plus faible expression de Bcl-2 (anti-apoptotique) après travail (155).

Quelques études ont porté plus spécifiquement sur l'apoptose au sein de l'amnios. En effet, l'apoptose des cellules épithéliales amniotiques et l'activité des caspases-3 et 8 dans l'amnios sont plus importantes au terme de la grossesse, comparé aux stades plus précoces (156). Cette mort cellulaire s'est également révélée augmentée dans l'amnios avec le travail à terme (157). De plus, le cortisol induit l'apoptose des cellules épithéliales de l'amnios (158). Enfin, chez le rat, les cellules épithéliales de l'amnios subissent une mort cellulaire par apoptose juste avant le début du travail (134).

Ces études mettent en évidence un phénomène d'apoptose dans les membranes fœtales au terme de la grossesse, et ce, plus particulièrement dans la ZAM. Cette mort cellulaire étant mise en place avant l'accouchement, elle contribue au programme de fragilisation des membranes.

Inflammation :

La réaction inflammatoire est un processus de défense de l'organisme qui fait suite à la reconnaissance d'un signal de danger. Si ce signal est d'origine pathogénique (e. g. une bactérie) l'inflammation est dite septique, mais s'il s'agit d'une molécule endogène (e. g. cristaux d'acide urique) l'inflammation est dite stérile. Quel que soit l'origine du signal de danger, la réaction inflammatoire est caractérisée par la reconnaissance de ce signal, le recrutement de cellules du système immunitaire et l'élimination de la source de l'inflammation. Le rôle central de l'inflammation dans le travail et l'accouchement est aujourd'hui bien connu. L'intensification de l'inflammation au sein des membranes fœtales avec le travail à terme (159–167) a aussi posé la question de son implication dans la rupture des membranes fœtales.

Certaines équipes se sont particulièrement intéressées à la ZAM. Ainsi, l'étude de L. Marcellin et ses collaborateurs a mis en évidence des modifications immunitaires en ZAM, similaires au rejet de greffe, juste avant le début du travail. En effet, à la fin de la grossesse, les trophoblastes chorioniques changent leur phénotype et présentent des haplotypes capables d'activer les cellules immunitaires maternelles, menant localement à un processus inflammatoire (168). Ces résultats sont en accord avec l'étude transcriptomique de Nhan-Chang *et al.* montrant un enrichissement des voies de signalisation en rapport avec l'inflammation et la réponse immune dans le chorion de la ZAM comparé au chorion de la ZIM, après accouchement à terme (133). Une autre étude a montré une augmentation d'expression de la molécule chimioattractante SLIT3, connue pour promouvoir la migration de leucocytes en cas d'inflammation (169), en ZAM comparé à la ZIM (170). La ZAM semble donc être le siège de phénomènes inflammatoires importants.

Plusieurs travaux ont mis en évidence des liens entre l'inflammation et d'autres processus impliqués dans la rupture des membranes fœtales. Ainsi, Kumar *et al.* ont démontré que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β , dont les concentrations augmentent dans le liquide amniotique avec le travail à terme (171,172), induisent une diminution de l'expression protéique de TIMP-3, tandis que celle de MMP-9 est augmentée, de même que le clivage de la PARP-1, menant à une fragilisation des explants de membranes fœtales identique à celle observée en ZAM (173). De plus, le TNF α diminue l'expression des fibulines 1, 3 et 5, et augmente celle des MMP-9 et MMP-2 dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses de

l'amnios (132). Le TNF α induit également une activité plus importante de MMP-9 (174) et une apoptose (175) dans les membranes fœtales. L'inflammation peut donc conduire à un remodelage de la matrice extracellulaire et à l'apoptose au sein des membranes fœtales. Cependant, des ligands pro-inflammatoires peuvent aussi amplifier l'inflammation, créant ainsi une « boucle d'inflammation ». Par exemple, le TNF α et IL-1 β stimulent la production de IL-8, un facteur chimioattractant des neutrophiles, dans l'amnios et le chorion (176–178). Ils induisent aussi l'expression des IL-6 et 8 et des chimiokines CXCL1 et CCL2 dans des cellules épithéliales amniotiques (179).

Des études récentes ont établi un lien entre l'inflammation et la sénescence des membranes fœtales, permettant également de mieux comprendre les relations décrites ci-dessus entre l'inflammation et d'autres processus. En effet, Behnia *et al.* ont démontré que la sénescence augmente dans les membranes fœtales avec le travail à terme, de même que la concentration de marqueurs pro-inflammatoires du SASP alors que la concentration de marqueurs anti-inflammatoires du SASP diminue dans le liquide amniotique (123). L'étude de Poletini *et al.* sur un modèle murin a, par la suite, permis d'établir un lien de causalité entre la sénescence et la sécrétion de cytokines dans le liquide amniotique (106). Ainsi, et selon les modèles actuels, les cellules des membranes fœtales devenues sénescents à la suite d'un stress oxydatif, acquièrent un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence et libèrent notamment des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Ces sécrétions promeuvent une inflammation et un remodelage de la matrice extracellulaire.

En plus des molécules du SASP, les cellules libèrent des Motifs Moléculaires Associés aux Dommages cellulaires (DAMP), ou alarmines, suite au stress oxydatif, à la sénescence et à l'inflammation qu'elles subissent. Ce sont des molécules endogènes intracellulaires ayant un rôle pro-inflammatoire à l'extérieur de la cellule. Il s'agit par exemple de la protéine chromatinienne HMGB1, la protéine de choc thermique HSP70, l'histone H3, IL-33, des fragments de télomères, l'acide urique et des fragments d'ADN de cellules fœtales. Une interconnexion entre les effets des SASP et des DAMP a été proposée. En effet, des séquences synthétiques mimant des fragments de télomères induisent la sénescence de cellules épithéliales amniotiques ainsi que l'expression et la libération des IL-6 et 8, sous la dépendance de cette sénescence (180). De plus, HMGB1 conduit à l'activation des MAPK-p38, marqueurs de la sénescence, et l'expression des récepteurs de type Toll TLR2 et TLR4, impliqués dans l'inflammation (181). Enfin, le ligand pro-inflammatoire TNF α induit la libération de IL-6 (molécule du SASP), sous la dépendance de la sénescence, dans des cellules épithéliales amniotiques (182). Les SASP et les DAMP peuvent donc produire une « boucle

d'inflammation et de sénescence » et sont responsables d'une inflammation stérile globale des membranes fœtales, c'est-à-dire non causée par des pathogènes.

Ces signaux inflammatoires se propagent ensuite aux tissus adjacents et participent à la parturition. Cette propagation se fait notamment grâce aux exosomes, décrits comme étant des petites vésicules extracellulaires encapsulant les molécules du SASP et les DAMP. En effet, une étude *in vivo* a montré que, dans le sang de souris gestantes, le nombre d'exosomes contenant des médiateurs inflammatoires augmente progressivement au cours de la gestation. De plus, l'injection d'exosomes, récoltés en fin de gestation, dans la cavité intra-péritonéale de souris en milieu de gestation provoque une mise bas prématurée, associée à une augmentation de médiateurs inflammatoires dans le col utérin, les membranes fœtales et l'utérus (183). La même équipe a également démontré que les cellules épithéliales amniotiques peuvent produire des exosomes et que leur contenu varie selon l'état physiologique de la cellule dont ils proviennent. Par exemple, à la suite d'un stress oxydatif, les exosomes contiennent davantage de HMGB1, HSP70, fragments de télomères et MAPK-p38 phosphorylées (184,185). De plus, une étude *in vitro* a montré que les exosomes provenant de cellules épithéliales amniotiques conduisent à une réponse inflammatoire dans des cellules déciduales et myométriales maternelles (186). De même, le traitement de cellules myométriales avec HMGB1 stimule l'expression de la Cyclooxygénase 2 (COX-2), impliquée dans les contractions utérines, et des gènes pro-inflammatoires TNF α et IL-6 (122).

L'inflammation joue donc un rôle capital dans la rupture des membranes fœtales et sa propagation induit la synthèse de signaux associés au travail dans les tissus adjacents. Les voies de signalisation régulant cette inflammation ne sont cependant pas encore totalement connues. L'équipe de M. Lappas œuvre particulièrement pour l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans l'inflammation des membranes fœtales (179,187–195).

Transition épithélio-mésenchymateuse :

Plusieurs articles ont fait état d'un lien entre la production de MMP et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans divers tissus et cellules, au cours de processus cancéreux ou développementaux (196–200). Se basant sur ces observations et sur le fait que les niveaux d'expression de certaines MMP augmentent dans les membranes fœtales en fin de grossesse, une équipe a récemment mis en évidence une association entre le travail obstétrical et la TEM au sein d'échantillons d'amnios récoltés à terme. En effet, la proportion de cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales est multipliée par six entre des échantillons prélevés avant et après travail. Les auteurs ont également démontré une plus faible résistance de l'amnios aux forces de pression suite à l'induction moléculaire de la TEM

(201). Cette première étude suggère donc une implication de ce phénomène dans la rupture des membranes fœtales à terme. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la TEM au sein des membranes restent cependant à éclaircir.

Étirement :

Comme évoqué précédemment, l'étirement des membranes fœtales augmente progressivement au cours de la grossesse dans la cavité utérine et, bien qu'elles aient une grande résistance aux forces de tension, l'étirement n'est pas sans conséquence sur les membranes. En effet, il a été démontré que l'étirement d'explants de membranes fœtales conduit à une augmentation d'expression de la protéine MMP-9, du ratio MMP-9/TIMP-1, de l'expression de IL-8 et de l'activité de la MMP-1 (202–204). De plus, le contenu en collagène et élastine est réduit suite à l'étirement de l'amnios alors que l'activité des MMP et la quantité de glycosaminoglycanes, responsables du gonflement et de la déstabilisation de la matrice extracellulaire, sont augmentées (205,206). Ainsi, l'étirement stimule des changements biochimiques au sein des membranes fœtales, contribuant à leur fragilisation à terme. De plus, l'étirement de cellules épithéliales amniotiques et d'explants de membranes fœtales conduit à une augmentation de l'expression de COX-2 et de la production de la Prostaglandine E₂ (PGE₂) deux facteurs associés au travail (205–208). L'étirement des membranes fœtales peut donc également être impliqué dans la production et la propagation de signaux associés au travail au niveau de l'interface fœto-maternelle.

Pour conclure, l'ensemble des travaux décrits dans cette partie montre que des facteurs biochimiques, cellulaires et physiques préparent les membranes fœtales pour la rupture à terme, au moment du travail. Les contractions utérines, qui ont longtemps été considérées comme l'élément déclencheur de cette rupture, apportent en fait simplement le point final à cet événement. Située au carrefour entre les divers facteurs impliqués dans la rupture, l'inflammation semble être une étape charnière dans ce processus et a été au centre de ce travail de thèse.

iii) MODELISATION DE LA RUPTURE

La rupture des membranes fœtales à terme fait intervenir l'ensemble des événements décrits ci-dessus. L'équipe de R. Menon s'est particulièrement intéressée à la chronologie de ces événements afin de proposer un modèle de rupture des membranes fœtales au cours de l'accouchement (**Figure 16**) (124,209,210).

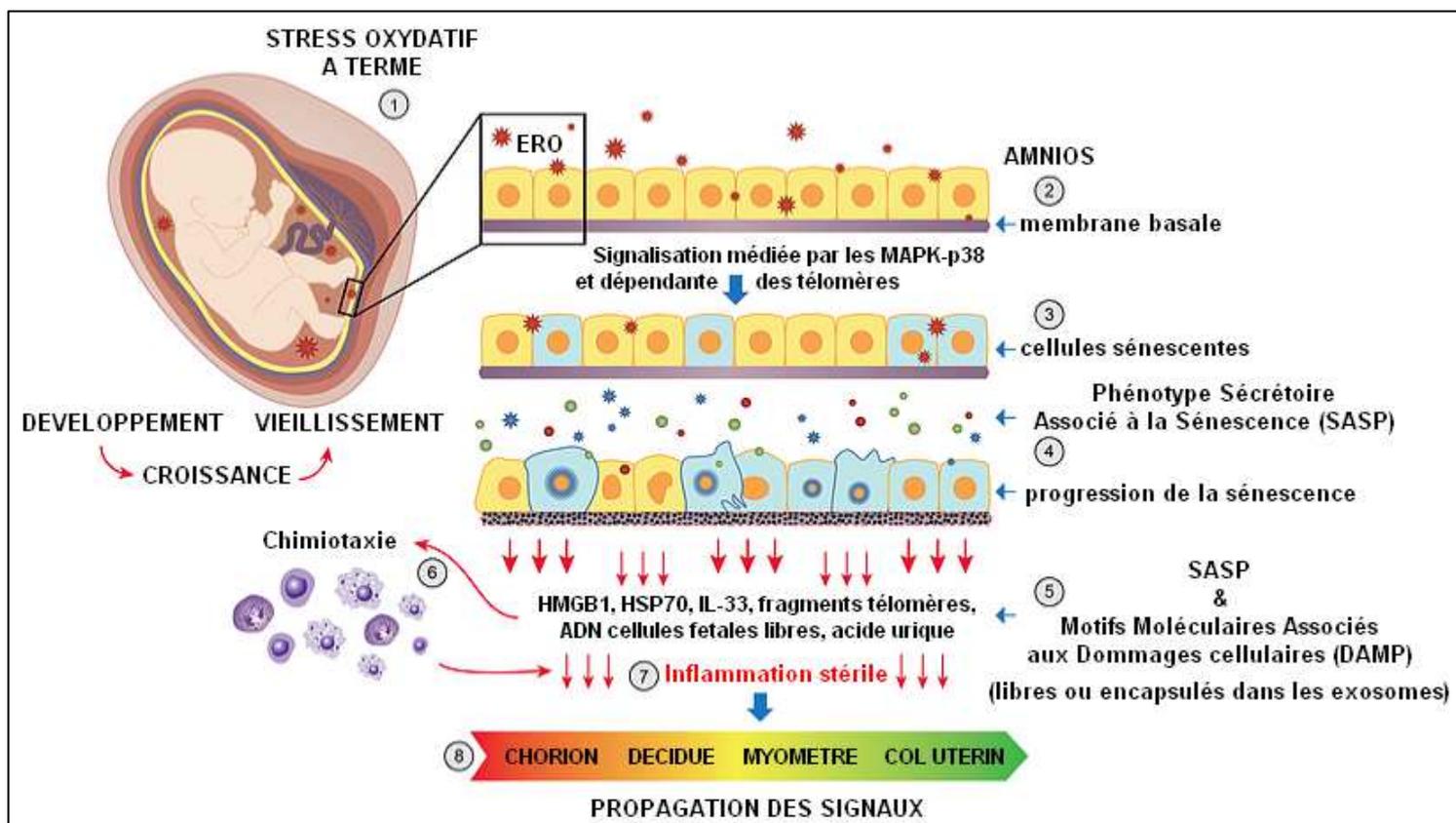


Figure 16 : Modèle représentant les signaux impliqués dans la maturation des membranes fœtales à terme ainsi que leur propagation aux tissus voisins.

1. La quantité d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) est augmentée dans la cavité amniotique à terme.
2. Les ERO provoquent une sénescence des cellules épithéliales amniotiques, dépendante des télomères et de l'activation des MAPK-p38. Le vieillissement naturel des membranes fœtales provoque aussi la sénescence.
3. Les cellules en sénescence acquièrent un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) et libèrent, entre autres, des cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et enzymes de dégradation de la matrice, contribuant à la mise en place d'une inflammation.
4. Le SASP induit la sénescence des cellules amniotiques voisines.
5. En plus des molécules du SASP, les cellules libèrent aussi des Motifs Moléculaires Associés aux Dommages cellulaires (DAMP). Les molécules du SASP et les DAMP sont libres ou encapsulés dans des exosomes.
6. Le SASP et les DAMP favorisent le recrutement de cellules immunitaires par chimiotaxisme.
7. L'ensemble des processus conduisent à une inflammation stérile.
8. Les signaux pro-inflammatoires se propagent aux tissus voisins, ce qui favorise la mise en place du travail.

HMGB1 = High Mobility Group Box 1 protein

HSP = Heat Shock Protein

IL = Interleukin

(Adapté de Menon R., *Human Fetal Membranes at Term: Dead Tissue or Signalers of Parturition?*, 2016)

Selon ce modèle, le stress oxydatif, qui est de plus en plus important au fil de la grossesse, conduit à une accumulation d'ERO dans la cavité amniotique qui provoquent la sénescence des cellules épithéliales amniotiques. Cette sénescence, dépendante des télomères, est médiée par l'activation des MAPK-p38. Par la suite, les cellules en sénescence acquièrent un SASP et libèrent notamment des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Ces molécules accélèrent la sénescence des cellules amniotiques avoisinantes, conduisent à la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisent l'inflammation. Le stress oxydatif, la sénescence et l'inflammation induisent aussi la libération de DAMP par les cellules amniotiques. Les molécules du SASP et les DAMP sont libérées de la cellule sous forme libre ou sont encapsulées dans des exosomes (vésicules extracellulaires). Leur propriété chimioattractante permet de recruter des leucocytes qui participent, avec les molécules du SASP et les DAMP, à la mise en place d'une inflammation dite stérile car non générée par un pathogène. Ces signaux pro-inflammatoires se propagent ensuite aux tissus adjacents (chorion, décidue, myomètre, col utérin) afin d'induire des changements liés au travail, concourant ainsi à l'accouchement. Ces changements incluent, entre autres, l'inflammation et le recrutement de leucocytes dans la décidue, l'arrêt de l'effet anti-contractant de la progestérone sur le myomètre et la maturation du col utérin via l'inflammation.

Bien que relativement complet, ce modèle présente quelques lacunes. En effet, l'apoptose n'est pas abordée ici, alors que l'équipe de R. Menon a démontré l'induction de l'apoptose par le stress oxydatif sur des explants de membranes fœtales (110). La sénescence et l'apoptose sont deux voies de mort cellulaire différentes. Il a été démontré que des cellules sénescents sont résistantes à l'apoptose (211), suggérant ainsi que la sénescence des cellules des membranes fœtales n'est pas suivie de leur entrée en apoptose. Les raisons pour lesquelles une cellule se dirige vers un destin apoptotique ou sénescents ne sont pas encore totalement élucidées. Cependant, certains auteurs suggèrent que le type et l'intensité d'un stress, ainsi que le type de cellule touché par ce stress, sont des déterminants importants dans le choix de la réponse cellulaire (211). Afin d'expliquer la présence de cellules sénescents et apoptotiques au sein des membranes fœtales, il est donc supposable que, selon son type cellulaire et la nature et la dose de stimuli présents dans son environnement proche, une cellule puisse entrer en apoptose *ou* en sénescence.

De plus, ce modèle ne prend pas en compte les zones ZAM et ZIM, et semble considérer que l'ensemble des événements décrits ci-dessus touche la totalité des membranes fœtales. Or, comme évoqué précédemment, des différences morphologiques et biochimiques entre ces deux zones ont clairement été établies. A ce jour, la raison pour laquelle la ZAM est située uniquement en regard du col utérin n'est pas déterminée et plusieurs

théories ont été proposées. Un gradient de concentration de signaux moléculaires entre les pôles supérieur et inférieur de la cavité amniotique a tout d'abord été évoqué (133), mais il semble difficile de conserver un tel gradient en raison des mouvements fœtaux, et même maternels. Une autre hypothèse concerne l'implication du col utérin. En effet, l'assouplissement du col, correspondant à la première étape du remodelage cervical, commence dès le premier trimestre de grossesse chez la femme, soit bien avant le terme (212). Cet assouplissement implique notamment des modifications de la matrice extracellulaire du col conduisant à une diminution de la résistance aux forces de tension (213). Ces modifications pourraient se propager aux membranes fœtales situées en regard du col, et plus particulièrement au chorion qui lui fait face. De même, les membranes fœtales situées en regard du col utérin sont dépourvues, ou presque, de décidue qui constitue pourtant un support physique pour les membranes et qui contribue à l'apport de nutriments et d'oxygène (98,214). Il est donc possible que les membranes fœtales situées à cet endroit soient particulièrement fragilisées du fait de la diminution des ressources et de l'absence de support. Enfin, il est connu que la croissance des membranes fœtales s'arrête à partir de la seconde moitié de la grossesse (12). Ainsi, les membranes doivent s'étirer pour s'adapter à la croissance rapide de l'utérus et cet étirement pourrait affecter plus particulièrement l'intégrité des membranes situées au pôle inférieur de l'utérus.

2) RUPTURE PATHOLOGIQUE DES MEMBRANES FŒTALES

La rupture des membranes fœtales est programmée pour survenir au terme des neuf mois de grossesse, au cours du travail. Cependant, dans des cas pathologiques, la rupture des membranes peut avoir lieu prématurément.

i) LES RUPTURES PREMATUREES ET LEURS CONSEQUENCES

Dans le domaine obstétrical, la rupture prématurée des membranes fœtales est définie comme étant une rupture des membranes avant le début du travail. Elle peut avoir lieu à tout âge gestationnel. On parle donc, dans la littérature, de « Rupture Avant travail des Membranes fœtales » (en anglais, Prelabor Rupture Of Membranes, PROM). Si elle a lieu avant le terme, elle est qualifiée de « Rupture Avant travail et avant terme des Membranes fœtales » (en anglais, preterm Prelabor Rupture Of Membranes, pPROM) (95,215). Il est à noter que certains auteurs utilisent le terme « Premature » au lieu de « Prelabor », mais, dans ce contexte, « Premature » signifie seulement « avant le début du travail » et n'implique pas un arrêt précoce de la grossesse. Ces différentes dénominations sont la cause de nombreuses

confusions dans la littérature, il est donc préférable d'utiliser le terme « Prelabor » qui empêche toute ambiguïté.

Dans 8 à 10% des grossesses à terme, les femmes présentent une PROM. Dans ce cas, l'accouchement a bien lieu à l'issue des neuf mois de grossesse, mais la rupture des membranes fœtales se produit avant le début du travail. Cependant, le travail commence peu de temps après la rupture des membranes ; pour la moitié des femmes, l'entrée en travail se fait dans les 12 heures qui suivent la rupture, et dans 85% des cas, le travail commence dans les 48 heures (95). Les pPROM concernent 2 à 4% des grossesses singletons et 7 à 20% des grossesses gémellaires (95). Elles sont également responsables d'environ un tiers des naissances prématurées (216) et 20% de la mortalité périnatale (95). Les PROM sont associées à des taux élevés de mortalité et morbidité maternelles et périnatales (217–224).

Les PROM peuvent avoir des conséquences à la fois sur la mère et sur l'enfant à naître. Du côté maternel, la PROM est associée à un risque de décollement placentaire, encore appelé hématome rétroplacentaire (225–228). Il s'agit d'un détachement du placenta de l'utérus avant la naissance du bébé. Nelson *et al.* ont supposé que la réduction rapide du volume utérin et de la surface intra-utérine, due à la pPROM, puisse causer le décollement placentaire (229). De plus, l'endométrite post-partum, une inflammation de l'endomètre ayant lieu après la naissance du bébé, est une complication fréquente chez les femmes ayant vécu une pPROM (230), et plus particulièrement si l'accouchement s'est fait par césarienne (231). Mais le risque majoritaire de la PROM pour la mère est la chorioamniotite, l'inflammation du placenta et des membranes fœtales (230). La chorioamniotite peut être causée par l'ascension de germes génitaux (232) ou par contamination suite à des actes médicaux invasifs tels que le touché vaginal (233,234) ou encore le monitoring interne de la fréquence cardiaque du bébé (235). L'incidence de la chorioamniotite est directement liée à la durée de la période de latence, correspondant au temps entre la rupture des membranes fœtales et la naissance du bébé. En effet, plus la période de latence est longue, plus le risque de développer une chorioamniotite est élevé (236,237). De plus, une méta-analyse de Cochrane a conclu que le risque d'infection maternelle (endométrite et/ou chorioamniotite), faisant suite à une PROM, diminue si la période de latence est réduite par l'induction du travail (238). Cependant, la période de latence est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel auquel la PROM a eu lieu (239,240), le but étant de retarder au maximum la naissance en cas de pPROM, jusqu'à ce que le risque infectieux devienne trop important. La chorioamniotite peut aussi être la cause de PROM ce qui sera discuté par la suite.

Du côté fœtal, le prolapsus et la compression du cordon ombilical dus à l'oligohydramnios sont des complications retrouvées en cas de PROM (92,241). Le défaut d'irrigation qui en résulte peut avoir de graves conséquences sur le nouveau-né, allant des troubles neurologiques au décès par asphyxie (242–244). De plus, la PROM est associée à un risque d'infection néonatale et ce risque est d'autant plus élevé que la période de latence est longue (238,245). Le risque d'infection néonatale est également plus important si une infection est détectée chez la mère (246,247). Enfin, la naissance prématurée est la complication majeure de la pPROM. On distingue trois niveaux de prématurité : la prématurité modérée (naissance entre la 32^e et 36^e SA), la grande prématurité (naissance entre la 28^e et 31^e SA) et la très grande prématurité (naissance avant 28 SA) (248). Les conséquences sur le nouveau-né et le futur enfant varient, notamment en fonction de l'âge gestationnel au moment de la naissance. Les troubles fréquemment rencontrés touchent les poumons (dysplasie broncho-pulmonaire, infections respiratoires), les intestins (entérococolite nécrosante), les organes sensoriels (rétinopathie du prématuré, myopie, hypermétropie, surdité), la peau (jaunisse) et le système nerveux-moteur (paralysie cérébrale, épilepsie, troubles cognitifs, dyspraxie, déficit de l'attention) (249). En France et au Royaume-Uni, deux grandes études nationales, Epipage et EPICure respectivement, ont été menées sur des enfants nés prématurément afin notamment d'étudier les causes de la prématurité, d'évaluer le devenir des enfants à long terme et d'établir des lignes de conduite pour une prise en charge adaptée (250,251).

ii) FACTEURS DE RISQUE

De nombreux facteurs de risque de la PROM ont été identifiés à ce jour et peuvent être classés en quatre catégories : les facteurs maternels, médicaux, environnementaux et fœto-utéro-placentaires. Au vu de ses conséquences néfastes, les études épidémiologiques ont surtout porté sur les facteurs de risque de la pPROM.

Parmi les facteurs maternels, un accouchement prématuré ou une pPROM survenus au cours d'une précédente grossesse sont associés à un risque plus important de subir une pPROM pendant la grossesse suivante (252–258). Les cas de pPROM récurrentes ont ainsi suggéré une dimension génétique à cette pathologie et ce point sera discuté par la suite.

Des facteurs comportementaux ont aussi été associés à la pPROM tels que la consommation de tabac (257–262) ou de drogues (263–266) pendant la grossesse. De plus, il a été démontré que l'usage de tabac ou de drogues réduit la période de latence en cas de

pPROM, par rapport à des femmes ayant une pPROM mais ne consommant pas ces substances (267). Quelques études ont montré une corrélation entre le tabagisme passif et le risque de pPROM, mais des études à plus grande échelle et sur une plus longue période sont nécessaires pour confirmer ces résultats (268–270). Pour étudier les effets du tabac sur les membranes fœtales, les équipes utilisent le CSE ou le CSC – qui correspondent aux particules présentes dans la fumée de cigarette – ou bien, des systèmes d'exposition directe à la fumée de cigarette. Ces études ont révélé que le tabac induit un stress oxydatif et une sénescence, responsables de la fragilisation des membranes fœtales (106,109,110,271).

L'aspect nutritionnel de la mère a aussi son importance dans l'étiologie de la pPROM. En effet, un indice de masse corporelle trop faible (272,273) ou trop élevé (274–276) est associé à un risque de pPROM. Une déficience en vitamine C jouerait également un rôle dans la survenue de la pPROM puisque la supplémentation en vitamine C chez des femmes enceintes réduit l'incidence de cette pathologie (277,278). De plus, il a été montré que la concentration en vitamine C est réduite dans le sang maternel en cas de pPROM (279–281) et dans l'amnios à terme en cas de PROM (282). La vitamine C est connue pour être impliquée dans le maintien du réseau de collagènes (283–288). L'anémie maternelle est un autre facteur de risque de la pPROM (289,290). Allen *et al.* ont proposé que l'hypoxie causée par l'anémie puisse conduire à un stress maternel et fœtal, qui stimule la synthèse de la corticolibérine (ou Corticotropin-Releasing Hormone, CRH) (291). La CRH est connue pour réguler positivement l'expression d'acteurs moléculaires impliqués dans la rupture des membranes fœtales (292). De plus, des concentrations élevées de CRH dans le sang maternel ont été reliées à un risque de pPROM (293). Enfin, le diabète a également été corrélé à la pPROM (294–296). De nombreuses études ont permis de mettre en relation les Produits Terminaux de Glycation Avancée (ou Advanced Glycation End products, AGE), fortement présents chez les personnes diabétiques (297), avec la dégradation de la matrice extracellulaire et l'induction d'un stress oxydatif, deux mécanismes impliqués dans la fragilisation des membranes fœtales (298,299). Une étude effectuée sur du sang maternel a d'ailleurs corrélé un niveau élevé de AGE au risque de pPROM (300).

Parmi les facteurs de risque maternels de la pPROM, l'aspect ethnique a aussi été étudié et il a été démontré que le risque de pPROM sporadique ou récurrente est plus élevé chez les femmes afro-américaines que chez les femmes caucasiennes (301,302). Quelques équipes ont tenté d'expliquer ce phénomène. Jones *et al.* ont montré que la taille des télomères dans le chorion est plus courte chez les femmes afro-américaines que chez les femmes caucasiennes, suggérant un vieillissement plus rapide ou une exposition accrue de ce tissu au stress oxydatif chez ces femmes (121). De plus, des polymorphismes touchant des gènes impliqués dans la synthèse et l'homéostasie de la matrice extracellulaire (MMP-8, MMP-

9, SERPINH1) ont été identifiés chez des nouveau-nés de femmes afro-américaines issus de pPROM et ont été corrélés à un risque de pPROM (303–305). Plus récemment, dans trois articles de Modi *et al.*, le séquençage réalisé sur l'ADN de nouveau-nés afro-américains après une pPROM a permis d'identifier des variants génétiques associés à la pPROM affectant des gènes impliqués dans la synthèse du collagène, l'immunité innée et la défense antimicrobienne (306–308).

Des interventions médicales sont également associées à un risque de pPROM. En effet, le cerclage cervical, technique invasive permettant de fermer le col utérin, augmente le risque de pPROM (256,275,309), ceci pouvant être causée par une infection (310). L'amniocentèse, qui consiste à prélever du liquide amniotique pendant la grossesse en traversant le ventre de la mère et les membranes fœtales, est aussi un facteur de risque de la pPROM (311).

L'exposition à des polluants environnementaux – tels que les métaux lourds (plomb, chrome, vanadium), les gaz (monoxyde de carbone, oxyde d'azote, dioxyde de soufre) et les particules fines – peuvent avoir de graves conséquences sur la grossesse, dont la pPROM. En effet, plusieurs études ont montré une corrélation entre un niveau élevé de plomb dans le sang maternel ou les tissus placentaires et la pPROM (312–316). La pPROM a également été corrélée à un taux élevé de chrome (317) et de vanadium (318) dans les urines maternelles. Une étude japonaise a constaté que les femmes enceintes vivant près d'une grande voie routière ont un risque plus important de donner naissance prématurément à leur enfant à cause d'une pPROM (319). Une étude espagnole sur les polluants atmosphériques a montré que le risque de pPROM est fortement augmenté en cas d'exposition à des oxydes d'azote et des particules fines PM_{2,5} (320). Une autre étude réalisée en Australie a montré une relation entre le niveau de particules fines PM_{2,5} dans l'air et le risque de pPROM (321). Les travaux de Wallace *et al.* ont montré qu'une exposition au monoxyde de carbone et au dioxyde de soufre pendant toute la grossesse, ainsi qu'une exposition aiguë à l'ozone, augmentent le risque de PROM (322). L'exposition à des nitrates, sous-produits des agents de désinfection de l'eau, a également été reliée à un risque de pPROM dans une étude australienne (323). Bien que tous ces travaux aient établi une corrélation entre l'exposition à des polluants et le risque de pPROM, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents.

En ce qui concerne les facteurs fœto-utéro-placentaires, il est connu qu'une entrée en travail prématurée est associée à un risque de pPROM, les contractions pouvant fragiliser les membranes fœtales (259,324). De plus, le polyhydramnios est souvent retrouvé comme cause de la pPROM (258). En effet, la distension excessive de l'utérus qui en résulte pourrait induire les contractions utérines responsables de la pPROM (325). Pour les mêmes raisons, les grossesses multiples représentent également un facteur de risque important de la pPROM (95,258,325). En outre, le décollement placentaire, conséquence de la pPROM, peut aussi en être la cause (256,326). Des anomalies telles que l'insertion vélamenteuse du cordon ombilical (insertion du cordon dans les membranes fœtales) (327) ou des malformations utérines (328) sont également associées à la pPROM. De plus, une dilatation précoce du col utérin (258,329) ou un col utérin trop court (324) sont d'autres causes connues de la pPROM.

La chorioamniotite, ou inflammation du placenta et des membranes fœtales, est une conséquence mais aussi une cause de la pPROM (330). Elle est le plus souvent causée par l'ascension de pathogènes vaginaux mais a également été diagnostiquée en l'absence de pathogènes (331,332). Récemment, des experts ont constaté que le terme « chorioamniotite » est utilisé pour nommer des tableaux cliniques hétérogènes caractérisés par une infection, une inflammation, ou les deux. Au niveau clinique, ceci peut mener à une prise en charge inadaptée de la mère et du nouveau-né (par exemple, l'administration inutile d'antibiotiques), et au niveau scientifique, des confusions entre les chorioamniotites d'origine infectieuse et non infectieuse peuvent apparaître dans la littérature. Ces experts ont donc proposé d'utiliser le terme plus général « Inflammation et/ou Infection Intra-utérine », abrégé « Triple I », afin de limiter les confusions (333).

Parmi les pathogènes impliqués dans la pPROM, les mycoplasmes ont été particulièrement étudiés. Il s'agit de bactéries appartenant à la classe des Mollicutes. Plusieurs mycoplasmes ont été identifiés dans le tractus génital : *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum* (ces deux derniers étant souvent regroupés sous le nom *Ureaplasma* spp.) (334). Les *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* sont des bactéries commensales du tractus génital mais peuvent tout de même être impliquées dans des pathologies si leur développement s'accroît (335). Elles ont en effet été associées à la pPROM (336–339) et la chorioamniotite (340–343). Un seul article a suggéré l'implication de *M. fermentans* dans la chorioamniotite (344). Pour le moment, ni *M. genitalium*, ni *M. penetrans* n'ont été associés à la pPROM ou la chorioamniotite.

Pour conclure sur ces études épidémiologiques, il semble important d'en analyser les résultats avec prudence. En effet, la majorité des études sont réalisées dans un seul pays, voire une seule ville, voire un seul hôpital, et sur des périodes variables, allant de quelques semaines à une dizaine d'années. Ces données ne sont donc représentatives que d'une infime partie de la population mondiale et les mesures de santé publique mises en place à la suite de ces études doivent être adaptées aux différents contextes.

Enfin, la diversité et l'abondance des facteurs impliqués dans la rupture prématurée des membranes fœtales démontrent que des mécanismes moléculaires variés peuvent être mis en jeu dans le cas de ces ruptures.

iii) MECANISMES MOLECULAIRES DE LA RUPTURE PREMATUREE

Il est important de comprendre que l'ensemble des mécanismes physiques et biochimiques décrits précédemment comme impliqués dans la rupture physiologique à terme des membranes fœtales, sont également impliqués dans les ruptures prématurées. La différence entre ces deux types de rupture tient du fait que ces mécanismes sont mis en place précocement au cours de la grossesse et peuvent être exacerbés en cas de rupture prématurée.

Ainsi, un stress oxydatif a été observé en cas de pPROM et est similaire au stress oxydatif retrouvé à terme (271,345). Plusieurs études ont montré un lien entre le stress oxydatif et la rupture prématurée des membranes fœtales. Par exemple, la concentration de F2-isoprostane, un marqueur de peroxydation des lipides, est augmentée dans le liquide amniotique en cas de pPROM par rapport à une condition sans pPROM (346). La 3-nitrotyrosine, un marqueur d'oxydation des protéines, est davantage présente dans les membranes fœtales en cas de pPROM ; de même, la concentration d'enzymes antioxydantes est réduite (271,347). D'autres études ont constaté un déséquilibre de la balance oxydation /antioxydation dans des échantillons sanguins (348–353) ou des liquides de lavage vaginaux (354) prélevés chez des femmes avant terme ayant subi une pPROM, mettant ainsi en évidence un stress oxydatif chez ces patientes. Des traitements ayant pour but de réduire le stress oxydatif ont donc été proposés afin de prévenir la pPROM, comme la supplémentation en vitamine C (277,278,355), le sélénium (356) ou les statines (357). Certains facteurs de risque de la pPROM évoqués précédemment sont connus pour induire un stress oxydatif tels que la consommation de tabac et de drogues, l'obésité, les infections ou une mauvaise alimentation (352).

Parmi les conséquences du stress oxydatif, divers travaux ont mis en évidence de la sénescence et une dégradation des membranes fœtales, toutes deux observées en cas de pPROM.

Une sénescence a en effet été reportée dans les membranes fœtales en cas de pPROM et apparaît similaire à la sénescence observée à terme (271). En effet, des marqueurs de sénescence (phosphorylation des MAPK-p38, perte de la laminine B1 et présence de la SA- β -gal) sont majoritairement retrouvés dans les membranes fœtales avant terme avec pPROM par rapport à sans pPROM (347). Dans les mêmes conditions, la taille des télomères des cellules des membranes fœtales est réduite (117), tout comme l'index d'activité de la télomérase dans les trophoblastes chorioniques (358), suggérant un vieillissement intrinsèque précoce des tissus ou une action du stress oxydatif. Peu d'études se sont intéressées au Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence dans le cadre de la pPROM. A ce jour, une seule a porté sur le profil protéique du contenu des exosomes retrouvés dans le liquide amniotique avant terme avec ou sans pPROM. Des protéines principalement liées à l'inflammation sont surreprésentées dans les exosomes avec pPROM (359). La même équipe s'est aussi intéressée aux exosomes présents dans le sang maternel et a constaté, cette fois, que les voies de signalisation associées à l'inflammation, les coagulopathies et le stress oxydatif sont surreprésentées en cas d'accouchement prématuré sans pPROM comparé à avec pPROM (360).

Une forte déstabilisation de la matrice extracellulaire est un élément clé dans la mise en place des pPROM et a été largement documentée. Plusieurs travaux ont mis en évidence un effet du stress oxydatif sur le remodelage de la matrice extracellulaire dans divers tissus, montrant son action sur l'activité ou l'expression d'enzymes de remodelage, ou bien, directement sur les composants de la matrice (361–364). La concentration en collagènes, leur synthèse et la résistance à la protéolyse dans les membranes fœtales issues de PROM à terme sont réduites par rapport à une situation sans PROM, alors que l'activité collagénolytique est augmentée (282,365,366). De même, l'expression de la décorine, un protéoglycane de la matrice extracellulaire, est réduite en cas de pPROM (367). En outre, de très nombreux travaux ont montré que la pPROM s'accompagne d'une importante dérégulation d'expression, de concentration et/ou d'activité d'enzymes impliquées dans le remodelage matriciel, telles que les MMP-1, 2, 7, 8, 9, 14, les TIMP-1, 2 et LOX, dans le liquide amniotique et/ou les membranes fœtales, allant en faveur d'une dégradation de la matrice extracellulaire des membranes fœtales (171,368–381). Des modèles animaux ont confirmé ces résultats en montrant une relation entre une dégradation de la matrice extracellulaire et une mise bas prématurée (382–384).

Des phénomènes d'apoptose ont aussi été mis en évidence au sein de membranes fœtales issues de pPROM. En effet, le nombre de cellules apoptotiques, l'activité de la caspase-3, l'expression de gènes pro-apoptotiques (p53, Bax, TNF α) et la fragmentation de l'ADN sont plus importants en cas de pPROM comparé à sans pPROM, alors que l'expression d'un gène anti-apoptotique (Bcl-2) est diminuée (358,385–389). Il a également été démontré qu'une forte expression de la caspase-3 ou du Facteur Inducteur de l'Apoptose (AIF), ou bien, une faible expression de Bcl-2, augmente le risque de pPROM (390).

Dans un article novateur, Richardon *et al.* ont découvert des microfractures dans les membranes fœtales faisant suite à un remodelage tissulaire normal pendant la grossesse. Leur nombre est augmenté en cas de pPROM par rapport à des échantillons avant terme sans rupture des membranes, mais aussi en cas d'induction d'un stress oxydatif. Ces résultats pourraient donc suggérer que le remodelage tissulaire est moins efficace en cas de pPROM et de stress oxydatif, ce qui fragiliserait ces tissus (25).

Enfin, des phénomènes inflammatoires sont retrouvés dans l'étiologie de la pPROM. Ces phénomènes sont le plus souvent associés à une infection, mais peuvent aussi survenir en l'absence de pathogènes ; l'inflammation est alors dite stérile. Ainsi, certains marqueurs de l'inflammation ont été identifiés en cas de pPROM dans le liquide amniotique, le placenta ou le sang maternel, tels que les IL-1 β , 2, 6, 8, 12, 16 et 18, le TNF α , l'interféron γ , le Facteur de Croissance Epidermique (EGF), la Molécule d'Adhésion Intercellulaire 1 soluble (sICAM-1) et la Protéine C Réactive (CRP) (391–397).

Les infections engendrent des mécanismes connus pour participer à la fragilisation et la rupture précoces des membranes fœtales, tels que l'apoptose, l'inflammation et le remodelage de la matrice extracellulaire. Il existe de très nombreux articles traitant de ce sujet et seuls quelques exemples seront présentés ici. Ainsi, des études *in vitro* ont montré que le virus Influenza provoque l'apoptose des cellules du chorion et stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (398,399). Le lipopolysaccharide ou LPS (utilisé pour mimer une infection par des bactéries à Gram négatif) provoque quant à lui l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et dans le remodelage matriciel, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires dans des explants de membranes fœtales (400–404). D'ailleurs, le milieu de culture récolté après traitement d'explants de membranes fœtales par le LPS induit une activation et une migration de neutrophiles (405). De plus, les membranes fœtales issues de pPROM présentent plus de noyaux apoptotiques si la pPROM est associée à la chorioamniotite (406). En cas de pPROM et d'infection, de fortes concentrations amniotiques de MMP-3 (407), MMP-1 (375), MMP-7 (376) et MMP-8 (374) sont également retrouvées, et une diminution d'expression de la décorine dans les membranes fœtales est aussi observée

(367). Enfin, il est intéressant de noter qu'une stimulation infectieuse du côté chorionique provoque une réponse inflammatoire et une production d'enzymes de remodelage matriciel plus importantes qu'une stimulation du côté amniotique, suggérant que, du fait de sa proximité avec des pathogènes vaginaux, le chorion soit plus sensible que l'amnios aux infections (401,408–410).

Pour l'heure, quelques équipes ont commencé à étudier l'inflammation stérile dans le cadre de la pPROM, apportant ainsi les premières informations sur ce mécanisme récemment reconnu comme primordial dans la rupture des membranes fœtales. En effet, Romero *et al.* ont montré que la concentration amniotique de HMGB1 est plus élevée en cas de pPROM par rapport à une situation avant terme avec membranes intactes, suggérant une association entre la rupture et ce DAMP (411). Une équipe chinoise a également montré qu'au niveau placentaire, l'expression de HMGB1 est plus élevée en cas de pPROM comparé à des placentas récoltés à terme, et il en est de même pour la concentration de HMGB1 dans le sang maternel (412). Dans les mêmes conditions, l'expression de HMGB1 dans les membranes fœtales et la présence de sa forme active dans le liquide amniotique sont augmentées (181). Ces données préliminaires suggèrent que l'inflammation stérile, médiée par les alarmines, est impliquée dans la pPROM. L'inflammation stérile pourrait être provoquée par une augmentation du stress oxydatif causée par divers facteurs de risque évoqués précédemment, dont une infection. En effet, l'infection provoque une inflammation septique et les dommages cellulaires causés par l'infection peuvent conduire à une inflammation stérile.

Enfin, l'étirement physique des membranes fœtales peut également conduire à la pPROM, par exemple en cas de polyhydramnios ou de grossesse multiple, au cours desquels les membranes fœtales sont soumises à un étirement intense (258,325).

Face à certains cas inexplicables ou récurrents de pPROM, la notion de prédisposition génétique à la pPROM a été suggérée et étudiée. Comme évoqué précédemment, certains polymorphismes retrouvés chez les nouveau-nés issus de pPROM dans les populations Afro-Américaines ont été reliés à cette pathologie (303–305). Des Polymorphismes d'un Seul Nucléotide (SNP) maternels ont également été associés à un risque de pPROM. Par exemple, un SNP dans le gène du Cluster de Différenciation CD14, codant pour un récepteur responsable de la reconnaissance du LPS, a été associé à une plus forte susceptibilité à la pPROM ; il conduirait à une réaction immune exacerbée en cas d'infection bactérienne (413). Un autre SNP, touchant cette fois le promoteur du gène Fas et diminuant son expression, a été associé à un risque plus élevé de pPROM, sans pour autant que la raison biologique n'ait été identifiée (414). De plus, un SNP affectant le promoteur du gène du TNF α a été corrélé à

un risque de pPROM ; les auteurs ont suggéré que cet allèle puisse conduire à une production exacerbée de TNF α en réponse à des stimuli activateurs présents dans le tractus vaginal maternel (415). Enfin, une étude réalisée sur une population chilienne a montré que des variants de gènes impliqués dans le métabolisme de la matrice extracellulaire sont associés à un risque de pPROM (416).

Pour conclure, l'ensemble des données présentées ici montrent que la rupture prématurée, tout comme la rupture physiologique à terme, est un phénomène multifactoriel. La pPROM est une maladie touchant les membranes fœtales, c'est pourquoi la plupart des études ayant pour but d'en comprendre les mécanismes portent directement sur ces tissus. Cependant, des modifications sont également observées au niveau du col utérin (417) et du placenta (412,418) en cas de pPROM, suggérant que les membranes fœtales, bien qu'elles soient la cible de cette pathologie, ne sont pas les seuls tissus impliqués.



Cette première partie a permis de faire un tour d'horizon de l'ensemble des phénomènes impliqués dans la rupture des membranes fœtales, que celle-ci se produise à terme ou de manière prématurée. Ainsi, il apparaît désormais évident que ce phénomène fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires et de nombreuses voies de signalisation cellulaires, conduisant plus ou moins précocement à une fragilisation de l'amnios et du chorion. Mon travail de thèse a porté sur les phénomènes inflammatoires de la rupture des membranes fœtales, en se focalisant plus particulièrement sur un de ses acteurs, l'inflammasome.

PARTIE 2

LES INFLAMMASOMES

I – ACTEURS ET FONCTIONNEMENT DES INFLAMMASOMES

1) ACTEURS MOLECULAIRES DES INFLAMMASOMES

- i) LES RECEPTEURS
- ii) L'ADAPTATEUR ASC
- iii) LA CASPASE-1

2) FONCTIONNEMENT ET REGULATION DES INFLAMMASOMES NLRP

- i) FONCTIONNEMENT DES INFLAMMASOMES NLRP
- ii) REGULATION DES INFLAMMASOMES

3) INFLAMMASOMES ET PATHOLOGIES

II – INFLAMMASOMES ET GROSSESSE

1) INFLAMMASOMES ET GROSSESSE NORMALE

2) INFLAMMASOMES ET GROSSESSE PATHOLOGIQUE

III – LA PROTEINE NLRP7

1) STRUCTURE ET FONCTIONS DE NLRP7

- i) GENE ET PROTEINE NLRP7
- ii) ROLES DE NLRP7 DANS L'INFLAMMATION
- iii) AUTRES FONCTIONS DE NLRP7

2) NLRP7 ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

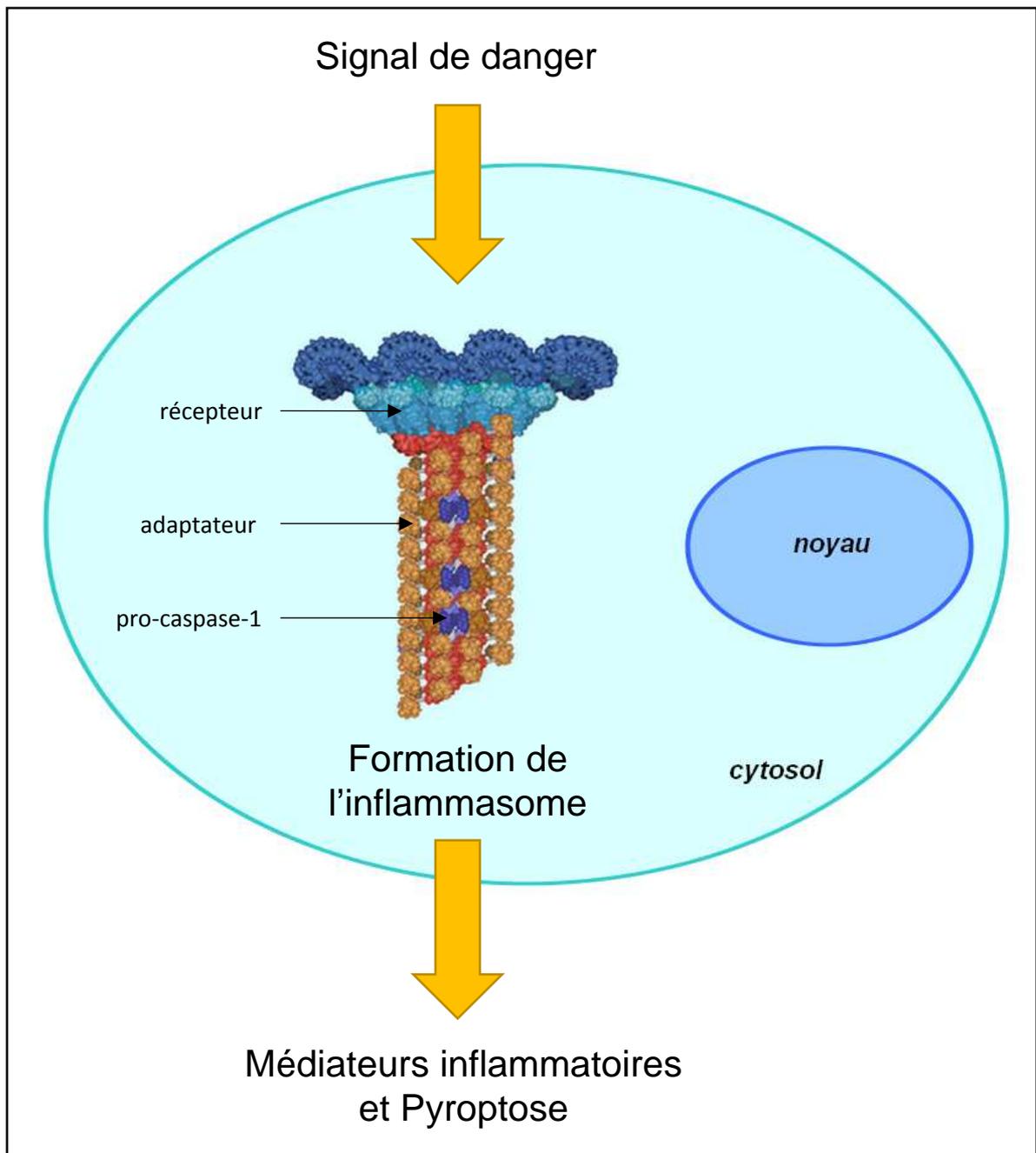


Figure 17 : Fonctionnement schématique d'un inflammasome.

Suite à la reconnaissance d'un signal de danger par une cellule, l'inflammasome est assemblé. Il est constitué de trois types de molécules : le récepteur, l'adaptateur et la pro-caspase-1. L'assemblage de l'inflammasome permet la libération de médiateurs inflammatoires par la cellule et entraîne sa mort par pyroptose.

(Adapté de Schroder K., © The University of Queensland, 2017)

I – ACTEURS ET FONCTIONNEMENT DES INFLAMMASOMES

Face à une exposition quasi-constante à des pathogènes ou autres signaux de danger, l'Homme a développé un système immunitaire extrêmement complexe pour les repérer et s'en défendre. Le système immunitaire inné constitue ainsi la première ligne de défense de l'organisme. Il correspond à une réponse immune immédiate et rapide, mettant en jeu diverses cellules (immunitaires ou non) et une grande variété de mécanismes moléculaires.

Parmi les molécules impliquées dans la réponse immunitaire innée, des plateformes de signalisation multiprotéiques intracellulaires, nommées « inflammasomes » (**Figure 17**), font particulièrement l'objet d'attention depuis la découverte du premier inflammasome en 2002 par l'équipe de Jurg Tschopp (419). Suite à la reconnaissance de signaux de danger, d'origine pathogénique ou non, le rôle des inflammasomes est d'activer des processus inflammatoires et d'induire une mort cellulaire spécifique de l'inflammation appelée « pyroptose ». De nombreuses études sont venues compléter les travaux de Jurg Tschopp et ses collègues, apportant des informations sur les différents types d'inflammasomes, les acteurs moléculaires qui les composent, leurs mécanismes d'action intracellulaires et leurs systèmes de régulation.

1) ACTEURS MOLECULAIRES DES INFLAMMASOMES

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques intracellulaires composés de trois types d'acteurs moléculaires : un récepteur (aussi appelé senseur), la pro-caspase-1 et un adaptateur reliant ces deux protéines. Ces trois acteurs s'assemblent à la suite d'un stimuli pro-inflammatoire (**Figure 17**).

i) LES RECEPTEURS

Les récepteurs de l'immunité innée sont regroupés sous le nom de Récepteurs de Reconnaissance de Motifs moléculaires (PRR, Pattern Recognition Receptor). Ils ont pour rôle d'initier la réponse immune en reconnaissant des signaux de danger d'origine pathogénique ou non pathogénique. En fonction de leur localisation dans la cellule, ils sont divisés en deux classes : les PRR membranaires (situés à la surface de la cellule mais aussi à la membrane des endosomes) et les PRR cytosoliques. Cette répartition permet ainsi de détecter les signaux de danger présents à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule (420). Les PRR sont ensuite divisés en familles en fonction de l'homologie de leurs domaines protéiques (421). Ainsi, deux familles de PRR membranaires ont été identifiées : les Récepteurs Lectine de type

C (CLR, C-type Lectin Receptor) et les Récepteurs de type Toll (TLR, Toll-Like Receptor). Les familles de PRR cytosoliques, quant à elles, sont au nombre de quatre : les Récepteurs de type NOD (NLR, Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor), les Récepteurs de type RIG-I (RLR, Retinoic acid-Inducible Gene-I (RIG-I)-Like Receptor), les Récepteurs de type AIM (ALR, Absent-In-Melanoma (AIM)-Like Receptor) et les Pyrines (420,422). Le Récepteur aux Produits terminaux de Glycation Avancée (RAGE) ne fait pas officiellement partie des PRR mais il peut aisément être considéré comme tel au vu de son implication dans de nombreux processus inflammatoires (423). Bien qu'initialement décrits dans les cellules immunitaires, les PRR sont également exprimés par des cellules non immunitaires telles que les fibroblastes gingivaux (424), les cellules épithéliales intestinales (425) et les cellules endothéliales (426), mais aussi dans des cellules de la sphère placentaire comme les trophoblastes placentaires (427), les amniocytes (428) ou encore les cellules déciduales (429).

Les PRR peuvent détecter des signaux provenant de pathogènes, nommés « Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes » (PAMP), mais aussi des signaux de danger de nature non pathogénique appelés « Motifs Moléculaires Associés aux Dommages cellulaires » (DAMP) ou « alarmines » (420). Il est à noter que, par abus de langage, beaucoup d'auteurs parlent de « molécule DAMP » ou « molécule PAMP », mais un PAMP ou un DAMP désigne un motif moléculaire, soit une petite partie d'une molécule, reconnue par un PRR, et non une molécule entière (430). De plus, le terme PAMP est parfois considéré comme incorrect car il suppose que seuls les micro-organismes pathogènes produisent des motifs reconnus par les PRR. Or, des micro-organismes non pathogènes – les micro-organismes commensaux – produisent eux aussi des motifs détectés par les PRR, ce qui permet au système immunitaire de distinguer les bactéries commensales des bactéries pathogènes et ainsi, de ne pas les attaquer. La reconnaissance des micro-organismes commensaux ne conduit donc pas à une réponse inflammatoire (431–433). Le terme PAMP est ainsi parfois remplacé par le terme plus général « Motifs Moléculaires Associés aux Micro-organismes » (MAMP) dans la littérature.

Pour être qualifiés de PAMP, les motifs pathogéniques doivent répondre à trois critères : (i) leur structure principale est inchangée au sein d'une classe donnée de micro-organismes, (ii) ce sont des motifs uniquement produits par le micro-organisme permettant ainsi une distinction avec les molécules du soi, et (iii) ce sont des motifs essentiels pour la survie du micro-organisme et donc difficiles pour lui à modifier (430). Les PAMP peuvent être présents sur des protéines (flagelline, porine...), des lipides (LPS, lipomannane...), des glycanes (peptidoglycane, glucane $\beta(1\rightarrow3)$...) ou des acides nucléiques (ADN, ARN) (430).

Famille	NLR				
Sous-famille	NLRA	NLRB	NLRC	NLRP	NLRX
Membres	CIITA	NAIP	NOD1 NOD2 NLRC3 NLRC4 NLRC5	NLRP1 NLRP2 NLRP3 NLRP4 NLRP5 NLRP6 NLRP7 NLRP8 NLRP9 NLRP10 NLRP11 NLRP12 NLRP13 NLRP14	NLRX1

Tableau 2 : Sous-familles et membres des Récepteurs de type NOD (NLR) identifiés chez l'Homme.

Les membres de la famille NLR sont classés en quatre sous-familles en fonction du domaine amino-terminal des protéines : NLRA (Acidic transactivation Domain (AD)), NLRB (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat (BIR)), NLRC (Caspase Recruitment Domain (CARD)), NLRP (Pyrin Domain (PYD)) et NLRX (CARD-related X effector domain). La sous-famille NLRX a été créée car le domaine amino-terminal de son seul membre, NLRX1, n'a pas assez d'homologie avec les domaines amino-terminaux connus jusqu'à présent. NLRX1 est présent dans la mitochondrie.

CIITA = Class II major histocompatibility complex Transactivator

NAIP = Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

NOD = Nucleotide-binding and Oligomerization Domain

(Adapté de Yeretssian G., *Effector functions of NLRs in the intestine: Innate sensing, cell death, and disease*, 2012)

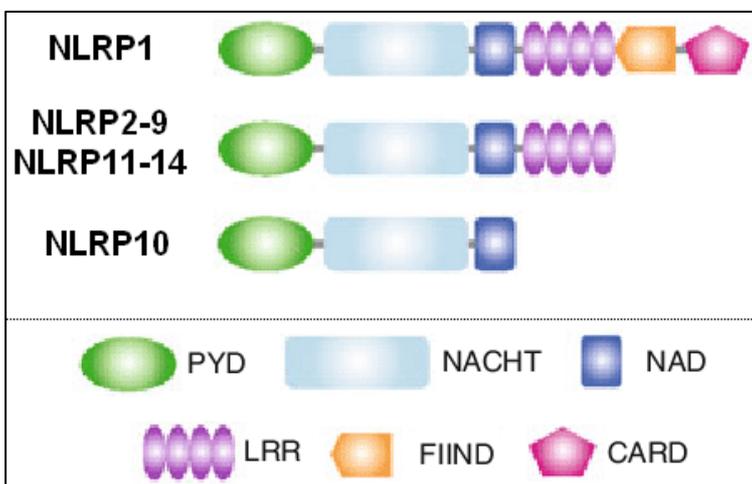


Figure 18 : Représentation schématisique des récepteurs de type NLRP chez l'Homme.

Les domaines protéiques des quatorze NLRP sont schématisés.

NACHT = acronyme des protéines NAIP, CIITA, HET-E et IP1

NAD = NACHT-Associated Domain

CARD = Caspase Recruitment Domain

PYD = Pyrin Domain

FIIND = Function-to-Find Domain

LRR = Leucine Rich Repeat

(Adapté de Yeretssian G., *Effector functions of NLRs in the intestine: Innate sensing, cell death, and disease*, 2012)

Les DAMP, déjà évoqués auparavant, sont quant à eux des motifs de molécules endogènes, naturellement présentes dans les cellules, mais libérées dans le milieu extracellulaire suite à une mort cellulaire. Il s'agit par exemple de la protéine chromatinienne HMGB1, des protéines de choc thermique HSP70 et HSP90, de l'histone H3, de IL-33, de fragments de télomères, de l'ATP ou encore de l'acide urique (420).

Seuls les PRR cytosoliques peuvent former un inflammasome, même s'il a été démontré que certains d'entre eux n'en forment pas (434–437). Les PRR membranaires, quant à eux, ne peuvent pas former d'inflammasomes mais jouent tout de même un rôle primordial dans la réponse inflammatoire. En effet, la reconnaissance d'un ligand pro-inflammatoire par certains PRR membranaires entraîne la mobilisation d'inflammasomes dans la cellule. L'implication des PRR membranaires dans la réponse inflammatoire et leur collaboration avec les inflammasomes seront discutées par la suite.

La suite de cette seconde partie introductive portera plus particulièrement sur une sous-famille de NLR, les protéines NLRP (**Tableau 2**), dont la structure est schématiquement représentée en **Figure 18**. Toutes les protéines NLRP possèdent un domaine central NACHT, acronyme des protéines NAIP, CIITA, HET-E et IP1. Des études sur NLRP3 et NLRP7 ont montré que le domaine NACHT permet une auto-oligomérisation du NLRP dépendante de l'ATP, participant ainsi à l'assemblage de l'inflammasome et la réponse immune (438,439). De plus, les protéines NLRP contiennent toutes un Domaine Associé à NACHT (NAD) qui a également été montré comme impliqué dans l'oligomérisation pour NLRP7 (440). En outre, à l'exception de NLRP10, tous les NLRP possèdent un domaine carboxy-terminal (C-terminal) formé de Répétitions Riches en Leucines (LRR, Leucin-Rich Repeat). Par analogie avec le domaine LRR des récepteurs TLR, qui interagit directement avec un ligand (comme le LPS, des lipopeptides ou des ARN double brin (441)), il a été proposé que le domaine LRR des NLR en fait de même (442). Cependant, l'interaction physique entre un ligand et le domaine LRR des NLRP est pour l'instant à l'état de spéculation et n'a pas encore été formellement prouvée (443). Le domaine LRR permettrait également une auto-inhibition de la protéine NLRP en l'absence de stimuli. Une fois un ligand détecté, le domaine LRR changerait de conformation pour libérer les autres domaines de la protéine. Cette fonction d'auto-inhibition par le domaine LRR n'a pour l'heure été démontrée que sur le NLRC4 murin (444). De plus, ces deux rôles supposés du domaine LRR – soit la détection de ligands et l'auto-inhibition du NLRP – pourraient bien être remis en cause car un article récent a démontré, dans des macrophages murins, que le domaine LRR de NLRP3 n'est nécessaire ni pour son activation suite à la

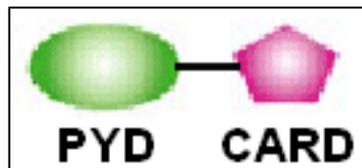


Figure 19 : Représentation schématique de l'adaptateur ASC chez l'Homme.

L'adaptateur ASC est formé de deux domaines : un domaine Pyrine (PYD) et un domaine de Recrutement de Caspase (CARD).

(Adapté de Yeretssian G., *Effector functions of NLRs in the intestine: Innate sensing, cell death, and disease*, 2012)

stimulation par ses ligands, ni pour son auto-inhibition (445). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle du domaine LRR des NLRP. Il est à noter que le récepteur NLRP1 possède deux autres domaines, en plus du LRR, dans sa partie C-terminale : un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain), qui pourrait recruter la caspase-1 (443), et un domaine FIIND (Function-to-Find Domain), dont l'action auto-protéolytique est nécessaire à l'activité de NLRP1 (446). Pour finir, le domaine amino-terminal (N-terminal) des NLRP correspond au domaine Pyrine (PYD, Pyrin Domain). Le domaine PYD des NLRP interagit avec l'adaptateur de l'inflammasome, nommé ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain), permettant ainsi la transduction du signal inflammatoire. La structure et le rôle de l'adaptateur seront détaillés ci-après.

ii) L'ADAPTATEUR ASC

La protéine ASC a été identifiée pour la première fois en 1999 par Masumoto *et al.* à la suite de l'induction de l'apoptose dans une lignée cellulaire humaine de promyéoblaste (447). Par la suite, la même équipe a détecté la protéine ASC dans de nombreux types cellulaires humains, appartenant ou non au système immunitaire (448). La localisation subcellulaire de la protéine ASC, sans aucun stimulus, est controversée. Certains auteurs ont retrouvé cette protéine dans le cytosol (447), ou dans le cytosol et le noyau (449,450), ou bien uniquement dans le noyau (451–453) dans divers types cellulaires. Les premiers travaux ont montré un rôle pro-apoptotique d'ASC (447,454), puis, son implication dans la formation d'inflammasomes a été particulièrement étudiée.

L'adaptateur ASC est formé de deux domaines protéiques, un domaine Pyrine (PYD) du côté N-terminal et un domaine de Recrutement de Caspase (CARD) du côté C-terminal (**Figure 19**), appartenant tous deux à la superfamille des « domaines de mort ». ASC joue le rôle d'intermédiaire entre le récepteur et un autre acteur de l'inflammasome, la pro-caspase-1. Pour cela, il réalise des interactions homotypiques : son domaine PYD interagit avec le domaine PYD du récepteur et son domaine CARD interagit avec le domaine CARD de la pro-caspase-1. L'assemblage de l'inflammasome est donc dépendant de l'adaptateur ASC. NLRP1 et NLRC4 possèdent un domaine CARD leur permettant également d'interagir directement avec le domaine CARD de la caspase-1, mais l'utilisation de l'adaptateur ASC améliore tout de même l'activation de la caspase-1 et la réponse inflammatoire qui suit (443,455).

Les interactions homotypiques ne se limitent généralement pas à la formation de dimères, mais favorisent plutôt l'assemblage de plateformes de signalisation oligomériques. Ainsi, il a été démontré, chez l'Homme et la souris, que la protéine ASC s'assemble en formant

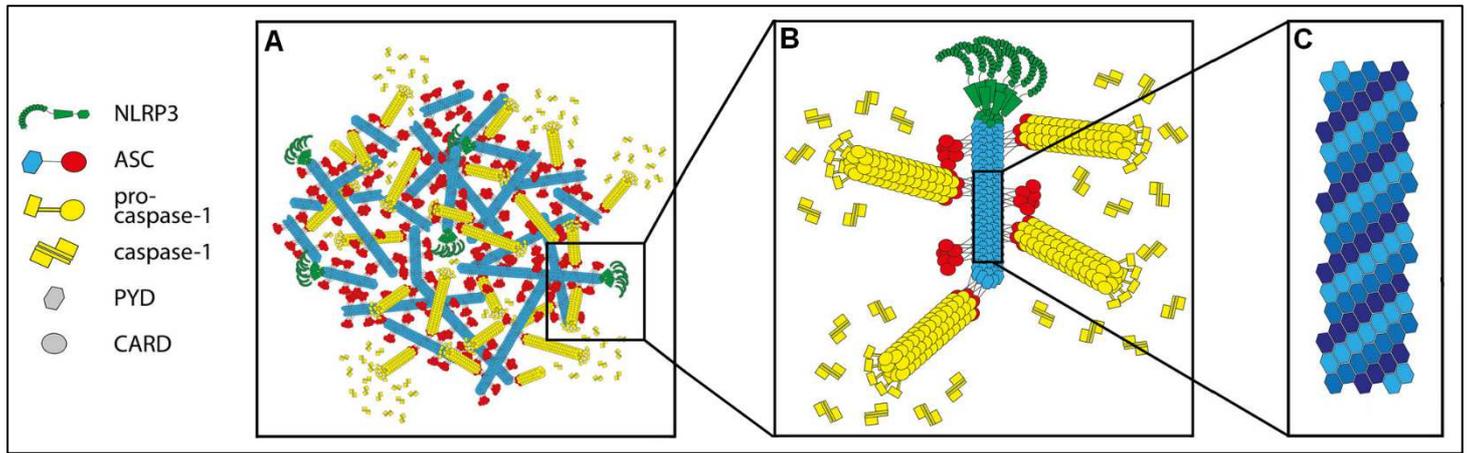


Figure 20 : Représentations schématiques du speck (A), d'un inflammasome (B) et d'un filament d'ASC (domaines PYD, C).

Le speck est un assemblage d'inflammasomes (ici, exemple avec NLRP3). Pour chaque inflammasome, les récepteurs NLRP3 (vert) s'assemblent entre eux, formant un cluster de NLRP3. Les protéines ASC se fixent aux domaines PYD des récepteurs et forment un filament d'ASC, via l'assemblage en quinconce de leurs domaines PYD (bleu). Les domaines CARD d'ASC (rouge) permettent le recrutement de la pro-caspase-1 qui sera clivée en caspase-1 (jaune). Les pro-caspase-1 sont présentées ici comme des filaments.

(Adapté de Hoss F., *Assembly and regulation of ASC specks*, 2017)

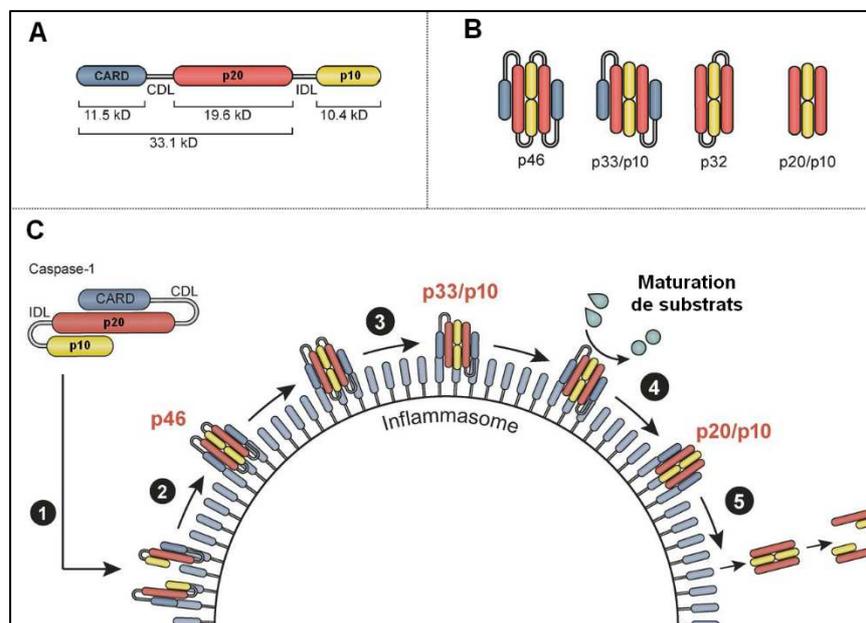


Figure 21 : Structure de la caspase-1 et modèle d'activation chez la souris.

La pro-caspase-1 murine est formée de trois domaines : un pro-domaine ou domaine CARD, un domaine p20 et un domaine p10. Les connecteurs CDL et IDL séparent les domaines (A). Les dimères de caspase-1 peuvent prendre diverses formes selon les clivages ayant lieu au niveau de CDL et/ou IDL (B). Lors de son activation, la pro-caspase-1 est recrutée au niveau de l'inflammasome par les domaines CARD d'ASC (1). La dimérisation de deux protéines permet de former la forme p46 (2). Après clivage des IDL, la forme la plus active p33/p10 est générée et clive ses substrats (3). Pour finir, les CDL sont clivés à leur tour formant la forme p20/p10 (4), le dimère se détache de l'inflammasome et les sous-unités se séparent (5).

(Adapté de Boucher et al., *Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity*, 2018)

des filaments hélicoïdaux (**Figure 20**). Ces filaments sont de longs cylindres creux ayant un diamètre intérieur de 20 Å et un diamètre total de 90 Å (456,457). Ils sont formés par des interactions en quinconce entre les domaines PYD d'ASC. Dans des cellules non stimulées, les monomères ASC restent sous forme libre et soluble (458). Cependant, après la détection d'un stimulus, les récepteurs de l'inflammasome changent de conformation et interagissent entre eux, via leurs domaines NACHT, pour former un cluster de domaines PYD, servant d'ancrage pour la formation de filaments d'ASC (457). Plusieurs filaments sont ainsi formés et les domaines CARD d'ASC, restés libres à l'extérieur du filament, jouent deux rôles. D'une part, ils permettent de lier les filaments entre eux pour former un complexe macromoléculaire globulaire de 1 à 2µm de diamètre, près du noyau, et nommé « speck » (soit littéralement un « grain » dans la cellule), correspondant au regroupement de tous les filaments d'ASC (459). D'autre part, les domaines CARD d'ASC peuvent interagir avec les domaines CARD des protéines pro-caspase-1, permettant la transduction du signal pro-inflammatoire (449). L'inflammasome est donc formé par un cluster de récepteurs, un filament d'ASC et la fixation de protéines pro-caspase-1.

iii) LA CASPASE-1

Découvertes en 1992 (460,461), les caspases sont des protéases à cystéine clivant spécifiquement leurs substrats après un résidu aspartate. Elles sont divisées en deux classes selon leur fonction : les caspases pro-apoptotiques (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) et les caspases pro-inflammatoires (caspases 1, 4 et 5 ; caspase 11 murine) (462). Seules les caspases pro-inflammatoires font l'objet d'attention ici, et plus particulièrement la caspase-1.

La caspase-1 est tout d'abord synthétisée sous forme de pro-caspase-1, un précurseur inactif. Ce précurseur est composé de trois domaines (**Figure 21 A**) : un pro-domaine (ou domaine CARD) en position N-terminale, un domaine p20 central (contenant le site catalytique de l'enzyme) et un domaine p10 du côté C-terminal. Les domaines CARD et p20 sont séparés par le connecteur CDL (CARD Domain Linker) alors que les domaines p20 et p10 sont séparés par le connecteur IDL (Interdomain Linker). La pro-caspase-1 est le dernier acteur recruté pour former un inflammasome complet et ce recrutement permet d'activer cette enzyme. L'équipe de K. Schroder a récemment déterminé la séquence des événements impliqués dans l'auto-maturation de la caspase-1 murine liée à l'inflammasome NLRP3 (**Figure 21 B et C**). Selon son modèle, la caspase-1 est recrutée à l'inflammasome via son domaine CARD qui interagit avec un domaine CARD des filaments d'ASC. La proximité des protéines pro-caspase-1 permet l'interaction de deux protéines entre elles ; le dimère créé correspond à la forme p46. Puis, les connecteurs IDL sont auto-clivés, permettant l'obtention de la forme intermédiaire

p33/p10, forme pleinement active, capable de cliver ses substrats. Ceci est suivi d'un auto-clivage des connecteurs CDL, libérant d'un côté les pro-domaines, et de l'autre, le tétramère p20/p10. Ce dernier se dissocie ensuite de l'inflammasome et les deux sous-unités se séparent. Ainsi, selon ce modèle, ce n'est pas la forme p20/p10, longtemps considérée comme la forme active, qui porte la capacité de clivage de la caspase-1, mais la forme intermédiaire p33/p10 (463). Ceci peut être expliqué par le fait que l'équipe de K. Schroder a travaillé sur des cellules (macrophages murins), alors que les précédentes études visant à déterminer la forme active de la caspase-1 consistaient en des études biochimiques (460).

Une fois maturée grâce à l'inflammasome, la caspase-1 clive les pro-IL-1 β et 18 en leurs formes actives, permettant ainsi la propagation d'un signal inflammatoire après leur libération dans le milieu extracellulaire. La caspase-1 clive également la gasdermine-D et le fragment N-terminal ainsi généré est impliqué dans une mort cellulaire associée à l'inflammation appelée « pyroptose » (464).

Plusieurs études ont mis en évidence une implication d'autres caspases dans la réponse inflammatoire en lien avec l'inflammasome. Ainsi, il a été démontré que la caspase-8 joue un rôle dans la transcription de gènes impliqués dans la formation de l'inflammasome ou dans la réponse inflammatoire dépendante de l'inflammasome (*i. e.* le récepteur NLRP3 et la pro-IL-1 β) (465). Des études ont également montré que la caspase-8 peut être recrutée au niveau de l'inflammasome NLRP3 (465) ou NLRC4 (466), où elle est impliquée dans la maturation de la pro-caspase-1. Enfin, il a même été montré que la caspase-8 peut former un inflammasome capable de cliver la pro-IL-1 β dans des cellules dendritiques murines déficientes pour la caspase-1 (467). Le rôle des caspases-4 et 5, dont l'orthologue murin est la caspase-11, a aussi fait l'objet d'attention dans la voie de signalisation de l'inflammasome. Ces caspases sont impliquées dans la voie non-canonique d'activation de l'inflammasome. En effet, il a été démontré que les caspases-11, 4 et 5 peuvent activer indirectement l'inflammasome NLRP3 menant à la libération d'interleukines (468–470). Elles peuvent également cliver et activer directement la gasdermine D (471,472). Cette voie non-canonique sera abordée à nouveau par la suite.

Le récepteur NLRP, l'adaptateur ASC et la pro-caspase-1 sont donc les trois acteurs moléculaires formant l'inflammasome. Cependant, de nombreuses autres protéines sont impliquées dans la signalisation et dans la régulation des inflammasomes.

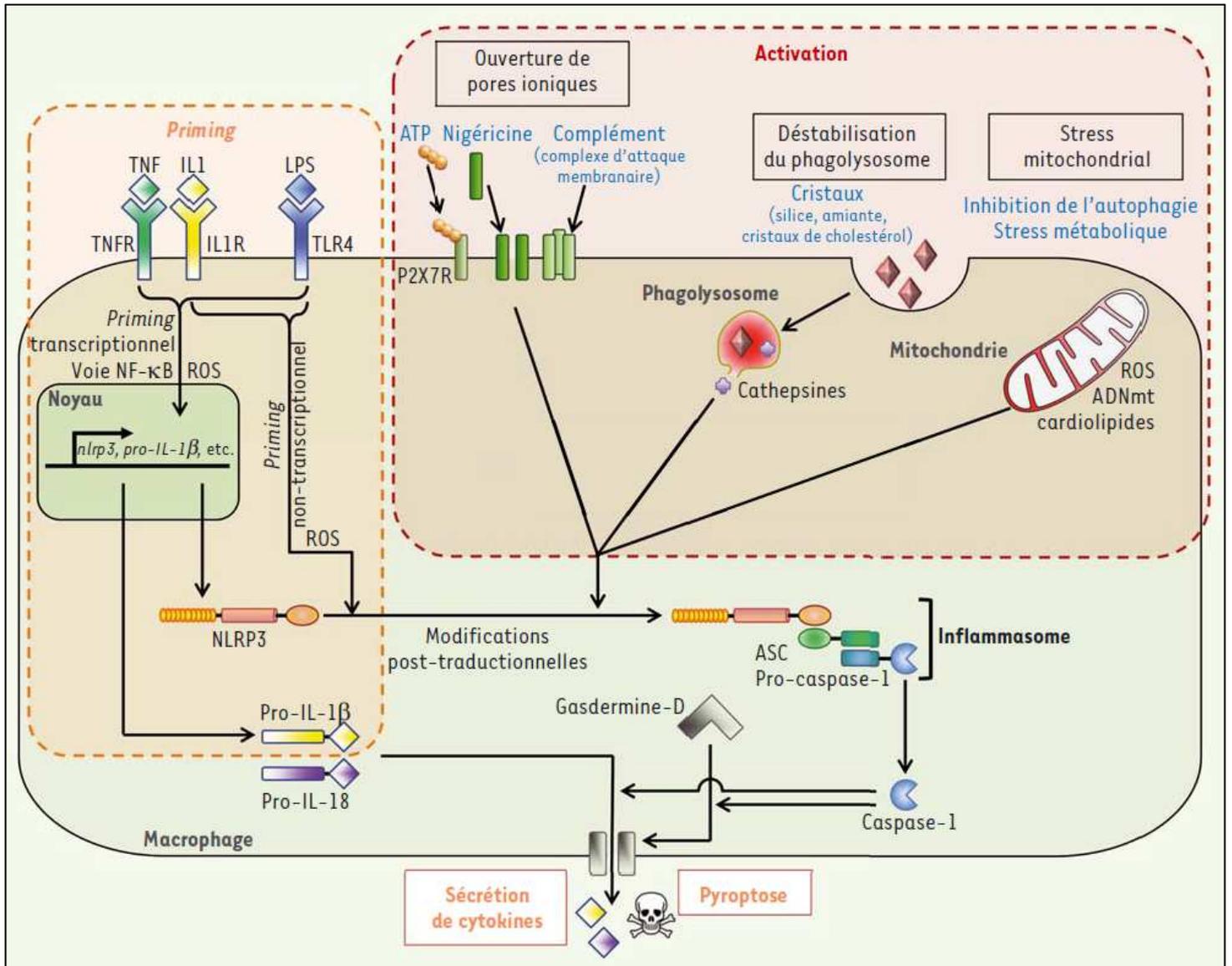


Figure 22 : Voie canonique d'activation de l'inflammasome NLRP3.

L'étape de priming, qu'il soit transcriptionnel ou non, fait suite à l'activation de récepteurs membranaires par des signaux de danger (e. g. LPS) ou des cytokines (e. g. TNF α , IL-1). L'étape d'activation permet l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'activation tels qu'une variation de la concentration en ions (Na⁺, K⁺ et Ca²⁺), une déstabilisation des phagolysosomes et un stress mitochondrial. L'inflammasome formé est fonctionnel et clive la pro-caspase-1 en caspase-1. Cette dernière clive et active les pro-IL-1 β et 18, impliquées dans la réaction inflammatoire, ainsi que la gasdermine D, impliquée dans la formation de pores membranaires responsables de la pyroptose.

TNF = Tumor Necrosis Factor ; TNFR = Tumor Necrosis Factor Receptor ; IL = Interleukin ; IL1R = Interleukin-1 Receptor ; LPS = Lipopolysaccharide ; TLR = Toll-Like Receptor ; NF- κ B = Nuclear Factor-kappa B ; ROS = Reactive Oxygen Species ; ADNmt = Acide Désoxyribonucléique mitochondrial ; ATP = Adenosine Triphosphate ; P2X7R = Purinergic Receptor P2X7 ; NLRP3 = Nucleotide-binding and Oligomerization Domain-Like Receptor, Pyrin Domain containing protein 3 ; ASC = Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain.

(Adapté de Gros Lambert M. et Py B., *NLRP3, un inflammasome sous contrôle*, 2018)

2) FONCTIONNEMENT ET REGULATION DES INFLAMMASOMES NLRP

i) FONCTIONNEMENT DES INFLAMMASOMES NLRP

L'inflammasome NLRP3 est l'inflammasome de type NLRP le mieux décrit à ce jour. Deux voies d'activation sont connues : la voie canonique (ou classique) et la voie non-canonique. L'activation et le fonctionnement de l'inflammasome NLRP3 dans ces deux voies seront développés dans cette partie afin d'illustrer le mécanisme général du fonctionnement des inflammasomes NLRP.

Dans la voie canonique, deux étapes sont nécessaires pour former un inflammasome NLRP3 fonctionnel : une première étape dite de « priming » (aussi appelée « signal 1 »), permettant la transcription et/ou le recrutement d'acteurs inflammatoires, et une seconde étape d'activation de l'inflammasome (aussi appelée « signal 2 »), correspondant à l'assemblage d'un complexe multiprotéique actif, induit par des signaux d'activation (**Figure 22**).

Au cours de l'étape de priming, un signal de danger de type PAMP ou DAMP est reconnu par un récepteur PRR membranaire ou cytosolique. Par exemple, le récepteur membranaire TLR4 interagit avec le LPS (473) ou encore les protéines S100A8 et S100A9 (474), et le récepteur cytosolique NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide (475,476). Certaines cytokines peuvent également induire l'étape de priming telles que le TNF α ou IL-1 β via leurs récepteurs respectifs (477,478). Selon la littérature, suite à la reconnaissance d'un ligand, deux types de priming existent : un priming transcriptionnel et un priming non transcriptionnel (479). Le priming transcriptionnel a été le premier décrit et correspond à la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, notamment NLRP3 et IL-1 β , suite à la stimulation d'un PRR. Dans ce cas, la transcription est déclenchée par la voie NF- κ B, dont l'activation dépend de diverses protéines intracellulaires recrutées suite à la reconnaissance du ligand pro-inflammatoire. Ce type de priming, qualifié de tardif, permet *in fine* la synthèse de nouvelles protéines. Le priming transcriptionnel est nécessaire pour l'expression de certains substrats comme la pro-IL-1 β et la pro-caspase-1. La transcription d'ASC, quant à elle, est stimulée ou non selon les études (478,480–484).

En ce qui concerne, le priming non-transcriptionnel, il ne dépend pas de la synthèse de nouveaux transcrits et protéines, mais repose sur des modifications post-traductionnelles des protéines NLRP3 présentes dans la cellule à un niveau basal. Par exemple, la stimulation du TLR4 par le LPS dans des macrophages murins conduit au priming non-transcriptionnel de NLRP3 par désubiquitination (485). De même, la Kinase c-Jun 1 (JNK1) phosphoryle

rapidement NLRP3 après stimulation du TLR4 par le LPS dans des macrophages murins immortalisés (486). Les auteurs distinguent le priming non-transcriptionnel précoce, mis en place 10 à 30 minutes après l'engagement d'un récepteur, et le priming non-transcriptionnel intermédiaire s'il est mis en place 30 minutes à 1 heure après l'engagement du récepteur. Le priming non-transcriptionnel est également médié par diverses protéines intracellulaires et nécessite des ERO mitochondriaux (485). Le priming non-transcriptionnel permet de rendre disponibles les récepteurs NLRP3 qui, après le signal d'activation, peuvent former des inflammasomes.

Ainsi, les deux types de priming seraient mis en place successivement. Dans un premier temps, le priming non-transcriptionnel répond au signal de danger par l'assemblage rapide de l'inflammasome NLRP3, via des modifications post-traductionnelles. Puis, dans un second temps, le priming transcriptionnel apporte une réponse plus robuste et durable en amplifiant l'expression de NLRP3. Il est à noter que les modifications post-traductionnelles n'ont pas seulement lieu à l'étape de priming, d'autres sont observées lors de la seconde étape, celle de l'activation ou assemblage de l'inflammasome (479).

Au cours de l'étape d'activation, le récepteur NLRP3 détecte un stress cellulaire induit par le stimulus pro-inflammatoire. Ceci conduit à l'assemblage des récepteurs NLRP3 et de ses partenaires protéiques en un inflammasome fonctionnel. Même si les mécanismes précis de détection du stress cellulaire par NLRP3 et les voies de signalisation qui en découlent ne sont pas complètement connus, certains signaux activateurs ont toutefois été décrits. Certains de ces signaux étant inter-reliés, plusieurs d'entre eux peuvent être retrouvés en même temps pour l'activation de NLRP3.

Tout d'abord, l'ouverture de pores membranaires provoque le transport d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique, faisant varier les concentrations intracellulaires de ces ions et activant ainsi les protéines NLRP3. Plusieurs mécanismes ont été décrits. Par exemple, la toxine bactérienne nigéricine – constituant un signal d'activation des inflammasomes aujourd'hui bien connu – capture le potassium (K^+) dans le cytosol et traverse la membrane plasmique avec celui-ci conduisant à l'efflux de K^+ (487). Le canal potassique TWIK2 provoque également la sortie de K^+ (488). Le récepteur purinergique P2X7R, quant à lui, est activé par l'ATP extracellulaire, provenant de cellules nécrosées voisines, ce qui provoque l'entrée de sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}) (489). La libération dans le cytosol de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique et l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule via des canaux ou pores de la membrane plasmique (e. g. le complexe d'attaque membranaire pour des molécules du complément (490)) ont aussi été reliées à l'activation de NLRP3.

De plus, une déstabilisation des vésicules phagolysosomales est impliquée dans l'activation de NLRP3. En effet, des particules telles que la silice, l'amiante, les cristaux de cholestérol ou d'acides uriques ou encore l'amyloïde- β , s'accumulent dans ces vésicules ce qui provoque leur rupture. Les cathépsines, enzymes de dégradation présentes dans les phagolysosomes, sont libérées dans le cytosol, de même que du Ca^{2+} , jouant tous deux un rôle dans l'activation de NLRP3 (491,492). Des specks d'ASC, provenant de cellules mortes voisines, peuvent également être encapsulés dans les phagolysosomes et contribuer à l'activation de NLRP3 une fois ces vésicules rompues (493).

Enfin, les mitochondries sont aussi impliquées dans l'activation de NLRP3, et ce de trois manières différentes. Les ERO mitochondriaux, dont la quantité augmente en cas d'altération de la chaîne respiratoire ou d'inhibition de la mitophagie, sont nécessaires pour l'étape de priming, comme évoqué précédemment, mais également pour l'étape d'activation de NLRP3. De plus, l'ADN mitochondrial oxydé, libéré dans le cytosol lors d'un stress oxydatif, active également NLRP3. Enfin, il a été montré que des éléments mitochondriaux peuvent fixer NLRP3 et contribuer ainsi à son activation ; il s'agit de la protéine Mitochondriale de Signalisation Anti-Virale (MAVS), qui détecte l'ARN viral, et de la cardiolipine, cette dernière étant anormalement présente à la membrane externe en cas de stress mitochondrial (494).

Il est à noter que, comme durant l'étape d'activation, des modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour activer les récepteurs NLRP3. Par exemple, la désubiquitination de NLRP3 par l'enzyme BRCC3 est nécessaire pour l'assemblage de l'inflammasome (495). De même, la phosphatase PTPN22 participe à l'activation de NLRP3 en ciblant une sérine du domaine LRR (496).

A l'issue des étapes de priming et d'activation, les récepteurs NLRP3 recrutent des adaptateurs ASC qui forment des filaments mobilisant à leur tour les pro-caspases-1 pour former un inflammasome actif, puis un speck. Cet assemblage conduit à l'auto-catalyse de la pro-caspase-1 en caspase-1 active, comme évoqué précédemment (463). La caspase-1 clive et active les IL-1 β et 18 (419,497,498). La libération de ces deux cytokines pro-inflammatoires permet une propagation du signal inflammatoire afin de recruter et stimuler des cellules du système immunitaire. La caspase-1 clive également la gasdermine D, générant ainsi un fragment N-terminal actif (aussi appelé fragment pyroptotique ou p30) (499). En effet, avant le clivage, la partie C-terminale de la gasdermine D inhibe la partie N-terminale (500). Les fragments pyroptotiques s'assemblent par seize pour former des pores de 10 à 14nm de diamètre à la membrane plasmique (501). Ces pores induisent une mort cellulaire spécifique de l'inflammation appelée pyroptose. La formation de pores et la mort cellulaire qui s'en suit

entraînent aussi la libération du contenu intracellulaire, dont les IL-1 β et 18 et les specks d'ASC (502–504).

La voie non-canonique d'activation de l'inflammasome peut être mise en place au cours d'une infection par des bactéries à Gram négatif (505). Dans ce cas, le LPS cytosolique, issu de la dégradation intracellulaire de bactéries, est détecté par la caspase-11 chez la souris ou les caspases-4 et 5 chez l'Homme provoquant leur oligomérisation et leur auto-activation (506,507). Ces caspases clivent la gasdermine D qui peut activer l'inflammasome NLRP3 de deux façons : (i) la gasdermine D forme des pores à la membrane plasmique, créant ainsi un efflux de K⁺ qui active l'inflammasome NLRP3, ou (ii) la gasdermine D crée des pores dans la membrane mitochondriale permettant la sortie d'ERO qui activent NLRP3 (471,499,502,508).

Le modèle décrit ici dépeint le fonctionnement de l'inflammasome NLRP3. Cet inflammasome est connu pour être activé par une grande variété de stimuli, c'est pourquoi il est le plus étudié. Les autres inflammasomes étudiés semblent être plus spécifiques, par exemple l'inflammasome NLRP1 est activé par *Toxoplasma gondii* et par une toxine létale produite par *Bacillus anthracis*, la formation de l'inflammasome NLRC4 est stimulé par des salmonelles et par les flagelles bactériens, et l'inflammasome de type Pyrine est formé après une stimulation par des toxines de *Clostridium difficile*, *Histophilus somni* et *Burkholderia cepacia* (455).

La cellule a donc développé de multiples moyens pour reconnaître des signaux de danger et propager ces signaux par le biais d'une inflammation stérile ou septique. Néanmoins, pour éviter une activation involontaire et excessive d'un inflammasome, ou pour stopper sa signalisation après stimulation, elle doit également développer des systèmes de régulation.

ii) REGULATION DES INFLAMMASOMES

Les modifications épigénétiques, l'épissage alternatif de transcrits et les modifications post-transcriptionnelles constituent un premier niveau de régulation de la voie de signalisation de l'inflammasome. En effet, une étude a montré que, dans la lignée monocyttaire THP-1, l'ADN du promoteur de NLRP3 est méthylé dans une situation sans stimulus, ce qui permet de diminuer l'activité du promoteur et d'inhiber l'inflammasome. Mais, après une infection par

exemple par une souche de *Mycobacterium tuberculosis*, le promoteur est déméthylé, et le gène NLRP3, est transcrit (509). De plus, l'activation d'inflammasomes pourrait également être régulée par des modifications d'histones. En effet, Lui *et al.* ont constaté une augmentation de l'expression de NLRP3 chez des patients souffrant de neuropathies douloureuses, ce qui peut être empêché en inhibant l'acétylation des histones (510). Hoss *et al.* ont récemment démontré que l'activité de l'inflammasome NLRP3 peut aussi être régulée par un épissage alternatif qui conduit à la production d'une isoforme ne contenant pas l'exon 5, ce qui rend le récepteur inactif car incapable de former un inflammasome (511). L'épissage alternatif d'ASC peut également être un moyen de réguler l'inflammasome, certaines isoformes étant capables de former un inflammasome actif, alors que d'autres non (512). Enfin, plusieurs micro-ARN ciblant et régulant négativement NLRP3 ont été identifiés (513–516).

Les modifications post-traductionnelles constituent un deuxième niveau de régulation. Les modifications post-traductionnelles peuvent toucher le récepteur NLRP3, ce qui a déjà été évoqué ci-dessus, mais aussi ses deux autres partenaires protéiques, l'adaptateur ASC et la caspase-1. En effet, ASC est ubiquitiné par une enzyme du Complexe d'Assemblage d'Ubiquitines Linéaires (LUBAC) ce qui est nécessaire pour l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3, sans pour autant qu'il n'ait été déterminé si cette ubiquitination a lieu à l'étape de priming ou d'activation (450). L'ubiquitination d'ASC joue également un rôle dans l'arrêt de la réponse cellulaire à la fin de l'étape d'activation car elle permet de cibler l'inflammasome pour une dégradation par le système d'autophagie (517). Enfin, Hara *et al.* ont montré que l'adaptateur ASC est phosphorylé par les kinases SYK et JNK avant l'étape d'activation et est nécessaire pour l'oligomérisation d'ASC et la formation du speck, mais pas pour son recrutement au récepteur NLRP3 (518). La caspase-1 peut également subir des modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation de l'inflammasome. Ainsi, il a été montré que la caspase-1 est ubiquitinée dans son domaine CARD par l'enzyme cIAP-2 après une stimulation par des signaux activateurs de l'inflammasome NLRP3, et que ceci est nécessaire à la production de IL-1 β via l'inflammasome (519). Une autre étude a montré que la caspase-1 est inhibée par l'ion superoxyde via une glutathionylation (ajout du peptide glutathion) menant ainsi à une diminution de la production de cytokines dépendante de la caspase-1 (520).

Les protéines POD (PYD-Only Protein) et COP (CARD-Only Protein) sont des protéines cytoplasmiques constituées respectivement d'un domaine PYD ou CARD. Elles servent de leurre et interagissent via des liaisons homotypiques avec des protéines ayant les

mêmes domaines, bloquant ainsi l'activation de l'inflammasome (521). Plusieurs études ont ainsi montré l'effet régulateur des protéines POP et COP sur divers inflammasomes. POP1 et POP2 se lient à ASC empêchant la formation et l'activation d'inflammasomes dans des macrophages humains ou murins, respectivement (522,523). POP1 et POP2 inhibent également la voie de signalisation NF- κ B, or, celle-ci est essentielle pour la transcription des récepteurs des inflammasomes (e. g. NLRP3) et la pro-IL-1 β lors de l'étape de priming (523–525). POP3, quant à lui, ne se lie pas à ASC, mais peut interagir avec AIM2, un des ALR, inhibant ainsi la formation de l'inflammasome AIM2 (526). L'une des protéines COP les plus décrites, CARD17, est capable de se lier à la pro-caspase-1 empêchant *in fine* l'activité des inflammasomes (527,528). Un autre membre des COP, CARD16, interagit avec la pro-caspase-1 et sa surexpression bloque la libération de IL-1 β lors d'une stimulation par le LPS (529,530).

Dans cette partie, une attention particulière a été portée sur les systèmes de régulation touchant les acteurs moléculaires formant directement l'inflammasome. Cependant, il ne faut pas oublier que la régulation de l'inflammasome peut également passer par une régulation d'autres acteurs tels que les PRR membranaires (531,532), les protéines intracellulaires de transduction du signal (533) ou encore les interleukines (534).

3) INFLAMMASOMES ET PATHOLOGIES

De nombreuses pathologies impliquant les inflammasomes sont connues à ce jour et quelques exemples sont abordés ici.

Encore une fois, NLRP3 a été largement étudié dans ce contexte. Ainsi, des mutations gain de fonction de NLRP3 sont reliées au Syndrome Périodique Associé à la Cryopyrine (CAPS). Il s'agit d'un groupe de trois maladies auto-inflammatoires caractérisées par de la fièvre, un rash cutané et des troubles squelette-musculaires. Le CAPS est causé par une sécrétion accrue de IL-1 β , menant à une inflammation excessive (535). Ce syndrome pourrait également être lié à des variations épigénétiques puisque Vento-Tormo *et al.* ont montré que la capacité de déméthylation de l'ADN (nécessaire à l'expression de NLRP3 après stimulation) de monocytes prélevés chez des patients CAPS est plus efficace que chez des individus sains (536). Certains polymorphismes de NLRP3 ont également été associés à des risques de développer des cancers tels que le mélanome (537) ou le cancer colorectal (538). De plus, l'expression de NLRP3 se trouve augmentée dans de nombreux cancers (539–543). NLRP3 est également impliqué dans la maladie d'Alzheimer. En effet, les agrégats β -amyloïdes,

caractéristiques de cette pathologie, stimulent l'inflammasome NLRP3 dans les cellules de la microglie qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines induisent la production de facteurs neurotoxiques et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules voisines, participant ainsi à la mort des cellules (492,544,545). Une implication de l'inflammasomes NLRP3 dans des pathologies hépatiques caractérisées par une inflammation stérile a aussi été démontré (546). Enfin, l'acide urique, produit en excès et accumulé au niveau des articulations en cas de goutte, peut activer l'inflammasome NLRP3, provoquant ainsi une inflammation (547).

D'autres inflammasomes ont été décrits comme impliqués dans des pathologies. Des mutations dans la Pyrine sont responsables de la Fièvre Méditerranéenne Familiale, maladie caractérisée par des épisodes de fièvre, une inflammation et des douleurs articulaires et abdominales (548), dans laquelle une sécrétion accrue de IL-1 β est retrouvée. Des mutations rares du gène NLRP12 ont été identifiées dans un groupe de maladies auto-inflammatoires ressemblant au CAPS et nommé Syndrome Périodique Associé à NLRP12 (NLRP12-APS). Comme chez les patients CAPS, une augmentation ou une accélération de la sécrétion de IL-1 β par les monocytes est observée chez les patients NLRP12-APS (549,550). Il a aussi été reporté que des mutations dans les domaines PYD et LRR du gène NLRP1 sont responsables de pathologies auto-inflammatoires touchant principalement la peau telle que le vitiligo, le carcinome multiple autorégressif palmo-plantaire, la kératose lichénoïde chronique ou encore le lupus érythémateux systémique, dans lesquelles la production de IL-1 β est augmentée (551–553).

Les pathologies évoquées ici ne sont que quelques exemples non exhaustifs. De très nombreux travaux portent sur le rôle des inflammasomes au cours de diverses pathologies, dans le but de développer des thérapies ciblant la voie de signalisation des inflammasomes (554,555).

II – INFLAMMASOMES ET GROSSESSE

Le rôle des inflammasomes au cours des grossesses normale ou pathologique est de plus en plus étudié, et ce, dans plusieurs tissus, qu'il s'agisse du placenta, des membranes fœtales, de l'utérus ou même du fœtus lui-même.

1) INFLAMMASOMES ET GROSSESSE NORMALE

La plupart des études portent sur l'implication des inflammasomes dans les grossesses pathologiques, ainsi, peu de données sont disponibles sur l'implication des inflammasomes et la grossesse normale. Ces données ont été obtenues via des études sur le myomètre, les membranes fœtales et le liquide amniotique, et concernent presque exclusivement le terme de la grossesse.

A terme, les membranes fœtales expriment les transcrits des dix TLR, ainsi que les protéines NLRP1, NLRP3, ASC, caspase-1, NOD1 et NOD2 (556). De plus, les transcrits et/ou protéines intervenant dans la voie des inflammasomes (NLRP3, NOD2, caspase-1, caspase-4, IL-1 β) sont plus exprimés avec le travail dans les membranes fœtales (165,557). Gomez-Lopez *et al.* ont également démontré que les complexes ASC/caspase-1 sont retrouvés dans les membranes fœtales à terme, et ce, de façon plus importante après le travail (558). Les specks d'ASC ont été détectés dans les leucocytes de la choriodécidue à terme, surtout après le travail (558). De même, dans le myomètre, les transcrits et protéines de NLRP3 et de la caspase-1 sont plus exprimés à terme après le travail, et NLRP3 est impliqué dans l'expression de médiateurs favorisant l'inflammation et le travail (557,559). Ces travaux suggèrent donc que les inflammasomes sont formés dans les membranes fœtales et le myomètre à terme, et qu'ils contribuent à l'inflammation mise en place dans ces tissus en fin de grossesse.

De plus, l'adaptateur ASC, la caspase-1 et la gasdermine D sont détectés dans le liquide amniotique à terme et leur concentration augmente avec le travail (560,561). L'expression de la gasdermine D augmente également avec le travail dans les membranes fœtales où cette protéine co-localise avec la caspase-1 et IL-1 β (561). Ces données suggèrent là aussi que la pyroptose est mise en place dans les membranes fœtales à terme et qu'elle peut être impliquée dans la parturition en fin de grossesse.

Enfin, l'incubation d'explants de membranes fœtales avec HMGB1, un DAMP retrouvé dans les membranes fœtales et le liquide amniotique à terme (181,562), induit l'expression de composants des inflammasomes, comme TLR2, TLR4, NLRP3, AIM2, NOD1, NOD2 et la caspase-1, ainsi que la sécrétion de IL-1 β (181,563). Ceci suggère que des DAMP, présents naturellement à la fin de la grossesse, peuvent activer les voies de signalisation des inflammasomes dans les membranes fœtales, contribuant ainsi à leur rupture à terme.

Ces données préliminaires tendent donc à montrer une implication physiologique des inflammasomes au terme de la grossesse.

2) INFLAMMASOMES ET GROSSESSE PATHOLOGIQUE

Les inflammasomes font surtout l'objet d'attention dans le cadre de la pré-éclampsie. La pré-éclampsie est une pathologie grave de la grossesse et représente la deuxième cause de mortalité maternelle, après l'hémorragie post-partum. En cas de pré-éclampsie, le placenta ne s'implante pas assez profondément dans la muqueuse utérine, conduisant ainsi à un défaut de vascularisation du placenta, qu'il tente de compenser en provoquant une hypertension artérielle. Cette pathologie s'accompagne également d'une inflammation due à la libération de débris placentaires et de cellules fœtales dans le sang maternel (564,565). L'implication des inflammasomes dans cette pathologie, à l'étiologie complexe, commence à être étudiée.

Ainsi, les transcrits et protéines de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF α et HMGB1 sont plus exprimés dans des placentas pré-éclampsiques par rapport à des placentas sains (566,567). Les transcrits de NLRP3, NLRP1, TLR4, caspase-1, IL-1 β , IL-18 et TNF α sont également plus exprimés dans les monocytes de femmes pré-éclampsiques ; de même, la sécrétion de IL-1 β et TNF α par ces cellules est plus importante (568,569). De plus, les transcrits de TLR2, TLR4 et IL-1 β , et la protéine NLRP3 sont plus exprimés dans les neutrophiles de femmes souffrant de pré-éclampsie (570).

Des niveaux sanguins plus élevés d'acide urique sont observés chez les femmes pré-éclampsiques, avant les signes cliniques (571–573), et plusieurs études ont montré qu'il pourrait être impliqué dans l'étiologie de la maladie. En effet, Mulla *et al.* ont montré que, dans les trophoblastes placentaires de premier trimestre incubés avec des cristaux d'urate monosodique (MSU), la sécrétion de IL-1 β et l'activation de la caspase-1 sont plus importants par rapport à une condition sans traitement. Des expériences complémentaires réalisées sur des lignées trophoblastiques ont montré que cet effet est dépendant d'ASC (574). De plus, les monocytes prélevés chez des femmes pré-éclampsiques et traités avec le MSU voient l'expression des transcrits NLRP3, caspase-1, IL-18 et TNF α augmenter, de même que la sécrétion de IL-18 et TNF α (568). De même, les cristaux de cholestérol, dont le niveau sanguin est également plus élevé en cas de pré-éclampsie, sont impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les explants placentaires (573). Enfin, des études chez la souris ont montré que l'injection de vésicules extracellulaires, dont la quantité augmente en cas de pré-éclampsie, entraîne une accumulation de plaquettes au niveau du placenta, qui libèrent de l'ATP, ce qui active l'inflammasome NLRP3 dans les cellules trophoblastiques (575).

L'implication des inflammasomes dans d'autres pathologies de la grossesse a été suggérée suite à des analyses réalisées chez des patientes ayant subi un travail prématuré ou une pPROM, accompagné ou non d'une infection ou d'une inflammation intra-amniotique.

Lors d'un travail à terme, l'expression des transcrits et/ou protéines de plusieurs acteurs des inflammasomes (NLRP1, NLRP3, NLRC4, NOD2, caspase-1, caspase-4, IL-1 β , IL-18) est augmentée dans les membranes fœtales en cas de chorioamniotite (576), de même que le nombre de complexes ASC/caspase-1 (558). Une étude réalisée chez des patientes à terme avec une chorioamniotite a montré que la concentration d'ASC dans le liquide amniotique est augmentée si une infection ou une inflammation intra-amniotique est détectée (577). Ces données suggèrent que la réponse inflammatoire observée en cas de chorioamniotite, qu'elle soit liée à des PAMP ou des DAMP, implique les inflammasomes.

En cas de travail prématuré, la concentration de la caspase-1 dans le liquide amniotique est plus élevée si le travail s'accompagne d'une infection et/ou une inflammation intra-amniotique, par rapport à une situation de travail prématuré sans infection et/ou inflammation (560). La gasdermine D a également été détectée dans le liquide amniotique et les membranes fœtales en cas de travail prématuré, et ce, plus particulièrement s'il s'accompagne d'une inflammation stérile ou une infection intra-amniotique, suggérant que la pyroptose puisse être impliquée dans le travail et la naissance prématurés (578). La concentration de HMGB1 est plus élevée dans les membranes fœtales en cas de travail prématuré par rapport à un travail à terme (563), et, en cas d'accouchement prématuré, la concentration de HMGB1 dans le liquide amniotique est augmentée s'il y a une inflammation intra-amniotique (579). Le travail prématuré semble donc impliquer les inflammasomes, et ce, d'autant plus s'il s'accompagne d'une infection ou une inflammation intra-amniotique.

Une étude a révélé qu'en cas de pPROM, l'expression des transcrits et protéines d'acteurs reliés à la voie de signalisation des inflammasomes (NOD1 et NF- κ B) sont augmentés dans le placenta et les membranes fœtales (580). De plus, l'étude de Brickle *et al.* a montré que l'autophagie régule négativement la sécrétion de IL-1 β par les inflammasomes dans les membranes fœtales (581). Cette autophagie est justement réduite dans les membranes fœtales en cas de pPROM (581). Enfin, le séquençage réalisé à partir d'échantillons sanguins de nouveau-nés a révélé que des mutations de gènes impliqués dans la voie de signalisation des inflammasomes (NLRP10, NOD2) sont uniquement retrouvées en cas de pPROM, comparé à des grossesses normales à terme (306). Ces données tendent donc à penser qu'un lien existe entre les inflammasomes et la pPROM.

Enfin, quelques travaux ont porté sur le lien entre les inflammasomes et la fausse couche. Lu *et al.* ont montré que l'activité de la caspase-1, de IL-1 β et IL-18 est augmentée chez les femmes subissant des avortements spontanés récurrents et leur modèle murin suggère que l'inflammasome NLRP3 est impliqué (582). Une équipe italienne a également constaté une augmentation d'expression des protéines NLRP3 et ASC, de l'activité de la

caspase-1 et des niveaux de IL-1 β et IL-18 dans l'endomètre de femmes sujettes aux pertes récurrentes de grossesse, les prélèvements de l'endomètre ayant été faits pendant la fenêtre présumée de l'implantation (583). Cette même équipe a constaté une diminution de ces effets suite à un traitement de biopsies de l'endomètre avec l'acide alpha-lipoïque, molécule ayant des propriétés anti-inflammatoires (584).

La chorioamniotite, la fausse couche, le travail prématuré et la rupture prématurée des membranes fœtales semblent donc impliquer les inflammasomes, et plus particulièrement si une infection ou une inflammation est détectée. Des études *in vivo* et *in vitro* ont permis de confirmer ces hypothèses et de mieux comprendre les voies de signalisation et les acteurs engagés, notamment via l'utilisation de DAMP et PAMP.

Ainsi, Gillaux *et al.* ont montré que les cellules épithéliales amniotiques humaines expriment les transcrits des dix TLR. L'activation de certains d'entre eux (TLR5, TLR6/2 et TLR4), par des stimuli pathogéniques spécifiques, conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à l'expression de la MMP-9 et à l'apoptose, ces éléments étant tous retrouvés dans les ruptures physiologiques et pathologiques des membranes fœtales (428). Hoang *et al.* ont montré que, en fonction des TLR et NLR stimulés dans des explants de membranes fœtales, par des ligands spécifiques, un profil différent de cytokines pro-inflammatoires sécrétées est observé. De plus, la stimulation des TLR2, TLR4 et TLR5 par des ligands spécifiques induit la sécrétion de IL-1 β sous la dépendance de la caspase-1 dans ces explants (556). Une étude complémentaire a montré que la caspase-1 est requise pour la sécrétion de IL-1 β induite par le ligand LPS dans les membranes fœtales et le myomètre (557). De plus, la stimulation de cellules épithéliales et mésenchymateuses de l'amnios avec le LPS et la nigéricine conduit à la formation de specks d'ASC dans ces cellules (585). En outre, des cytotrophoblastes et cellules déciduales stromales isolés de placentas du premier trimestre répondent au LPS via l'augmentation de la transcription des gènes caspase-1, IL-1 β et NLRP3 et une sécrétion accrue de IL-1 β , suggérant une implication de l'inflammasome NLRP3 dans la défense anti-bactérienne placentaire (586). Enfin, dans des cellules mononucléaires extraites de cordons ombilicaux récoltés à terme, la co-stimulation avec le LPS et l'ATP permet la sécrétion de IL-1 β , nécessitant le récepteur P2X7R (587). Une étude complémentaire a montré que cet effet est également dépendant de la caspase-1 et qu'il pourrait impliquer NLRP3 dont l'expression augmente dans les mêmes conditions (588). Ces études *in vitro* montrent que les différents tissus présents dans la sphère placentaire peuvent répondre à des ligands pathogéniques en activant les inflammasomes, et plus particulièrement l'inflammasome NLRP3.

Quelques études complémentaires sur des modèles animaux ont été réalisées. Ainsi, dans des modèles murins d'induction d'inflammation intra-utérine par un PAMP (LPS) ou un DAMP (S100B), deux études ont démontré une activation de l'inflammasome NLRP3 dans les membranes fœtales, qui conduit à une augmentation des naissances prématurées et de la mortalité néonatale, lesquelles sont réduites par l'inhibition de cet inflammasome dans le même contexte (589,590). Une autre étude chez la souris a montré qu'une souche bactérienne de *Listeria monocytogenes* induit l'activation de la caspase-1 et la production de IL-1 β dans le placenta, sous la dépendance de l'inflammasome NLRP3, ce qui est responsable d'interruptions de grossesse (591).

L'ensemble de ces données démontre que les inflammasomes sont impliqués dans des pathologies liées à la grossesse. Ainsi, des thérapies ciblant les inflammasomes ou leur voie de signalisation se développent afin de prévenir ou traiter ces pathologies (569,584,592,593).

Non abordée dans les paragraphes précédents, l'implication de la protéine NLRP7 dans des pathologies de la grossesse est pourtant bien reconnue à ce jour. Cette protéine, faisant partie des PRR cytosoliques de type NLRP, est capable de former un inflammasome. Son rôle au niveau placentaire a particulièrement fait l'objet d'attention mais la fonction de cette protéine n'a jamais été étudiée au niveau des membranes fœtales. La protéine NLRP7 fait donc l'objet de ce travail de thèse et est décrite dans les paragraphes suivants.

III – LA PROTEINE NLRP7

1) STRUCTURE ET FONCTIONS DE NLRP7

i) GENE ET PROTEINE NLRP7

Le gène NLRP7, aussi appelé PYPAF3 ou NALP7, est présent sur le bras long du chromosome 19 humain, plus précisément au locus 19q13.42. D'après la base de données *Ensembl*, il existe neuf transcrits pour NLRP7 dont huit peuvent coder pour des protéines (allant de 53 à 1037 acides aminés), le dernier transcrit étant reconnu et dégradé par le

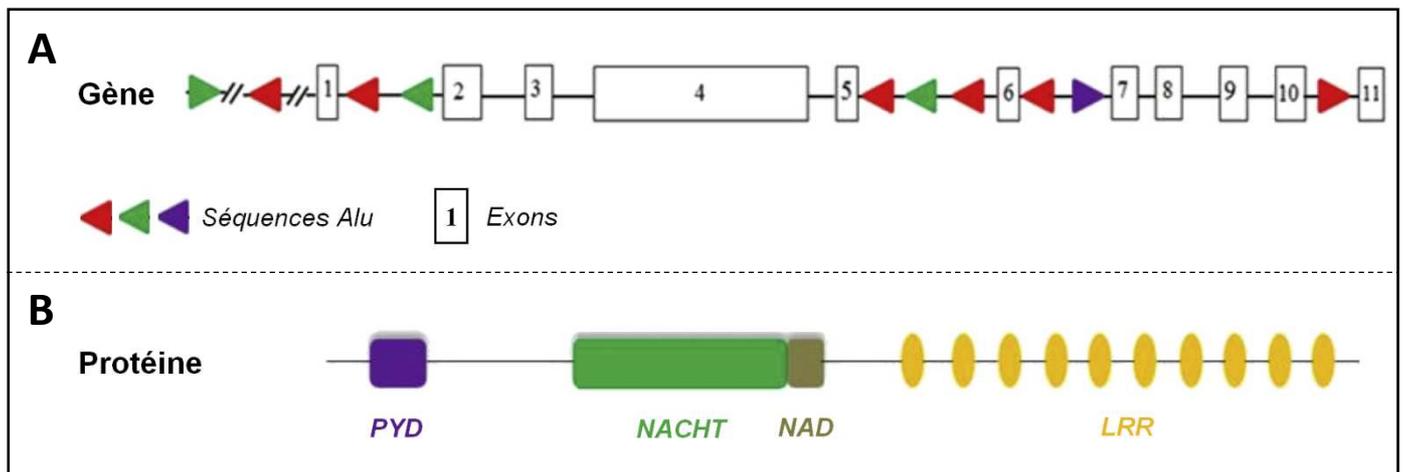


Figure 23 : Représentation schématique du gène (A) et de la protéine (B) NLRP7 chez l'Homme.

Le gène NLRP7 (A) est composé de onze exons. Des nombreuses séquences Alu sont présentes dans les régions introniques. La protéine NLRP7 (B) contient les quatre domaines retrouvés dans la plupart des protéines NLRP : PYD, NACHT, NAD et LRR.

NLRP = Nucleotide-binding and Oligomerization Domain-Like Receptor, Pyrin Domain containing protein

NACHT = acronyme des protéines NAIP, CIITA, HET-E et IP1

NAD = NACHT-Associated Domain

CARD = Caspase Recruitment Domain

PYD = Pyrin Domain

LRR = Leucine Rich Repeat

(Adapté de Moein-Vaziri et al., *Clinical and genetic-epigenetic aspects of recurrent hydatidiform mole: A review of literature*, 2018)

système de dégradation des ARN non-sens (594). La séquence du gène NLRP7 est très proche de celle du gène NLRP2. De plus, il n'y a pas d'orthologue murin du gène NLRP7 alors que le gène NLRP2 est présent chez la souris. Une étude phylogénétique, basée sur ces observations, a suggéré que le gène NLRP7 puisse venir d'une duplication d'un gène NLRP2/7 ancestral chez les primates (595). Une étude complémentaire a proposé que des duplications indépendantes aient également eu lieu chez les cochons, les bovins, les chevaux et les éléphants, menant à la présence de ces deux gènes chez ces animaux (596). Le gène NLRP7 humain contient onze exons et les régions introniques sont constituées à 48% d'éléments transposables Alu, des séquences qui rendraient le gène NLRP7 sujet à des mutations de type indel (insertion-délétion) (**Figure 23 A**) (597).

La protéine NLRP7 est un membre de la sous-famille des NLRP, faisant partie de la famille des récepteurs de type NOD (NLR). Cette protéine est retrouvée dans divers tissus tels que les testicules, les ovaires, le placenta, le thymus, la rate, les poumons, le colon, les leucocytes sanguins ou encore le foie. La protéine NLRP7 est également exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires, d'origine hématopoïétique ou non (598). NLRP7, comme la majorité des protéines NLRP, est formée de quatre domaines : PYD, NACHT, NAD et LRR (**Figure 23 B**) (440). L'épissage de l'ARN messager de NLRP7 donne lieu à différentes isoformes protéiques, qui diffèrent principalement par le nombre de Répétitions Riches en Leucines (599), mais la distinction entre ces isoformes n'est étudiée que dans très peu de travaux (600–602).

ii) ROLES DE NLRP7 DANS L'INFLAMMATION

Comme la plupart des autres NLRP, les liens entre la protéine NLRP7 et l'inflammation et/ou l'inflammasome ont fait l'objet d'attention. Cependant, les résultats obtenus sont contradictoires, si bien que le rôle anti- ou pro-inflammatoire de NLRP7 n'est, à ce jour, pas clairement défini.

Rôle anti-inflammatoire :

Dans des cellules HEK293, NLRP7 inhibe la sécrétion de IL-1 β dépendante de NLRP3 et de la caspase-1, et ce, en empêchant la maturation de la pro-caspase-1 et de la pro-IL-1 β . Les auteurs ont proposé que cette inhibition passe par une interaction physique directe de NLRP7 avec la pro-caspase-1 et la pro-IL-1 β (598). De plus, le LPS ou IL-1 β stimule l'expression du transcrit NLRP7 dans les cellules THP-1 et les cellules mononucléaires ; et l'expression stable de NLRP7 dans les cellules THP-1 empêche la sécrétion de IL-1 β induite

par le LPS. Selon les auteurs, NLRP7 jouerait donc un rôle de régulateur négatif de la sécrétion de IL-1 β (598). Dans leur étude, Messaed *et al.* ont constaté qu'une surexpression de NLRP7 diminue la synthèse de la pro-IL-1 β dans les HEK293, cet effet étant aboli par des mutations responsables de troncatures de la protéine après le domaine PYD (603). Enfin, l'effet inhibiteur d'inflammation de NLRP7 pourrait également être liée à la protéine FAF1, une protéine de régulation de NF- κ B, dont l'interaction avec NLRP7 a été démontrée et qui inhibe l'activation de NF- κ B (604). Cependant, une étude réalisée à partir d'une lignée de cellules fibroblastiques et s'intéressant aux effets de divers NLRP, dont NLRP7, sur l'activation de NF- κ B n'a pas démontré un rôle inhibiteur de NLRP7 sur l'activation de NF- κ B (605). De plus, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre NLRP7 dans des macrophages humains ne modifie pas l'activation de NF- κ B induite par des cytokines et le LPS (453).

Ainsi, ces études ont mis en évidence un rôle négatif de NLRP7 dans l'inflammation dont les mécanismes pourraient être (i) l'interaction avec des composants de l'inflammasome entraînant leur inhibition ou (ii) l'altération de la transcription de la pro-IL-1 β .

Rôle pro-inflammatoire :

D'autres études ont, au contraire, démontré un rôle pro-inflammatoire de NLRP7. L'équipe de R. Slim s'est intéressée aux conséquences fonctionnelles de quelques mutations, touchant les trois domaines de NLRP7, retrouvées chez des femmes avec des môles hydatiformes récurrentes, une pathologie de la grossesse détaillée par la suite. Les cellules mononucléaires prélevées chez ces patientes montrent une diminution de la libération dans le milieu des cytokines IL-1 β et TNF α en réponse au LPS, mais la maturation intracellulaire de la pro-IL1 β en IL-1 β n'est pas affectée (sauf pour une patiente), ce qui suggère que NLRP7 joue un rôle dans la libération, et non la production, de cytokines (603).

Le travail de Khare *et al.* a constitué une avancée majeure dans le décryptage du rôle pro-inflammatoire de NLRP7. Il a en effet permis d'identifier NLRP7 comme le senseur intracellulaire des lipoprotéines acylées bactériennes, requis pour la sécrétion de IL-1 β dans des macrophages primaires et la lignée monocyttaire THP-1. Les auteurs ont montré que, en réponse à une lipoprotéine acylée bactérienne, le récepteur TLR2 induit l'activation de NF- κ B, lequel permet alors la transcription de la pro-IL-1 β . NLRP7, quant à lui, est nécessaire pour l'activation de la caspase-1 et la maturation des pro-IL-1 β et pro-IL-18. La protéine NLRP7 interagit avec ASC qui recrute la pro-caspase-1 pour former un inflammasome capable d'activer la caspase-1. Les auteurs ont également constaté que NLRP7 joue un rôle important dans la restriction de la croissance intracellulaire de bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, dans les macrophages (453).

Par la suite, d'autres travaux ont été consacrés à une meilleure description de l'inflammasome NLRP7. D'un point de vue structurel, Singer *et al.* ont montré que, après activation de la protéine NLRP7, le domaine NAD et une petite partie du domaine LRR d'une protéine NLRP7 sortent de la « poche » formée par le domaine LRR et interagissent avec le domaine NACHT d'une autre protéine NLRP7 pour former un oligomère (440). Puis, Radian *et al.* ont démontré que le motif Walker A, présent dans le domaine NACHT de NLRP7, fixe et hydrolyse l'ATP, ce qui est nécessaire pour l'oligomérisation des protéines NLRP7, la formation de l'inflammasome et son activité (438). D'un point de vue fonctionnel, une équipe chinoise a montré que l'inflammasome NLRP7 est impliqué dans l'activation de la caspase-1 et la sécrétion de IL-1 β suite à l'infection de cellules THP-1 par *Mycobacterium bovis*. L'activation de l'inflammasome NLRP7 induit de la mort cellulaire, qui est suggérée être de la pyroptose par les auteurs, ainsi que l'expression des transcrits de TNF α , la chimiokine CCL3 et IL-1 β (606). Une autre équipe s'est intéressée aux modifications post-traductionnelles régulant NLRP7. En effet, la protéine NLRP7 est ubiquitinée de façon constitutive et recrutée à l'endolysosome pour y être dégradée. Lors d'une stimulation par un ligand pro-inflammatoire, l'enzyme STAMBP désubiquitine NLRP7 ce qui empêche sa dégradation, la quantité de NLRP7 augmente dans le cytosol, elle forme l'inflammasome et active IL-1 β (607). Enfin, Abi Nahed *et al.* ont récemment démontré que l'activation de l'inflammasome NLRP7 dans une lignée de cellules trophoblastiques induit la sécrétion de IL-1 β mais pas de IL-18 (608).

L'ensemble de ces travaux suggère donc un rôle pro-inflammatoire de NLRP7 qui s'effectuerait par (i) son implication dans la sécrétion de cytokines, ou (ii) par la formation d'un inflammasome.

ii) AUTRES FONCTIONS DE NLRP7

En plus de son implication dans les phénomènes inflammatoires, plusieurs travaux ont mis en évidence d'autres fonctions de la protéine NLRP7.

Ainsi, une étude a récemment montré que la protéine NLRP7 est impliquée dans la décidualisation de l'endomètre. En effet, la protéine NLRP7 est plus exprimée dans l'endomètre prélevé chez des femmes au premier trimestre de grossesse par rapport à des femmes non-enceintes. Un modèle *in vitro* de décidualisation a démontré que ce processus dépend de la protéine NLRP7, qui est transloquée au noyau, et qui favorise l'activité du récepteur à la progestérone, hormone essentielle pour la décidualisation de l'endomètre. Les auteurs ont supposé que NLRP7 puisse agir comme un co-facteur de transcription du récepteur à la progestérone (602).

De plus, les transcrits de NLRP7 sont surexprimés dans les cellules cancéreuses de séminomes testiculaires, un cancer qui touche les cellules germinales du testicule. L'extinction de l'expression de NLRP7 par le système d'ARN interférent dans des cellules Tera-1 (isolées d'un carcinome testiculaire) inhibe la prolifération des cellules, suggérant que cette protéine est impliquée dans la prolifération excessive des cellules germinales testiculaires (600). La protéine NLRP7 est également exprimée dans des carcinomes de l'endomètre et la présence de cette protéine est corrélée à une invasion plus importante de la tumeur dans le myomètre, tissu sous-jacent à l'endomètre. Même si ce n'est pas statistiquement significatif, la présence de NLRP7 tend à influencer négativement le taux de survie et la période sans rechute des patientes (609). Ces deux articles suggèrent donc que NLRP7 puisse jouer un rôle dans la prolifération cellulaire.

2) NLRP7 ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

L'implication de NLRP7 dans des pathologies de la grossesse a permis de constater l'importance de cette protéine, surtout dans les premiers stades de développement embryonnaire.

Tout d'abord, l'expression de NLRP7 au cours de la phase pré-implantatoire du développement a été mise en évidence. L'équipe de R. Slim a constaté que les transcrits de NLRP7 sont exprimés dans l'ovocyte non fécondé, dans l'ovocyte fécondé et dans les embryons au cours des premières étapes de division cellulaire (610). Ces données ont été confirmées par une équipe suédoise qui a aussi montré que la quantité de transcrits NLRP7 diminue progressivement au cours de la maturation de l'ovocyte et qu'elle atteint son niveau le plus bas, trois jours après la fécondation. La quantité de transcrits augmente ensuite rapidement entre le troisième et le cinquième jour après la fécondation, ce qui correspond au stade blastocyste et à l'activation de la transcription du génome fœtal (611). Au niveau protéique, dans l'ovaire humain, NLRP7 a été détectée dans les ovocytes des follicules à tous les stades de croissance (601). Des analyses immunohistochimiques ont révélé que la protéine NLRP7 co-localise avec la protéine KHDC3L au cytosquelette dans des ovocytes humains, et plus particulièrement dans la région corticale. Au stade blastocyste, la distribution de ces deux protéines change ; NLRP7 est située dans le cytoplasme alors que KHDC3L se place dans le noyau des cellules (612). KHDC3L, aussi appelée C6orf221, est une protéine capable de lier l'ARN et qui fait partie du Complexe Maternel Subcortical (SCMC). Il s'agit d'un complexe uniquement retrouvé dans les ovocytes et les embryons pré-implantatoires, nécessaire aux premiers stades de développement embryonnaire car il serait impliqué dans la dynamique des filaments d'actine, la distribution des organites, l'activation du génome

embryonnaire, le positionnement des transcrits maternels et leur dégradation pendant la transition ovocyte-embryon (613). D'autres interactions physiques et co-localisations entre NLRP7 et des protéines (le répresseur transcriptionnel ZBTB16, l'enzyme PADI6) ont été mises en évidence dans l'ovaire ou l'ovocyte, mais le rôle de ces interactions reste indéterminé (614,615). La présence de NLRP7 dans les premiers stades de développement suggère donc que cette protéine y joue un rôle important, ce qui sera discuté par la suite.

Un rôle de NLRP7 dans la phase post-implantatoire a aussi été proposé. En effet, *Abi Nahed et al.* ont montré que NLRP7 est exprimé dans le placenta, principalement pendant la période hypoxique, et que l'hypoxie augmente l'expression de NLRP7 dans les trophoblastes primaires. De même, NLRP7 augmente la prolifération d'une lignée de trophoblastes et contrôle négativement la syncytialisation et l'invasion des trophoblastes (608). De plus, dans des cellules souches embryonnaires, une réduction d'expression de NLRP7 accélère la différenciation de ces cellules en trophoblastes (616). La protéine NLRP7 serait donc impliquée dans la régulation de la prolifération et la différenciation des trophoblastes.

Les gènes NLRP7 et KHDC3L ont été reliés à une pathologie rare de la grossesse : la môle hydatiforme récurrente (familiale et sporadique). La môle hydatiforme est une grossesse anormale caractérisée par une prolifération trophoblastique excessive sans développement embryonnaire. Une môle hydatiforme est dite récurrente si elle a lieu au moins deux fois chez la même patiente. Plusieurs causes ont été identifiées dont des mutations touchant l'ADN de l'ovocyte. Ces mutations apparaissent *de novo* ou sont héritées ce qui peut conduire à des môles hydatiformes récurrentes sporadiques ou familiales, respectivement. Ainsi, de nombreuses mutations de NLRP7 et/ou KHDC3L ont été identifiées chez des femmes souffrant de ces pathologies (601,610,617–624). Ces mutations peuvent être des insertions, des délétions, la création de codons stop ou des changements de bases ponctuels. Etant donné que les fonctions de NLRP7 ne sont pas encore clairement définies, il est difficile de comprendre les conséquences fonctionnelles de ces mutations. Certains auteurs ont suggéré que des défauts de sécrétion de IL-1 β , nécessaire pour l'implantation de l'embryon dans l'utérus, puissent intervenir dans l'apparition de môles hydatiformes (610).

Des analyses épigénétiques ont cependant permis d'émettre une autre hypothèse. En effet, des môles hydatiformes portant des mutations de NLRP7 ou KHDC3L ont montré des profils de méthylation ADN anormaux au niveau des Régions Différentiellement Méthylées (DMR) des gènes soumis à empreinte maternelle, conduisant à des défauts d'expression de ces gènes (625–629). Ces données suggèrent que NLRP7 et/ou KHDC3L puisse(nt) intervenir dans le maintien ou l'établissement de la méthylation de l'ADN. *Mahadevan et al.* ont en effet

montré que, dans des cellules souches embryonnaires, l'extinction de l'expression de NLRP7 altère le profil de méthylation des îlots CpG (principalement par des hyperméthylations), mais pas seulement aux DMR (616). Enfin, ni NLRP7 ni KHDC3L ne possède de domaine de liaison à l'ADN, mais Mahadevan *et al.* ont aussi montré que la protéine NLRP7 interagit avec YY1 (616), une protéine capable de se lier à la chromatine et de la modifier, suggérant que NLRP7 puisse agir comme un co-facteur et se lier à des protéines impliquées dans les modifications épigénétiques.

En plus des môles hydatiformes, la protéine NLRP7 a été reliée à d'autres pathologies de la grossesse. En effet, des placentas récoltés en cas de retard de croissance intra-utérin montrent une expression plus importante des acteurs moléculaires de l'inflammasome NLRP7 (*i. e.* NLRP7, ASC et IL-1 β) et le niveau de IL-1 β circulant est augmenté chez les patientes, alors que celui de IL-18 est diminué, par rapport à un groupe contrôle (608). Des mutations de NLRP7 ont aussi été associées à un risque de fausse couche et d'accouchement d'un enfant mort-né (610,630–632).



Cette seconde partie a permis de comprendre l'un des mécanismes mis en jeu au cours des processus inflammatoires impliqués dans la fragilisation et la rupture des membranes fœtales, à savoir l'inflammasome. Bien que de plus en plus étudiés au sein de ces tissus, dans les contextes physiologique et pathologique, il en est un qui n'a pas encore été décrit : l'inflammasome NLRP7. Ce travail de thèse a donc consisté à étudier le rôle de l'inflammasome NLRP7 dans la rupture des membranes fœtales.

OBJECTIFS DE THESE

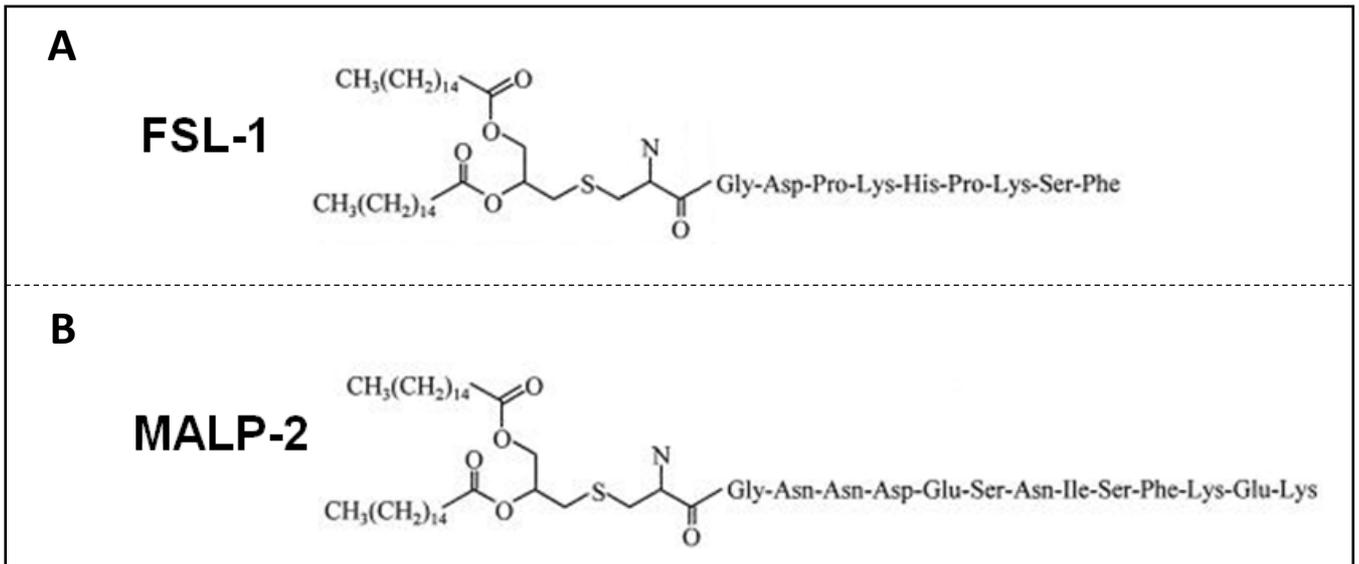


Figure 24 : Structure des lipopeptides FSL-1 (A) et MALP-2 (B).

FSL-1 et MALP-2 sont des lipopeptide diacylés synthétiques dérivés de lipoprotéines de *Mycoplasma salivarium* et *Mycoplasma fermentans*, respectivement.

FSL-1 = Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1

MALP-2 = Macrophage-Activating Lipopeptide-2kD

(Adapté de Okusawa *et al.*, *Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasma Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6*, 2004)

L'ensemble des données présentées jusqu'à présent mettent en lumière le rôle central de l'inflammation des membranes fœtales dans le processus de parturition. L'inflammation participe en effet à la maturation des membranes fœtales en fin de grossesse ce qui permet d'une part la propagation de signaux impliqués dans la mise en place du travail, et d'autre part, la rupture des membranes fœtales, étape nécessaire pour la naissance du bébé.

Certains processus inflammatoires peuvent faire intervenir un type d'inflammasomes formés de protéines NLRP, dont la protéine NLRP7 fait partie. Plusieurs travaux ont montré que cette protéine, associée à l'adaptateur ASC et la caspase-1, est capable de former un inflammasome actif dans divers types cellulaires. La fonction de la protéine NLRP7 a déjà fait l'objet d'études au sein du placenta mais n'a jamais été explorée au niveau des membranes fœtales. Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la fonction pro-inflammatoire de l'inflammasome NLRP7 au sein des membranes fœtales humaines.

Après avoir démontré la présence des trois acteurs de l'inflammasome NLRP7 dans l'amnios et le chorion, des analyses ont été menées au niveau cellulaire. Pour cela, des cellules épithéliales amniotiques primaires, prélevées à partir de membranes fœtales de femmes ayant accouché à terme, ont été utilisées comme modèle d'étude. De plus, selon la littérature, un seul ligand est connu et a déjà été utilisé pour activer spécifiquement l'inflammasome NLRP7 : il s'agit du Lipopeptide de Stimulation des Fibroblastes (FSL-1) (453).

Le FSL-1 est un lipopeptide synthétique dérivé d'une lipoprotéine de *Mycoplasma salivarium*. Il représente la partie N-terminale de la lipoprotéine LP-44 de ce mycoplasme (633). Le FSL-1 est un lipopeptide diacylé, *i. e.* un peptide portant deux chaînes d'acides gras (**Figure 24 A**). Il ressemble fortement à un autre lipopeptide, MALP-2, dérivé d'une lipoprotéine de *Mycoplasma fermentans* (634). En effet, la structure lipidique est la même mais la séquence et la longueur du peptide diffèrent (**Figure 24 B**). Tous deux sont reconnus par l'hétéro-récepteur TLR2/TLR6 (635,636). L'équipe de M. Lappas a utilisé le FSL-1 dans de nombreux travaux sur les membranes fœtales, les cellules de l'amnios et les cellules du myomètre (179,187–190,195,637–641). Ceci a permis d'affiner la voie de signalisation induite par ce ligand ; l'équipe a notamment mis en évidence une induction de la synthèse de facteurs impliqués dans l'inflammation. L'inflammasome NLRP7, pourtant spécifiquement activé par ce ligand, n'a jamais été étudié dans ce contexte.

Ainsi, ce travail de thèse a eu plusieurs objectifs : (i) déterminer si les cellules épithéliales amniotiques sont capables de former un inflammasome NLRP7 d'un point de vue mécanistique, (ii) étudier la voie de signalisation dépendante de l'inflammasome NLRP7 induite par le ligand FSL-1 et (iii) développer des outils et des techniques permettant l'analyse des inflammasomes par l'équipe.

RESULTATS

ARTICLE

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication en cours de préparation. La version la plus récente de cet article est présentée ci-après.

Human Amnion Epithelial Cells (AEC) respond to the *Mycoplasma salivarium*-derived ligand FSL-1 by engaging the NLRP7 inflammasome

Marilyne LAVERGNE¹, Corinne BELVILLE¹, Héléna CHOLTUS¹, Christelle GROSS¹, Régine MINET-QUINARD^{1,3}, Denis GALLOT^{1,2}, Vincent SAPIN^{1,3}, Loïc BLANCHON¹.

¹ Genetic Reproduction and Development Laboratory (GReD), Clermont-Auvergne University, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, Translational Approach to Epithelial Injury and Repair Team, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

² CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

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

1 **Human Amnion Epithelial Cells (AEC) respond to the**
2 ***Mycoplasma salivarium*-derived ligand FSL-1**
3 **by engaging the NLRP7 inflammasome**

4
5
6 **Marilyne LAVERGNE**^{1*}, Corinne BELVILLE¹, H el ena CHOLTUS¹, Christelle
7 GROSS¹, R egine MINET-QUINARD^{1,3}, Denis GALLOT^{1,2}, Vincent SAPIN^{1,3}, Lo ic
8 BLANCHON^{1†}.

9
10 ¹ Genetic Reproduction and Development Laboratory (GReD), Clermont-Auvergne University,
11 CNRS UMR 6293, INSERM U1103, Translational Approach to Epithelial Injury and Repair
12 Team, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

13 ² CHU Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, F-63000 Clermont-Ferrand,
14 France.

15 ³ CHU Clermont-Ferrand, Medical Biochemistry and Molecular Biology Department, F-63000
16 Clermont-Ferrand, France.

17
18 ***ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4101-8675>

19
20 **†Correspondence:** Lo ic BLANCHON, Centre de Recherche Bioclinique, 28 place
21 Henri DUNANT, 63000 Clermont-Ferrand (FRANCE) ; Tel : +33 4 73 17 81 74 ;
22 loic.blanchon@uca.fr

23
24 **Financial disclosures:** none reported

25

26

27 **ABSTRACT**

28 **Context and Objectives:** Inflammation is the leading mechanism involved in both
29 physiological and pathological rupture of fetal membranes. We aimed to better characterize
30 the inflammasomes-dependent inflammation processes in these tissues, focusing more
31 especially on Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor, Pyrin
32 domain containing 7 protein (NLRP7) inflammasome.

33 **Methods:** The presence of NLRP7 inflammasome actors (NLRP7, Apoptosis-associated
34 Speck-like protein containing a CARD domain (ASC) and Caspase-1) was first attested by RT-
35 PCR in human amnion and chorion, at the three trimesters and at term. Their protein
36 concentration was then determined by ELISA assays in term tissues with or without labor.
37 Human Amnion Epithelial Cells (AEC) were treated during 4 or 20 h with Fibroblast-Stimulating
38 Lipopeptide 1 (FSL-1), a *Mycoplasma salivarium*-derived ligand. Transcripts and proteins
39 quantities were measured by RT-qPCR and Western Blot assays, respectively. NLRP7 and
40 ASC co-localisation was attested by immunocytochemistry. Western Blot assays allowed
41 analyzing the pro-caspase-1 and gasdermine D cleavages. Small silencing RNAs targeting
42 NLRP7 (siNLRP7) were used to confirm or not the involvement of NLRP7 in transcription of
43 the studied molecular actors. Finally, the presence of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma*
44 *fermentans* in human fetal membranes was investigated using RT-PCR.

45 **Results:** NLRP7, ASC and Caspase-1 transcripts were expressed in both sheets of human
46 fetal membranes during all pregnancy stages, and only ASC protein expression was increased
47 with labor. NLRP7 and Caspase-1 transcripts, as well as NLRP7, ASC and pro-caspase-1
48 protein levels were increased in FSL-1-treated AEC. NLRP7 inflammasome assembled around
49 the nucleus, and pro-caspase-1 and Gasdermin D were cleaved into their mature forms after
50 FSL-1 stimulation. Interleukin (IL)-1 β transcripts, but not IL-18, were increased with FSL-1 in
51 AEC. The increased expression of NLRP7, Caspase-1 and IL-1 β transcripts observed in FSL-
52 1-treated AEC is independent of NLRP7 protein and NLRP7 inflammasome, as verified using
53 siNLRP7. Finally, *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* were detected for the
54 first time in human fetal membranes.

55 **Conclusion:** Two new mycoplasma has been identified in human fetal membranes,
56 *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*, and they could induce NLRP7
57 inflammasome-mediated inflammation.

58

59

60 **INTRODUCTION**

61 Human fetal membranes, delineating amniotic cavity during pregnancy, are composed of two
62 sheets: amnion, in contact with amniotic fluid, and chorion, lining the decidua (1). They
63 normally weaken during the last weeks of pregnancy, leading to their physiological rupture at
64 term (2). This weakening occurs in a specific area overlying the cervix called the “Zone of
65 Altered Morphology” (ZAM) by opposition to the “Zone of Intact Morphology” (ZIM) (3). Lot of
66 studies have been conducted in order to decipher the phenomena induced in weakening of
67 fetal membranes, whether the ZAM area was distinguished or not in these works. Among the
68 phenomena, apoptosis (4–6), extra-cellular matrix remodeling (7–9), oxidative stress (10,11),
69 senescence (12–15), epithelial to mesenchymal transition (16) and inflammation (17–20) have
70 been described.

71 Inflammation is of primary importance not only for fetal membranes weakening but also for
72 induction and propagation of pro-labor signals. Indeed, Menon laboratory proposed a model in
73 which oxidative stress (found at increased levels in amniotic fluid at term) induces global
74 senescence of amnion epithelial cells. These cells secrete specific molecules by acquiring a
75 Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) that promote inflammation. Tissue
76 injury, caused by senescence and inflammation, leads to release of Damage-Associated
77 Molecular Patterns (DAMPs) or alarmins. SASP and DAMPs contribute to the overall
78 inflammatory load in fetal membranes, which propagates to adjacent tissues (chorion, decidua,
79 myometrium and cervix) in order to trigger labor (21–24).

80 This model describe a type of inflammation called “sterile inflammation”, *i. e.* an inflammation
81 not induced by a pathogen but by endogenous molecules released by dead cells like High-
82 Mobility Group Box 1 (HMGB1) protein, cell-free DNA and RNA, IL-33, Heat Shock Protein
83 (HSP) 70 and uric acid (25–27). Sterile inflammation is known to occur in several diseases like
84 atherosclerosis (28), gout (29) and ischemia-reperfusion injury (30), but also in physiological
85 contexts like fetal membranes rupture and parturition as presented above.

86 Inflammasomes are one of molecular actors involved in sterile inflammation. Inflammasomes
87 are cytoplasmic multiprotein platforms composed of (i) a receptor or sensor molecule, (ii) the
88 adaptor protein Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain (ASC)
89 and (iii) the pro-caspase-1 (31–35). Thus, sterile pro-inflammatory ligands lead to the activation
90 and assembly of inflammasomes in a complex called a “speck” inducing the autocatalytic
91 cleavage of pro-caspase 1 into its active form (36). Caspase-1 cleaves thereafter the pro-
92 interleukins IL-1 β and IL-18 into their bioactive forms (37), and the Gasdermin D proteins
93 whose N-terminal fragments form pores in plasma membrane associated with pyroptotic cell

94 death as a consequence (38,39). The goal of this process is the propagation of inflammatory
95 signals in order to recruit immune cells. According to the type and origin of the pro-inflammatory
96 ligands, different type of sensor molecules are recruited. Our work is focused on one kind of
97 sensor: the Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor, Pyrin
98 domain containing (NLRP) proteins.

99 The importance of inflammasomes in both normal and pathological deliveries started to be
100 demonstrated. For example, in women who underwent spontaneous labor at term, compared
101 to those who delivered without labor, concentrations of ASC and Gasdermin D were greater in
102 amniotic fluid (40,41) and the amount of ASC/Caspase-1 protein complexes increased in fetal
103 membranes (42). Moreover, HMGB1-treated fetal membranes exhibited increased expression
104 of inflammasome-related transcripts (43). These results underlined the inflammasomes-
105 dependent preparation of fetal membranes for rupture. Regarding pathological side of fetal
106 membranes rupture, mice studies demonstrated an NLRP3 inflammasome activation in fetal
107 membranes after a treatment with S100B (44) or Lipopolysaccharide (LPS) (45), correlated
108 with an increased rate of preterm births. Such consequence decreased by the use of an NLRP3
109 inhibitor. In women, chorioamnionitis has been associated with an upregulation of
110 inflammasomes components and LPS-treated human amnion cells were able to form ASC
111 specks/filaments (40) (46). Moreover, a link between NLRP3 inflammasome and preeclampsia
112 have been proposed by several groups (47–51).

113 NLRP7 is a member of NLRP sub-family especially known for its implication in recurrent
114 hydatidiform moles when is mutated (52–54). Furthermore, several studies demonstrated a
115 role of NLRP7 in different mechanisms related to pregnancy as *in vitro* decidualization of
116 endometrial stromal cells (55), trophoblast lineage differentiation (56) and trophoblast
117 proliferation, migration and invasion (57). Some studies demonstrated an NLRP7
118 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to a mycoplasma infection or synthetic
119 diacylated lipopeptides, suggesting NLRP7 inflammasomes are activated by mycoplasma.

120 Nevertheless, NLRP7 inflammasome has not yet been studied in human fetal membranes.
121 Thus, we first characterized the expression profile of NLRP7 inflammasome actors in human
122 amnion and chorion at term in samples collected from women who underwent elective
123 cesarean or who delivered vaginally, and in ZAM and ZIM areas. Then, we focused our interest
124 on the mobilization and activation of NLRP7 protein in response to the pro-inflammatory ligand
125 Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1 (FSL-1) – known to specifically activate NLRP7
126 inflammasomes (58) – in human amnion epithelial cells.

127

128 **MATERIALS AND METHODS**

129 **Fetal membranes collection**

130 The Institutional Regional Ethics Committee approved this study and the research protocol.
131 Healthy fetal membranes were collected after informed consent of patients, in the “Centre
132 Hospitalier Universitaire Estaing” (Clermont-Ferrand, France). The selected fetal membranes
133 were collected from singleton pregnant women without underlying diseases and without
134 chorioamnionitis.

135 We collected fetal membranes from the first, second and third trimester. First-trimester fetal
136 membranes (n = 3 patients) were obtained and isolated by aspiration after voluntary
137 termination of pregnancy. Second-trimester fetal membranes were harvested after medical
138 termination of pregnancy (n = 4 patients). Eligible cases corresponded to lethal fetal anomalies
139 without impact on fetal membranes (e.g., severe cardiac anomalies or brain damages). Third-
140 trimester fetal membranes (n = 4 patients) were collected from pregnancies after cesarean
141 births. For second- and third-trimester samples, amnion was dissociated from choriodecidua.
142 This was not possible for the first-trimester samples because these two sheets are not
143 distinguishable yet. Term fetal membranes were also collected from women i) after
144 spontaneous labor and vaginal deliveries (n = 6 patients) and ii) after scheduled cesarean
145 deliveries prior labor (n = 7 patients). Moreover, we collected term fetal membranes (n = 5
146 patients) from women after scheduled cesarean deliveries and prior labor, where a thread,
147 sewn on the fetal membranes in front of the cervix, distinguished the Zone of Altered
148 Morphology (ZAM ; with the thread) and the Zone of Intact Morphology (ZIM ; away from the
149 thread). Amnion was also dissociated from choriodecidua leading thereby to the harvest of four
150 kinds of samples: amnion ZAM, amnion ZIM, choriodecidua ZAM and choriodecidua ZIM.

151 All the samples were washed four times in 1X Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS,
152 Gibco, 141901169), and remaining blood vessels were removed manually. Explants of amnion
153 and choriodecidua (1cm²) were cut and immediately stored at -80°C.

154

155 **Human primary Amnion Epithelial Cells (AEC) culture**

156 Delivery products from non-pathological post-cesarean full-term births (37-39 weeks of
157 gestation) were collected at “Centre Hospitalier Universitaire Estaing” (Clermont-Ferrand,
158 France) and the AEC were prepared as previously published (59). Briefly, the amnion was
159 separated from choriodecidua by peeling and washed four times in 1X DPBS baths. The
160 remaining blood vessels were removed manually. The isolation of human primary Amnion

161 Epithelial Cells (AEC) was conducted in three trypsinization steps (10, 20, and 30min ; Trypsin-
162 EDTA 0.25%, Gibco, 11560626) at 37°C, followed by the scraping of the amnion. Cells were
163 filtered to remove the collagen, centrifuged for 5min at 1000rpm and grown on T75 flasks
164 coated with collagen I (StemCell™ Biotechnologies, 04902). AEC were cultivated under
165 standard conditions (5% CO₂, 95% humidified air, 37°C) in complete medium: Dulbecco's
166 Modified Eagle Medium F-12 nutrient mixture (DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement, Gibco,
167 31331028) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio, CVFSVF00-01), 100 µg/mL
168 streptomycin, 100 IU/mL penicillin and 250 mg/mL amphotericin B (GE Healthcare, Hyclone™,
169 SV30079.01). The absence of mesenchymal cells was checked using vimentin immuno-
170 labeling (data not shown). For all experiments, amniocytes were used after one passage.

171

172 **siRNA transfection and FSL-1 treatment**

173 Primary amnion cells at approximately 70% confluence were transfected using
174 Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen, 13778-150) and OptiMEM™ Reduced serum
175 medium (ThermoFisher Scientific, 31985-062) according to manufacturer's guidelines (Life
176 Technologies). NLRP7 siRNA (siNLRP7, ON-TARGETplus Human NLRP7 siRNA
177 SMARTpool, L-016890-01-0010) and control siRNA (siSCRAMBLE, siGENOME Non-
178 targeting siRNA Pool, D-001206-14-20) were obtained from Dharmacon™. Cells were
179 transfected with 100nM siNLRP7 or 100nM siSCRAMBLE in complete medium for 24H at
180 37°C.

181 The medium was then replaced with complete medium containing 250ng/mL Fibroblast-
182 Stimulating Lipopeptide 1 (FSL-1 ; Invivogen, tlr1-fsl) and the cells were incubated at 37°C for
183 4H or 20H depending on the experiment. Finally, cells were harvested after trypsinization and
184 used for different experiments described in this section. The corresponding data are presented
185 as fold change relative to the untreated or to the FSL-1-stimulated siSCRAMBLE transfected
186 cells, which were set at 1.

187

188 **RNA extraction and Reverse Transcriptase-(quantitative)PCR**

189 Total RNA was extracted from fetal membranes explants or primary amnion cells using
190 RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 74106) or RNAzol® RT reagent (Molecular Research Center, RN
191 190), respectively. RNA concentration was determined by spectrophotometry at 260nm with
192 the Denovix DS-11 FX spectrophotometer.

193 cDNA was synthesized from 1µg RNA using oligo-(dT)₁₅ Primers (Promega, C1101), 10mM
194 dNTP (Invitrogen, 10297-018), SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18090050)
195 and rRNasin® RNase Inhibitor (Promega, N2515) according to the manufacturer protocol.

196 The primer sequences used for classic or quantitative RT-PCR are detailed in Table 1.

197 For classic PCR, recombinant Taq Polymerase (Invitrogen, 10342-020) and 5mM dNTP
198 (Invitrogen, 10297-018) were used. Negative control were done without cDNA.

199 Quantitative PCR reactions were performed using LightCycler® 480 SYBR Green I Master
200 (Roche, 04887352001) in duplicate, according to MIQE guidelines (60). Quantification of
201 housekeeping gene Ribosomal Protein Lateral stalk subunit P0 (*RPLP0*) transcripts was
202 performed for all samples as an internal control of the amount and quality of cDNA. Standard
203 curves were used to quantify the amount of amplified transcripts. The results are given as the
204 ratio between the amount of each transcript of interest and RPLP0 transcript (consistently
205 expressed over the pregnancy).

206

207 **Protein extraction and quantification**

208 Fetal membranes tissues or primary amnion cells were lysed with respectively 500µL or 250µL
209 RIPA buffer (20mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium Deoxycholate,
210 1mM EDTA, 0.1% SDS), supplemented with 10% Protease inhibitor cocktail (Roche,
211 04693159001). For tissues, a preliminary disruption step was performed using ceramic beads
212 (Precellys, KT03961-1-009.2) and a tissue lyser (Qiagen) (three lysing steps during 25sec with
213 a 30Hz oscillation frequency, separated by two break steps during 30sec). Samples were then
214 vortex-mixed for 5sec and kept on ice for 10min, three times. After centrifugation (5min,
215 8000rpm), supernatants were collected. The Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher
216 Scientific, 23225) was used to measure the protein concentration according to manufacturer's
217 guidelines.

218

219 **Immunofluorescence assays and analysis**

220 Primary amniocytes were grown on collagen I-coated coverslips in 6-well plates and
221 subsequently washed with 1X DPBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy
222 Sciences, 15710) and kept overnight at -80°C. Cells were then permeabilised and blocked with
223 a solution composed of 1X DPBS, 4% Bovine Serum Albumin (PAA Laboratories, K41-012)
224 and 0.1% Triton during 1H. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies

225 diluted in blocking solution as indicated in Table 2. After three washing steps with the blocking
226 solution (10min, three times), cells were incubated with a 1:1000 dilution of Donkey Alexa488-
227 anti-Rabbit IgG (ThermoFisher Scientific, A21206) or Donkey Cy3-anti-Mouse IgG (Jackson
228 Immunoresearch, 715-165-150) antibodies for 2H at room temperature. Then, cells were
229 washed again as described, rinsed with 1X DPBS and incubated with a 1:10000 dilution of
230 Hoechst/BisBenzimide H 33258 (Sigma-Aldrich, B2883-25MG) for 20min at room temperature.
231 Finally, cells were washed twice with 1X DPBS and slides were prepared using a mounting
232 medium (Citifluor, Tris-MWL 4-88).

233 The LSM 800 microscope with Airyscan (ZEISS) was used to observe the slides. Images were
234 analyzed with ImageJ software (Fiji).

235

236 **Western Blotting**

237 Forty micrograms of proteins were separated onto 4-15% gradient or 7.5% polyacrylamide gels
238 (Bio-Rad, 4568084 and 456-8024, respectively) and transferred to nitrocellulose membranes
239 (Bio-Rad, 1704271) using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). After
240 incubation with 5% milk in 1X Tris-Buffered Saline (TBS) buffer (blocking buffer) for 2H,
241 membranes were incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer supplemented
242 with 0.05% Tween-20 (Table 2), overnight at 4°C. Membranes were washed three times for
243 10min with 1X TBS-0.1% Tween-20 (TBST) and incubated with a 1:5000 dilution of
244 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG antibodies (Abliance, BI
245 2413C and BI 2407, respectively) for 2H. Blots were washed with TBST three times for 10min,
246 rinsed with 1X TBS and developed with the Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates
247 (Bio-Rad, 1705062) according to the manufacturer's protocols. The All Blue Standard (Bio-
248 Rad, 161-0373) was used as a protein ladder. Images were analyzed with the Image Lab™
249 software (Bio-Rad).

250

251 ***Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* detection**

252 Genomic DNA was extracted from samples of amnion and chorion collected from women who
253 delivered vaginally (n = 7 patients) or by cesarean section (n = 7 patients) with QIAmp DNA
254 Mini Kit (Qiagen, 51306). Primers specific to *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma*
255 *fermentans* were used to amplify DNA and detect these species (**Table 3**). PCR was done with
256 Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0491S) using 10ng of gDNA and
257 positive control were done using commercially gDNA from both mycoplasma (Minerva Biolabs,

258 52-0117 and 52-0103) according to manufacturer's instructions. DNA amplification was
259 visualized on 2% gels agarose stained with ethidium bromide.

260

261 **Statistical analysis**

262 All data were analyzed using the GraphPad Prism Program version 5.02. Non-parametric
263 Mann-Whitney test was used to compare two independent groups. When more than two
264 groups were compared, the parametric Kruskal–Wallis test was applied, followed by multiple
265 comparison with Dunn's correction. In all cases, a p-value <0.05 was considered statistically
266 significant.

267

268 **RESULTS**

269 ***Transcripts of NLRP7 inflammasomes actors are present in human fetal*** 270 ***membranes.***

271 As NLRP7 inflammasomes have never been characterized in human fetal membranes, we first
272 controlled by RT-PCR the presence of NLRP7 inflammasomes actors, *i. e.* NLRP7, ASC and
273 Caspase-1, in fetal membranes collected from the first, second and third trimester and from
274 women who underwent elective cesarean section. The transcripts of the three actors are
275 expressed in human amnion and chorion in all conditions (**Table 4**), meaning that NLRP7
276 inflammasomes could potentially be formed during all stages of pregnancy and at term.

277

278 ***ASC protein expression is increased with labor.***

279 We aimed to determine if the protein expression of NLRP7, ASC and Caspase-1 is influenced
280 by labor in amnion and chorion, and if these expressions varied between ZIM and ZAM areas.
281 Using ELISA assays, protein expression of ASC (**Figure 1A-C**), Caspase-1 (**Figure 1D-F**) and
282 NLRP7 (**Figure 1G-I**) was quantified. Labor affects only the expression of ASC, which is
283 increased in amnion and chorion (**Figure 1A, B**). Caspase-1 (**Figure 1D, E**) and NLRP7
284 (**Figure 1G, H**) protein expression was unchanged with labor, even if there is a tendency of
285 increased expression for NLRP7 in amnion (**Figure 1G**). We did not detect any difference of
286 expression between ZIM and ZAM areas (**Figure 1C, F, I**), but Caspase-1 expression is
287 increased in chorion compared to amnion in ZIM area (**Figure 1F**).

288 Given that ASC protein expression is increased in amnion with labor, which tends to be also
289 the case for NLRP7 protein, we reasonably thought that NLRP7 inflammasome could be an
290 essential actor of the weakening of fetal membranes at term. To decipher this, primary Amnion
291 Epithelial Cells (AEC) were stimulated with a known NLRP7 inflammasome specific ligand, the
292 Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1 (FSL-1) (58).

293

294 ***Pregnant women are healthy carriers of *Mycoplasma fermentans* and***
295 ***Mycoplasma salivarium.***

296 FSL-1 used to analyze the NLRP7 inflammasome formation and function in AEC is a synthetic
297 lipopeptide derived from a lipoprotein of *Mycoplasma salivarium*. Thus, we evaluated the
298 presence of this mycoplasma in term fetal membranes samples, obtained with or without labor.
299 *Mycoplasma salivarium* was found in practically all amnion and chorion samples, whether the
300 women delivered vaginally or by cesarean section (**Figure 2A**). For the first time, *Mycoplasma*
301 *salivarium* has been detected in term human fetal membranes.

302 The structure of FSL-1 is closed to the lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2
303 (MALP-2) that derives from a lipoprotein of *Mycoplasma fermentans*. Thus, we suggested that
304 *Mycoplasma salivarium* and *fermentans* could lead to a similar inflammatory response in fetal
305 membranes. Therefore, we checked the presence of *Mycoplasma fermentans* in fetal
306 membranes by RT-PCR using specific primers (**Table 3**). *Mycoplasma fermentans* was found
307 in amnion and chorion of almost all patients who delivered vaginally and by cesarean section
308 (**Figure 2B**). Even if *Mycoplasma fermentans* has already been detected in amniotic fluid (61),
309 for the first time, it is also identified in term human fetal membranes.

310 Given that samples for this experiment were collected from women without a pathological
311 pregnancy, we can assure that pregnant women are healthy carriers of *Mycoplasma salivarium*
312 and *Mycoplasma fermentans*, which potentially could be also involved in the induction of an
313 inflammatory response in fetal membranes, contributing to their term weakening.

314

315 ***NLRP7 and ASC are expressed in AEC in response to FSL-1.***

316 Primary AEC were harvested from amnion collected after cesarean section and cultured *in*
317 *vitro*. Expression level of NLRP7 and ASC was measured by RT-qPCR (**Figure 3A, B**) and
318 Western Blot assays (**Figure 3C-E**) after 4 hours or 20 hours of 250 ng/mL FSL-1 treatment
319 (a well-established concentration (62–64)), respectively. NLRP7 mRNA and protein levels

320 were significantly increased with FSL-1 treatment compared to untreated condition (**Figure**
321 **3A, C, D**). ASC transcripts expression level is decreased with FSL-1 treatment (**Figure 3B**)
322 while its protein level is increased (**Figure 3C, E**). Thus, AEC respond to FSL-1 by increasing
323 protein expression of NLRP7 and ASC, two molecular actors involved in the formation of
324 NLRP7 inflammasomes.

325

326 ***NLRP7 and ASC colocalize in AEC after FSL-1 treatment.***

327 Immunofluorescence assay was carried out to establish the localization of NLRP7 and ASC in
328 AEC 20 hours after FSL-1 treatment (**Figure 4**). In untreated condition, NLRP7 staining is
329 almost inexistent (**Figure 4B**) while ASC staining demonstrated that this protein is diffuse in
330 cytoplasm of AEC (**Figure 4A**). With FSL-1, intensity of the NLRP7 and ASC staining is
331 increased (**Figure 4F, G**), in agreement with previous Western blot results (**Figure 3C-E**).
332 Moreover, ASC proteins relocate around the nucleus and colocalize with NLRP7 proteins,
333 forming cellular dots, a characteristic structure of a functional inflammasome speck (**Figure**
334 **4I**).

335

336 ***Caspase-1 is expressed and processed in AEC in response to FSL-1.***

337 We then checked the functionality of the executor of inflammasome machinery, *i. e.* Caspase-
338 1, in AEC after FSL-1 treatment. For this, the processing of pro-caspase-1 protein into its
339 intermediate (considered as active) form was also analyzed. Transcripts of Caspase-1 (**Figure**
340 **5A**) and precursor and intermediate proteins of Caspase-1 (**Figure 5B-D**) are increased in
341 AEC after FSL-1 treatment compared to untreated condition. Therefore, Caspase-1 protein is
342 activated in AEC in response to FSL-1.

343

344 ***IL-1 β but not IL-18 transcripts expression is increased in response to FSL-1.***

345 To confirm the pro-inflammatory effect arising following treatment by FSL-1 on AEC, we
346 measured the mRNA expression level of IL-1 β and IL-18, two interleukins generally related to
347 inflammasome activation, using RT-qPCR (**Figure 6**). As expected, IL-1 β transcripts were
348 more expressed after 4 hours of FSL-1 treatment compared to untreated condition (**Figure**
349 **6A**). No significant difference was observed for IL-18 transcripts (**Figure 6B**). Thus, AEC
350 respond to FSL-1 by increasing expression of IL-1 β , but not IL-18 transcripts.

351

352 ***Gasdermin D protein is increased and processed after FSL-1 treatment.***

353 Inflammasomes induce classically pyroptotic cell death, mediated by Gasdermin D protein that
354 form pores on plasmatic membrane allowing the release of cellular content. We examined the
355 amount of Gasdermin D transcripts and proteins in AEC by RT-qPCR and Western blot,
356 respectively (**Figure 7**). While Gasdermin D transcripts expression is unchanged between
357 untreated and FSL-1 treated conditions (**Figure 7A**), we observed an increased expression of
358 the precursor of Gasdermin D protein 20 hours after FSL-1 treatment (**Figure 7B, C**).
359 Moreover, the pyroptotic form of Gasdermin D is also increased (**Figure 7D**).

360

361 ***All the FSL-1-mediated changes of transcripts expression observed are***
362 ***independent of NLRP7.***

363 In order to determine if changes of transcript expression are dependent or not to NLRP7
364 (and/or NLRP7 inflammasome), we used siRNA directed against NLRP7 and measured
365 transcript expression of different actors (**Figure 8**). AEC were transfected with siSCRAMBLE
366 or siNLRP7 during 24 hours, and treated with FSL-1 during 4 hours after transfection cessation.
367 First, efficacy of NLRP7 extinction was controlled by RT-qPCR and NLRP7 mRNAs were
368 strongly decreased with siNLRP7 (**Figure 8A**). However, Caspase-1 and IL-1 β expression was
369 not affected by siNLRP7 transfection (**Figure 8B, C**), meaning that transcript expression of
370 these genes are independent of NLRP7, and thus, NLRP7 inflammasome. Even if they were
371 not affected by FSL-1 treatment, we also checked transcript expression of ASC and Gasdermin
372 D that were similar with or without NLRP7 (**Figure 8D, E**), thus their expression is also
373 independent to NLRP7 too.

374

375 **DISCUSSION**

376 Inflammation is involved in both physiological and pathological rupture of human fetal
377 membranes and parturition. Recently, a particular attention is payed to inflammasomes and its
378 molecular actors that have been linked to preterm Prelabor Rupture Of Membranes (pPROM)
379 (65,66), chorioamnionitis (42,46,67), preterm labor (68–70) and preeclampsia (48,50,71).
380 Thus, a better characterization of inflammasomes-related inflammation seems to be essential
381 in order to prevent potential adverse pregnancy outcomes.

382 This work represents the first study of endogenous NLRP7 role in human fetal membranes,
383 and more especially in amnion epithelial cells (AEC). The transcripts of the three NLRP7
384 inflammasome actors, *i. e.* NLRP7, ASC and Caspase-1, are expressed in human fetal
385 membranes during all trimesters and at term, meaning that this inflammasome can assemble
386 at all stages of pregnancy, considering PAMP and DAMP presence or production throughout
387 pregnancy. Given that we focused on term physiological rupture of fetal membranes, we
388 examined protein expression of these three actors at term with or without labor, and in ZAM
389 and ZIM areas. ASC expression is increased in amnion with labor at term compared to without
390 labor and this has not been reported before. This result is consistent with the observation of
391 Gomez-Lopez *et al.*, *i. e.* an increased number of ASC/Caspase-1 complexes with labor in fetal
392 membranes (42). We do not observed a change of expression for Caspase-1 protein with labor,
393 again this is in accordance with the work of Romero *et al.* in which ELISA assays were used
394 for Caspase-1 concentration measurement too (72). In the same study, Western Blot assays
395 revealed no difference in pro-caspase-1 accumulation in fetal membranes with or without labor,
396 however, an increased accumulation of p20 isoform was observed with labor, as well as an
397 increased caspase-1 immunostaining. In the same way, Lappas demonstrated an unchanged
398 accumulation of pro-caspase-1 protein in fetal membranes by Western Blot assays, whereas
399 p35 and p10 isoformes were increased with labor (73). Finally, NLRP7 protein expression is
400 not affected by labor. In contrast, Romero *et al.* demonstrated that NLRP3 protein expression
401 is increased in fetal membranes with labor (72).

402 Furthermore, for the first time, *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*, potential
403 activators of NLRP7 inflammasomes, are detected in human fetal membranes. *M. fermentans*
404 has ever been found in amniotic fluid of women that presented chorioamnionitis and villitis (61)
405 and in women genital tract (74). The detection of these bacteria in fetal membranes obtained
406 after vaginal delivery could be due to a contamination after the crossing through the genital
407 tract. However, as these bacteria are also present in samples obtained after cesarean sections,
408 it suggests that *M. salivarium* and *M. fermentans* reach fetal membranes by genital tract
409 ascension, and it constitutes the first evidence that some women are healthy carriers.
410 Nevertheless, an overgrowth of these mycoplasma could lead to pathological pregnancy, like
411 it is the case for over mycoplasma (75–81). It could be reasonably imagined that they may be
412 involved in the physiological rupture of fetal membranes at term. Therefore, it seems important
413 to better understand the molecular pathway induced by mycoplasma, and to pay a special
414 attention on their relationship with sterile inflammation passing by inflammasomes.

415 To decipher that, we examined the mobilization of inflammasomes in response to mycoplasma,
416 and given that NLRP7 inflammasomes are known to be activated in macrophages with a *M.*

417 *salivarium*-derived ligand (58), we used the same ligand (Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1,
418 FSL-1) for our work.

419 We report that FSL-1 ligand increases expression of NLRP7 and Caspase-1 transcripts and
420 proteins in AEC, which is independent of NLRP7 as demonstrated by using siNLRP7. Thus,
421 expression of two molecular actors necessary to form NLRP7 inflammasomes is stimulated by
422 FSL-1. This event is similar to the transcriptional priming observed in canonical pathway of
423 NLRP3 inflammasome activation (82), suggesting that NLRP7 inflammasome is also
424 characterized by a transcriptional priming step. Transcripts expression of ASC is decreased
425 while the ASC protein level is increased with FSL-1 treatment. One study reported a decreased
426 ASC protein level in human monocytes infected with *Legionella pneumophila*, which is inhibited
427 if ASC expression is dependent on a *L. pneumophila* impervious promotor (83).

428 Under pro-inflammatory signals, inflammasomes are formed and gather in a cytosolic
429 macromolecular complex called "ASC speck" (84). Here, ASC and NLRP7 are present in AEC
430 all around the nucleus, and co-localize together. Our observation concerning ASC was similar
431 to the results recently obtained by Panaitescu *et al.* in their study, in which amnion epithelial
432 and mesenchymal cells present ASC speck-like structures all around the nucleus (40).
433 Moreover, given that NLRP7 and ASC co-localize around the nucleus, we could suppose that
434 these proteins interact with organelles. Indeed, it has been shown that NLRP7 is able to co-
435 localize with the Golgi apparatus and the Microtubule-Organizing Center within human
436 peripheral blood mononuclear cells (85). Another work demonstrated that NLRP3 and ASC
437 interact with mitochondria and endoplasmic reticulum in THP-1 cells under stimulation (86).
438 Thus, we suggested that, like NLRP3, NLRP7 inflammasomes interact with organelles that
439 contributes to their activation and functions in AEC.

440 Caspase-1 is the executor molecule of inflammasomes (82). Caspase-1 transcripts and pro-
441 caspase-1 protein expressions are increased with FSL-1 treatment. Thus, to confirm
442 inflammasomes activation, pro-caspase-1 processing was assessed by detecting caspase-1
443 intermediate form (p35). Indeed, Boucher *et al.* recently demonstrated in mouse macrophages
444 that the form of Caspase-1 with the major cleavage activity is the intermediate form (p33/p10
445 or p35) and not the dimer p20/p10, as it was supposed since many years (36). Here,
446 expression of Caspase-1 intermediate form is increased in AEC under FSL-1 stimulation,
447 meaning that an inflammasome is activated.

448 Activation of inflammasomes leads to secretion of IL-1 β and IL-18 after maturation of precursor
449 forms by caspase-1 (82). In an *in vivo* study it has been shown that IL-1 β mRNA expression is
450 increased in mouse fetal membranes, but not IL-18, following LPS stimulation (45). IL-1 β
451 transcripts expression is also increased in term human fetal membranes explants with LPS

452 (87). Moreover, IL-1 β transcription is increased in fetal membranes with labor whereas it is not
453 the case for IL-18 (72). Thus, an increased expression of IL-1 β mRNA in fetal membranes is
454 correlated to pathological and physiological conditions. Here, in the same way, we
455 demonstrated that AEC respond to FSL-1 by increasing IL-1 β transcripts expression, but not
456 IL-18, proving their ability to respond to a pro-inflammatory signal.

457 Activation of inflammasomes also induces gasdermin D cleavage, leading to the formation of
458 membrane pores with the N-terminal fragment, also called pyroptotic fragment (88). Gomez-
459 Lopez *et al.* associated gasdermine D, and subsequent pyroptosis, to normal and pathological
460 deliveries (41,70). Here, precursor and pyroptotic forms of gasdermin D are more expressed
461 with FSL-1 compared to untreated condition in AEC. Thus, gasdermin D pores could be formed
462 at AEC plasma membrane in response to FSL-1.

463 To conclude, our group demonstrated that NLRP7 inflammasomes are formed in AEC
464 following a *Mycoplasma salivarium*-derived lipopeptide stimulation. Given that amnion and
465 chorion are both involved in fetal membranes rupture, complementary investigations should
466 be initiated to determine if NLRP7 inflammasomes are also established in chorion cells.

467

468 **REFERENCES**

- 469 1. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American*
470 *Journal of Obstetrics and Gynecology* (1960) **79**:1070–1073. doi:10.1016/0002-
471 9378(60)90512-3
- 472 2. McLaren J. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour:
473 identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Human Reproduction*
474 (1999) **14**:237–241. doi:10.1093/humrep/14.1.237
- 475 3. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel
476 zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *BJOG: An International*
477 *Journal of Obstetrics and Gynaecology* (1994) **101**:375–386. doi:10.1111/j.1471-
478 0528.1994.tb11908.x
- 479 4. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected
480 cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Human Reproduction*
481 (1999) **14**:2895–2900. doi:10.1093/humrep/14.11.2895
- 482 5. Chai M, Walker SP, Riley C, Rice GE, Permezel M, Lappas M. Effect of Supracervical
483 Apposition and Spontaneous Labour on Apoptosis and Matrix Metalloproteinases in
484 Human Fetal Membranes. *Biomed Res Int* (2013) **2013**: doi:10.1155/2013/316146
- 485 6. Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, Guller S.
486 Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*
487 (1998) **83**:660–666. doi:10.1210/jcem.83.2.4600
- 488 7. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase
489 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane
490 remodeling and rupture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000)
491 **182**:409–416. doi:10.1016/S0002-9378(00)70232-8
- 492 8. El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, Redline RW, Mansour
493 JM, J. J. Moore. Term Human Fetal Membranes Have a Weak Zone Overlying the Lower

- 494 Uterine Pole and Cervix Before Onset of Labor. *Biol Reprod* (2005) **72**:720–726.
495 doi:10.1095/biolreprod.104.033647
- 496 9. Riley S, Leask R, Denison F, Wisely K, Calder A, Howe D. Secretion of tissue inhibitors
497 of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at
498 parturition. *Journal of Endocrinology* (1999) **162**:351–359. doi:10.1677/joe.0.1620351
- 499 10. Chai M, Barker G, Menon R, Lappas M. Increased oxidative stress in human fetal
500 membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries.
501 *Placenta* (2012) **33**:604–610. doi:10.1016/j.placenta.2012.04.014
- 502 11. Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, Lappas M, Taylor RN.
503 Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes.
504 *Placenta* (2011) **32**:317–322. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.015
- 505 12. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, Saade GR,
506 Menon R. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? *American*
507 *Journal of Obstetrics and Gynecology* (2015) **213**:359.e1-359.e16.
508 doi:10.1016/j.ajog.2015.05.041
- 509 13. Jin J, Richardson L, Sheller-Miller S, Zhong N, Menon R. Oxidative stress induces
510 p38MAPK-dependent senescence in the feto-maternal interface cells. *Placenta* (2018)
511 **67**:15–23. doi:10.1016/j.placenta.2018.05.008
- 512 14. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, Taylor RN. Short
513 Fetal Leukocyte Telomere Length and Preterm Prelabor Rupture of the Membranes.
514 *PLoS ONE* (2012) **7**:e311136. doi:10.1371/journal.pone.0031136
- 515 15. Menon R, Behnia F, Poletini J, Saade GR, Campisi J, Velarde M. Placental membrane
516 aging and HMGB1 signaling associated with human parturition. *Aging (Albany NY)*
517 (2016) **8**:216–229.
- 518 16. Janzen C, Sen S, Lei MYY, Gagliardi de Assumpcao M, Challis J, Chaudhuri G. The
519 Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Membrane Rupture. *J*
520 *Clin Endocrinol Metab* (2016) **102**:1261–1269. doi:10.1210/jc.2016-3150
- 521 17. Marcellin L, Schmitz T, Messaoudene M, Chader D, Parizot C, Jacques S, Delaire J,
522 Gogusev J, Schmitt A, Lesaffre C, et al. Immune Modifications in Fetal Membranes
523 Overlying the Cervix Precede Parturition in Humans. *The Journal of Immunology* (2017)
524 **198**:1345–1356. doi:10.4049/jimmunol.1601482
- 525 18. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE.
526 Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes,
527 decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*
528 (2003) **9**:41–45. doi:10.1093/molehr/gag001
- 529 19. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine
530 abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational
531 membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* (1999) **181**:1530–
532 1536. doi:10.1016/s0002-9378(99)70400-x
- 533 20. Gunn L, Hardiman P, Tharmaratnam S, Lowe D, Chard T. Measurement of interleukin-1
534 alpha and interleukin-6 in pregnancy-associated tissues. *Reprod Fertil Dev* (1996)
535 **8**:1069–1073.
- 536 21. Menon R. Human Fetal Membranes at Term: Dead Tissue or Signalers of Parturition?
537 *Placenta* (2016) **44**:1–5. doi:10.1016/j.placenta.2016.05.013
- 538 22. Menon R. Initiation of human parturition: signaling from senescent fetal tissues via
539 extracellular vesicle mediated paracrine mechanism. *Obstetrics & Gynecology Science*
540 (2019) **62**:199. doi:10.5468/ogs.2019.62.4.199
- 541 23. Menon R, Bonney EA, Condon J, Mesiano S, Taylor RN. Novel concepts on pregnancy
542 clocks and alarms: redundancy and synergy in human parturition. *Hum Reprod Update*
543 (2016) **22**:535–560. doi:10.1093/humupd/dmw022
- 544 24. Menon R, Mesiano S, Taylor RN. Programmed Fetal Membrane Senescence and
545 Exosome-Mediated Signaling: A Mechanism Associated With Timing of Human
546 Parturition. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2017) **8**: doi:10.3389/fendo.2017.00196
- 547 25. Yang D, Han Z, Oppenheim JJ. ALARMINs AND IMMUNITY. *Immunol Rev* (2017)
548 **280**:41–56. doi:10.1111/imr.12577

- 549 26. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current*
550 *Opinion in Immunology* (2005) **17**:359–365. doi:10.1016/j.coi.2005.06.002
- 551 27. Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *The*
552 *Journal of Immunology* (2017) **198**:1395–1402. doi:10.4049/jimmunol.1601342
- 553 28. Eren E, Ellidag HY, Aydin O, Yilmaz N. HDL functionality and crystal-based sterile
554 inflammation in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* (2015) **439**:18–23.
555 doi:10.1016/j.cca.2014.09.024
- 556 29. Rock KL, Kataoka H, Lai J-J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities.
557 *Nature Reviews Rheumatology* (2013) **9**:13–23. doi:10.1038/nrrheum.2012.143
- 558 30. van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, van Gulik TM, Heger M. Sterile inflammation in
559 hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics. *J*
560 *Gastroenterol Hepatol* (2013) **28**:394–400. doi:10.1111/jgh.12072
- 561 31. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering
562 Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* (2002)
563 **10**:417–426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
- 564 32. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* (2014)
565 **157**:1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007
- 566 33. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their
567 canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of Biochemistry and*
568 *Biophysics* (2019) doi:10.1016/j.abb.2019.02.008
- 569 34. Palazon-Riquelme P, Lopez-Castejon G. The inflammasomes, immune guardians at
570 defence barriers. *Immunology* (2018) **155**:320–330. doi:10.1111/imm.12989
- 571 35. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases.
572 *Yonsei Med J* (2016) **57**:5–14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
- 573 36. Boucher D, Monteleone M, Coll R, Chen K, Ross C, Teo J, Gomez G, Holley C,
574 Bierschenk D, J. Stacey K, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to
575 terminate inflammasome activity. *The Journal of Experimental Medicine* (2018)
576 **215**:jem.20172222. doi:10.1084/jem.20172222
- 577 37. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, Takeda K,
578 Zychlinsky A. Caspase-1 Activation of IL-1 β and IL-18 Are Essential for Shigella flexneri-
579 Induced Inflammation. *Immunity* (2000) **12**:581–590. doi:10.1016/S1074-7613(00)80209-
580 5
- 581 38. Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, Farady CJ, Müller DJ,
582 Broz P, Hiller S. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of
583 pyroptotic cell death. *The EMBO Journal* (2016)e201694696.
584 doi:10.15252/embj.201694696
- 585 39. Rathkey JK, Benson BL, Chirieleison SM, Yang J, Xiao TS, Dubyak GR, Huang AY,
586 Abbott DW. Live-cell visualization of gasdermin D-driven pyroptotic cell death. *J Biol*
587 *Chem* (2017) **292**:14649–14658. doi:10.1074/jbc.M117.797217
- 588 40. Panaitescu B, Romero R, Gomez-Lopez N, Xu Y, Leng Y, Maymon E, Pacora P, Erez O,
589 Yeo L, Hassan SS, et al. In vivo evidence of inflammasome activation during
590 spontaneous labor at term. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019)
591 **32**:1978–1991. doi:10.1080/14767058.2017.1422714
- 592 41. Gomez-Lopez N, Romero R, Panaitescu B, Miller D, Zou C, Gudicha DW, Tarca AL,
593 Para R, Pacora P, Hassan SS, et al. Gasdermin D: in vivo evidence of pyroptosis in
594 spontaneous labor at term. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019)1–
595 11. doi:10.1080/14767058.2019.1610740
- 596 42. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Garcia-Flores V, Leng Y, Panaitescu B, Miller D,
597 Abrahams VM, Hassan SS. Inflammasome Assembly in the Chorioamniotic Membranes
598 during Spontaneous Labor at Term. *Am J Reprod Immunol* (2017) **77**:
599 doi:10.1111/aji.12648
- 600 43. Plazyo O, Romero R, Unkel R, Balancio A, Mial TN, Xu Y, Dong Z, Hassan SS, Gomez-
601 Lopez N. HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes
602 That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biol Reprod* (2016) **95**:
603 doi:10.1095/biolreprod.116.144139

- 604 44. Gomez-Lopez N, Romero R, Garcia-Flores V, Leng Y, Miller D, Hassan SS, Hsu C-D,
605 Panaitescu B. Inhibition of the NLRP3 inflammasome can prevent sterile intra-amniotic
606 inflammation, preterm labor/birth, and adverse neonatal outcomes†. *Biology of*
607 *Reproduction* (2019) **100**:1306–1318. doi:10.1093/biolre/iory264
- 608 45. Faro J, Romero R, Schwenkel G, Garcia-Flores V, Arenas-Hernandez M, Leng Y, Xu Y,
609 Miller D, Hassan SS, Gomez-Lopez N. Intra-amniotic inflammation induces preterm birth
610 by activating the NLRP3 inflammasome. *Biology of Reproduction* (2019) **100**:1290–1305.
611 doi:10.1093/biolre/iory261
- 612 46. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Plazyo O, Unkel R, Than NG, Chaemsaitong P,
613 Chaiworapongsa T, Dong Z, Tarca AL, et al. A Role for the Inflammasome in
614 Spontaneous Labor at Term with Acute Histologic Chorioamnionitis. *Reprod Sci* (2017)
615 **24**:934–953. doi:10.1177/1933719116675058
- 616 47. Stødle GS, Silva GB, Tangerås LH, Gierman LM, Nervik I, Dahlberg UE, Sun C, Aune
617 MH, Thomsen LCV, Bjørge L, et al. Placental inflammation in pre-eclampsia by Nod-like
618 receptor protein (NLRP)3 inflammasome activation in trophoblasts. *Clin Exp Immunol*
619 (2018) **193**:84–94. doi:10.1111/cei.13130
- 620 48. C.Weel I, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo JP,
621 Peraçoli MT. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant
622 women with severe preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* (2017) **123**:40–
623 47. doi:10.1016/j.jri.2017.09.002
- 624 49. Kohli S, Ranjan S, Hoffmann J, Kashif M, Daniel EA, Al-Dabet MM, Bock F, Nazir S,
625 Huebner H, Mertens PR, et al. Maternal extracellular vesicles and platelets promote
626 preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts. *Blood* (2016) **128**:2153–2164.
627 doi:10.1182/blood-2016-03-705434
- 628 50. Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Jr JPA, Peraçoli JC,
629 Oliveira L de, Peraçoli MT. Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3
630 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLOS ONE* (2015) **10**:e0129095.
631 doi:10.1371/journal.pone.0129095
- 632 51. Xu L, Li S, Liu Z, Jiang S, Wang J, Guo M, Zhao X, Song W, Liu S. The NLRP3
633 rs10754558 polymorphism is a risk factor for preeclampsia in a Chinese Han population.
634 *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019) **32**:1792–1799.
635 doi:10.1080/14767058.2017.1418313
- 636 52. Slim R, Wallace EP. NLRP7 and the Genetics of Hydatidiform Moles: Recent Advances
637 and New Challenges. *Front Immunol* (2013) **4**: doi:10.3389/fimmu.2013.00242
- 638 53. Nguyen NMP, Khawajkie Y, Mechtouf N, Rezaei M, Breguet M, Kurvinen E, Jagadeesh
639 S, Solmaz AE, Aguinaga M, Hemida R, et al. The genetics of recurrent hydatidiform
640 moles: new insights and lessons from a comprehensive analysis of 113 patients. *Modern*
641 *Pathology* (2018) **31**:1116. doi:10.1038/s41379-018-0031-9
- 642 54. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R, Bagga R, Kircheisen R, Ao
643 A, Ratti B, et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and
644 reproductive wastage in humans. *Nature Genetics* (2006) **38**:300. doi:10.1038/ng1740
- 645 55. Huang J-Y, Yu P-H, Li Y-C, Kuo P-L. NLRP7 contributes to in vitro decidualization of
646 endometrial stromal cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2017) **15**:
647 doi:10.1186/s12958-017-0286-x
- 648 56. Mahadevan S, Wen S, Wan Y-W, Peng H-H, Otta S, Liu Z, Iacovino M, Mahen EM, Kyba
649 M, Sadikovic B, et al. NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to
650 overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Human Molecular Genetics* (2014)
651 **23**:706–716. doi:10.1093/hmg/ddt457
- 652 57. Abi Nahed R, Reynaud D, Borg AJ, Traboulsi W, Wetzal A, Sapin V, Brouillet S,
653 Dieudonné MN, Dakouane-Giudicelli M, Benharouga M, et al. NLRP7 is increased in
654 human idiopathic fetal growth restriction and plays a critical role in trophoblast
655 differentiation. *J Mol Med* (2019) **97**:355–367. doi:10.1007/s00109-018-01737-x
- 656 58. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y,
657 Stehlik C. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial

- 658 Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity* (2012) **36**:464–476.
659 doi:10.1016/j.immuni.2012.02.001
- 660 59. Bouvier D, Rouzaire M, Marceau G, Prat C, Pereira B, Lemarié R, Deruelle P, Fajardy I,
661 Gallot D, Blanchon L, et al. Aquaporins and Fetal Membranes From Diabetic Parturient
662 Women: Expression Abnormalities and Regulation by Insulin. *J Clin Endocrinol Metab*
663 (2015) **100**:E1270–E1279. doi:10.1210/jc.2015-2057
- 664 60. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T,
665 Pfaffl MW, Shipley GL, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication
666 of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* (2009) **55**:611–622.
667 doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- 668 61. Blanchard A, Hamrick W, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Use of the Polymerase Chain
669 Reaction for Detection of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma genitalium* in the
670 Urogenital Tract and Amniotic Fluid.8.
- 671 62. Goradia P, Lim R, Lappas M. DREAM Is Involved in the Genesis of Inflammation-
672 Induced Prolabour Mediators in Human Myometrial and Amnion Cells. *Biomed Res Int*
673 (2018) **2018**: doi:10.1155/2018/8237087
- 674 63. Lim R, Barker G, Lappas M. PARK7 regulates inflammation-induced pro-labour
675 mediators in myometrial and amnion cells. *Reproduction* (2018) **155**:207–218.
676 doi:10.1530/REP-17-0604
- 677 64. Lim R, Barker G, Lappas M. Pellino 1 is a novel regulator of TNF and TLR signalling in
678 human myometrial and amnion cells. *J Reprod Immunol* (2018) **127**:24–35.
679 doi:10.1016/j.jri.2018.04.003
- 680 65. Brickle A, Tran HT, Lim R, Liong S, Lappas M. Autophagy, which is decreased in
681 labouring fetal membranes, regulates IL-1 β production via the inflammasome. *Placenta*
682 (2015) **36**:1393–1404. doi:10.1016/j.placenta.2015.10.015
- 683 66. Modi BP, Teves ME, Pearson LN, Parikh HI, Haymond-Thornburg H, Tucker JL,
684 Chaemsaitong P, Gomez-Lopez N, York TP, Romero R, et al. Mutations in fetal genes
685 involved in innate immunity and host defense against microbes increase risk of preterm
686 premature rupture of membranes (PPROM). *Mol Genet Genomic Med* (2017) **5**:720–729.
687 doi:10.1002/mgg3.330
- 688 67. Gomez-Lopez N, Romero R, Maymon E, Kusanovic JP, Panaitescu B, Miller D, Pacora
689 P, Tarca AL, Motomura K, Erez O, et al. Clinical chorioamnionitis at term IX: in vivo
690 evidence of intra-amniotic inflammasome activation. *Journal of Perinatal Medicine* (2019)
691 **47**:276–287. doi:10.1515/jpm-2018-0271
- 692 68. Gomez-Lopez N, Romero R, Panaitescu B, Leng Y, Xu Y, Tarca AL, Faro J, Pacora P,
693 Hassan SS, Hsu C-D. Inflammasome activation during spontaneous preterm labor with
694 intra-amniotic infection or sterile intra-amniotic inflammation. *Am J Reprod Immunol*
695 (2018) **80**:e13049. doi:10.1111/aji.13049
- 696 69. Gotsch F, Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Vaisbuch E, Espinoza J, Kusanovic
697 JP, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Kim CJ, et al. Evidence of the Involvement of Caspase-1
698 under Physiologic and Pathologic Cellular Stress during Human Pregnancy: A Link
699 Between the Inflammasome and Parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2008)
700 **21**:605–616. doi:10.1080/14767050802212109
- 701 70. Gomez-Lopez N, Romero R, Tarca AL, Miller D, Panaitescu B, Schwenkel G, Gudicha
702 DW, Hassan SS, Pacora P, Jung E, et al. Gasdermin D: Evidence of Pyroptosis in
703 Spontaneous Preterm Labor with Sterile Intra-amniotic Inflammation or Intra-amniotic
704 Infection. *Am J Reprod Immunol* (2019) doi:10.1111/aji.13184
- 705 71. Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi K-C, Kraiden M, Leung PCK,
706 Money DM, Patrick DM, et al. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin
707 inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG* (2010) **117**:99–108.
708 doi:10.1111/j.1471-0528.2009.02428.x
- 709 72. Romero R, Xu Y, Plazyo O, Chaemsaitong P, Chaiworapongsa T, Unkel R, Than NG,
710 Chiang PJ, Dong Z, Xu Z, et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at
711 Term. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) **79**:e12440.
712 doi:10.1111/aji.12440

- 713 73. Lappas M. Caspase-1 Activation is Increased with Human Labour in Foetal Membranes
714 and Myometrium and Mediates Infection-Induced Interleukin-1 β Secretion. *Am J Reprod*
715 *Immunol* (2014) **71**:189–201. doi:10.1111/aji.12174
- 716 74. Agbakoba NR, Adetosoye AI, Adewole IF. Presence of mycoplasma and ureaplasma
717 species in the vagina of women of reproductive age. *West Afr J Med* (2007) **26**:28–31.
- 718 75. Kacerovský M, Boudys L. [Preterm premature rupture of membranes and Ureaplasma
719 urealyticum]. *Ceska Gynekol* (2008) **73**:154–159.
- 720 76. Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes
721 and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2009) **52**:117–120.
- 722 77. Kwak D-W, Hwang H-S, Kwon J-Y, Park Y-W, Kim Y-H. Co-infection with vaginal
723 Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis increases adverse pregnancy
724 outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J*
725 *Matern Fetal Neonatal Med* (2014) **27**:333–337. doi:10.3109/14767058.2013.818124
- 726 78. Paramel Jayaprakash T, Wagner EC, van Schalkwyk J, Albert AYK, Hill JE, Money DM,
727 PPRM Study Group. High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women
728 following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort
729 Study. *PLOS ONE* (2016) **11**:e0166794. doi:10.1371/journal.pone.0166794
- 730 79. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control
731 study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J*
732 *Med* (1988) **319**:972–978. doi:10.1056/NEJM198810133191503
- 733 80. Cox C, Saxena N, Watt AP, Gannon C, McKenna JP, Fairley DJ, Sweet D, Shields MD, L
734 Cosby S, Coyle PV. The common vaginal commensal bacterium Ureaplasma parvum is
735 associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med*
736 (2016) **29**:3646–3651. doi:10.3109/14767058.2016.1140734
- 737 81. Latino MA, Botta G, Badino C, Maria DD, Petrozziello A, Sensini A, Leli C. Association
738 between genital mycoplasmas, acute chorioamnionitis and fetal pneumonia in
739 spontaneous abortions. *J Perinat Med* (2018) **46**:503–508. doi:10.1515/jpm-2016-0305
- 740 82. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*
741 (2018) **11**:359–374. doi:10.2147/JIR.S141220
- 742 83. Abdelaziz DH, Gavrillin MA, Akhter A, Caution K, Kotrange S, Khweek AA, Abdulrahman
743 BA, Grandhi J, Hassan ZA, Marsh C, et al. Apoptosis-associated Speck-like Protein
744 (ASC) Controls Legionella pneumophila Infection in Human Monocytes. *J Biol Chem*
745 (2011) **286**:3203–3208. doi:10.1074/jbc.M110.197681
- 746 84. Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cellular*
747 *and Molecular Life Sciences* (2017) **74**:1211–1229. doi:10.1007/s00018-016-2396-6
- 748 85. Messaed C, Akoury E, Djuric U, Zeng J, Saleh M, Gilbert L, Seoud M, Qureshi S, Slim R.
749 NLRP7, a Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor Protein, Is Required for
750 Normal Cytokine Secretion and Co-localizes with Golgi and the Microtubule-organizing
751 Center. *Journal of Biological Chemistry* (2011) **286**:43313–43323.
752 doi:10.1074/jbc.M111.306191
- 753 86. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome
754 activation. *Nature* (2011) **469**:221–225. doi:10.1038/nature09663
- 755 87. Morwood CJ, Lappas M. The Citrus Flavone Nobiletin Reduces Pro-Inflammatory and
756 Pro-Labour Mediators in Fetal Membranes and Myometrium: Implications for Preterm
757 Birth. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0108390
- 758 88. Taabazuing CY, Okondo MC, Bachovchin DA. Pyroptosis and Apoptosis Pathways
759 Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chemical Biology*
760 (2017) **24**:507-514.e4. doi:10.1016/j.chembiol.2017.03.009
- 761

Human gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C) for RT-PCR	Annealing temperature (°C) for quantitative RT-PCR
ASC	AACGTGCTGCGCGACATGG	ACTGCCTGGTACTGCTCATC	61	61
Caspase-1	AGCTGAGGTTGACATCACAGG	TGTCAGAGGTCTTGTGCTCTG	64	62
Gasdermin D	AGCCTGCAGAGCTCCACTG	ATCGTAGAAGTGAAGCTCC	61	58
IL-1 β	AATCTCCGACCACCACTACAG	TCCCATGTGTGCGAAGAAGATAG	64	62
IL-18	ATCAGATTACTTTGGCAAGCTTG	AGGCTGGCTATCTTTATACATAC	59	60
NLRP7	TGCTGTACAAGACCATGACACG	ACTCAAGCCCTCACACAGAAAC	62	61
RPLP0	AGGCTTTAGGTATCACCCT	GCAGAGTTTCTCTGTGATA	∅	58, 60, 61, 62

Table 1 : Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR and RT-qPCR amplification of human gene. These primer sequences were used in order to amplify human cDNA of indicated genes obtained after reverse transcription of total mRNAs, extracted from human fetal membranes tissues or primary amnion cells.

Antibody	Species (clonality)	Compagny (catalog number)	Dilution for Western Blot	Dilution for Immunofluorescence
Anti-ASC	Mouse (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology (sc-271054)	1:200	1:25
Anti-Caspase-1	Rabbit (polyclonal)	Abcam (ab1872)	1:200	∅
Anti-NLRP7	Rabbit (polyclonal)	Thermofisher Scientific (PA5-21023)	1:300	1:500
Anti-Gasdermin D	Rabbit (polyclonal)	Novus Biologicals (NBP2-33422)	1:400	∅

Table 2 : Primary antibodies, their sources and uses.

Species	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C) for RT-PCR
<i>Mycoplasma fermentans</i>	GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC	GGTTATTCGATTCTAAATCGCCT	62
<i>Mycoplasma salivarium</i>	ATGGATTGTAAAGTGCTGTTGCTAG	GCGTCAACAGTTCTCTGCCG	65

Table 3 : Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR amplification of *Mycoplasma* gDNA. These primer sequences were used in order to amplify *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma salivarium* gDNA from amnion and chorion samples.

<i>Tissue</i> \ <i>mRNA</i>		NLRP7	ASC	Caspase-1
		First trimester	+	+
Second trimester	amnion	+	+	+
	chorion	+	+	+
Third trimester	amnion	+	+	+
	chorion	+	+	+
Term	amnion	+	+	+
	chorion	+	+	+

Table 4 : RT-PCR analysis of NLRP7, ASC and Caspase-1 mRNAs expression in human fetal membranes. Total RNAs were isolated from human fetal membranes sheets, *i. e.* amnion and chorion, collected from women at first, second and third trimesters and after term elective cesarean section. NLRP7, ASC and Caspase-1 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The symbols « + » indicate the detection of all the mRNAs, in all conditions.

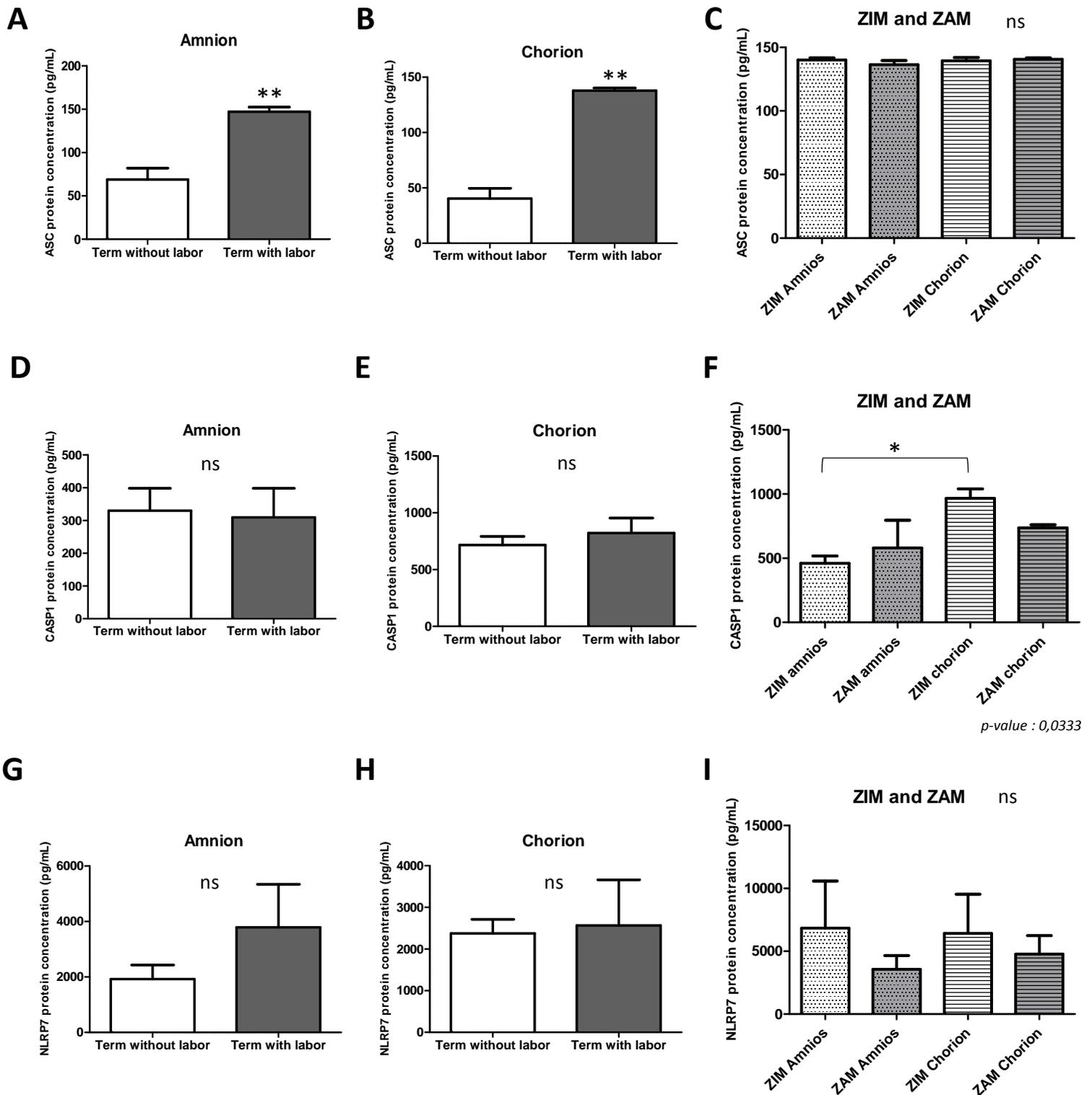
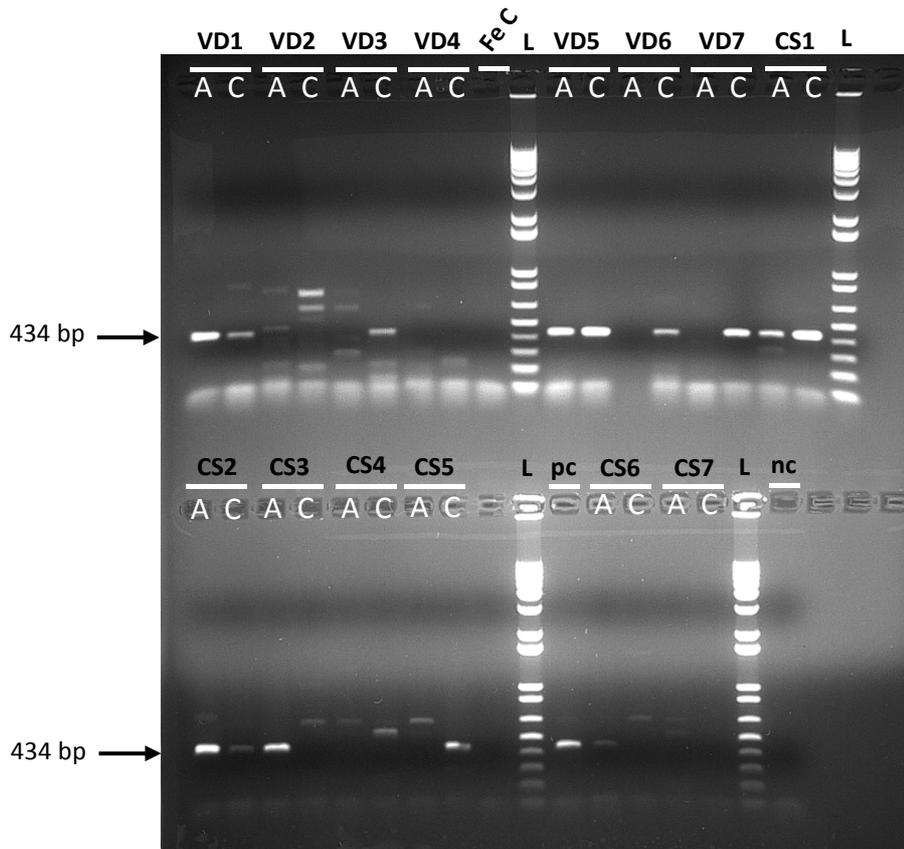


Figure 1: ASC, Caspase-1 and NLRP7 protein expression in term fetal membranes. Protein expression of ASC (A-C), Caspase-1 (D-F) and NLRP7 (G-I) was measured in term amnion and chorion with or without labor (A, B, D, E, G, H) and in ZIM and ZAM areas at term (C, F, I) using ELISA assays.

Number of samples: n=7 for term without labor tissues ; n=6 for term with labor tissues ; n=5 for ZIM and ZAM tissues. Statistics for C, F and I: non parametric One way anova, Kruskal Wallis test, Dunns post test. Statistics for A, B, D, E, G and H: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain ; CASP1: Caspase-1 ; NLRP: Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor, Pyrin domain containing ; ZAM: Zone of Altered Morphology ; ZIM: Zone of Intact Morphology.

A *Mycoplasma salivarium*



B *Mycoplasma fermentans*

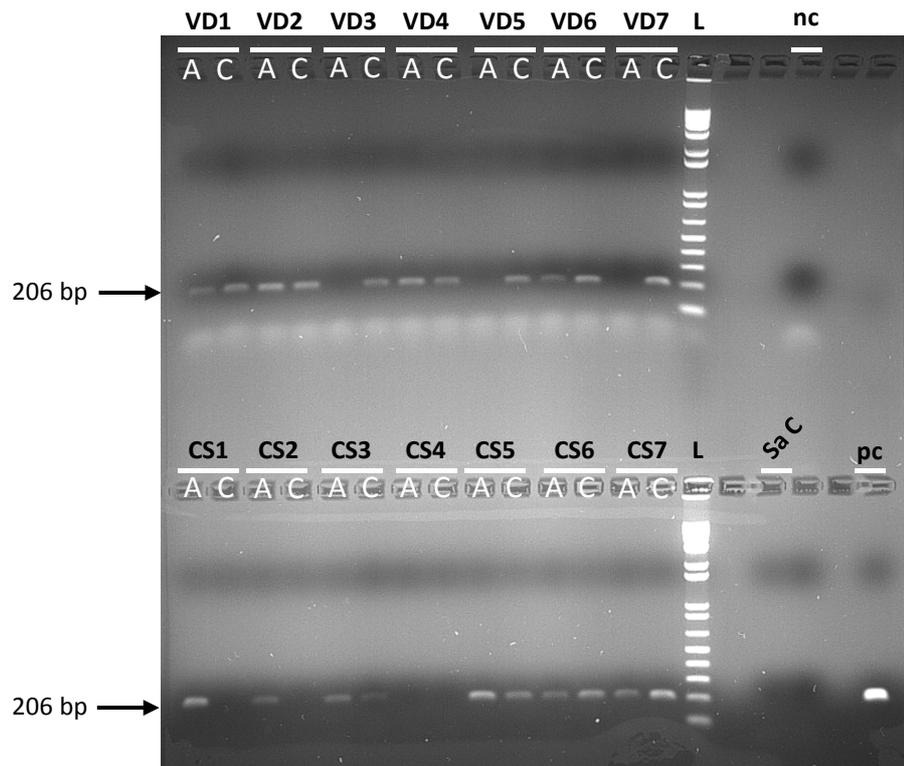


Figure 2: *Mycoplasma salivarium* (panel A) and *Mycoplasma fermentans* (panel B) are present in human fetal membranes. Using primers specific to *Mycoplasma salivarium* (panel A) or *Mycoplasma fermentans* (panel B) (**Table 3**), these two species of mycoplasma were identified in human amnion (A) and chorion (C), obtained after vaginal delivery (VD ; n=7) or cesarean section (CS ; n=7). We checked the primers were not interspecific by amplifying gDNA of one species with primers of the other species (Fe C and Sa C, *M. fermentans* gDNA control and *M. salivarium* gDNA control). PCR products amplified with primers specific to *M. salivarium* or *M. fermentans* have a length of 434 bp or 206 bp, respectively. The negative control (PCR mix without DNA) and positive control (using *M. salivarium* and *M. fermentans* gDNA) were indicated as nc and pc, respectively. A 2% agarose gel stained with ethidium bromide was used to visualize the results of PCR. The ladder (L) is 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-026).

VD: vaginal delivery ; CS: cesarean section ; A: Amnion ; C: Chorion ; Fe C: specificity control with *M. fermentans* gDNA ; Sa C: specificity control with *M. salivarium* gDNA ; nc: negative control ; pc: positive control ; bp: base pair ; L: ladder.

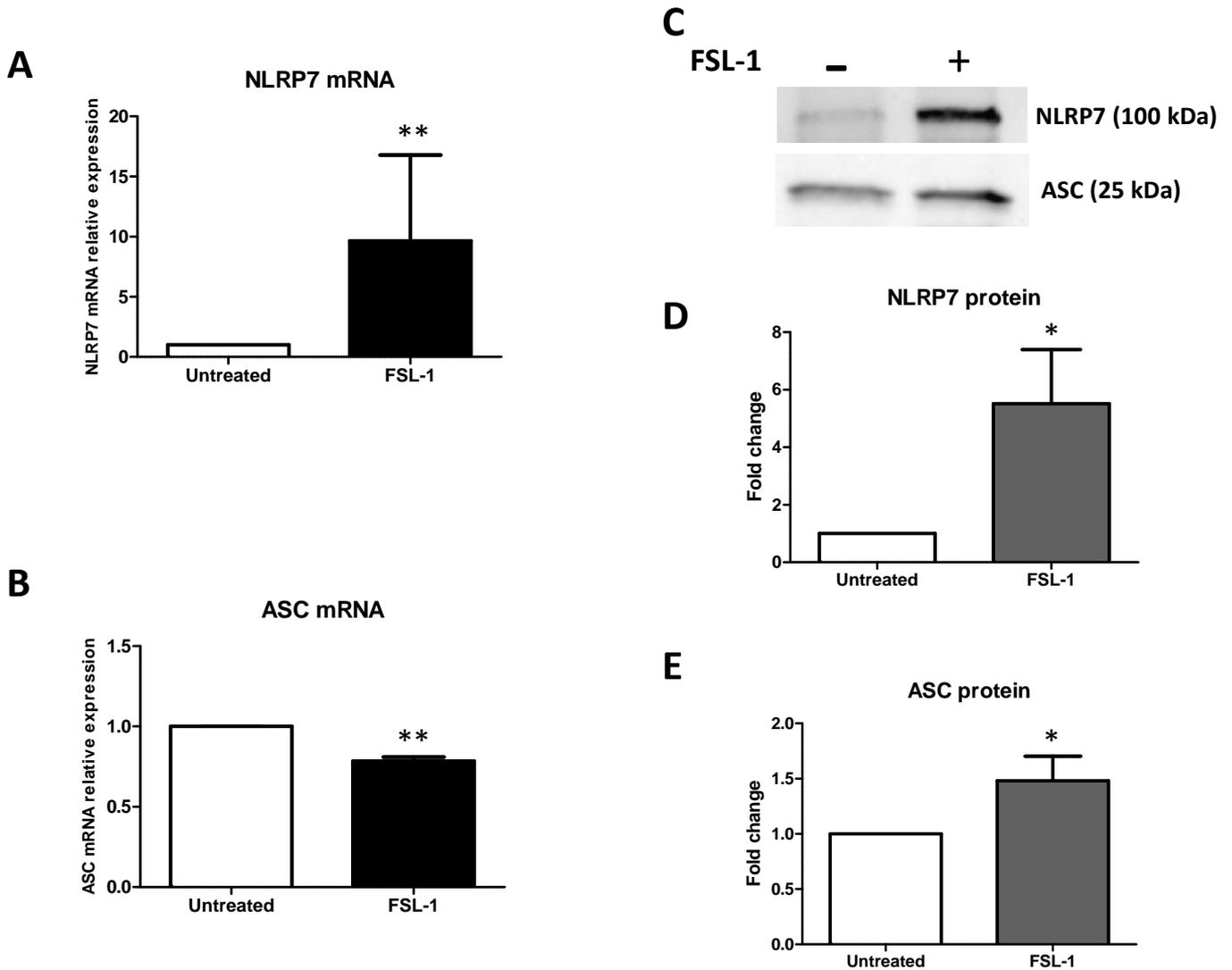


Figure 3: NLRP7 and ASC expression is increased in response to FSL-1 in AEC. Expression of NLRP7 (A, C, D) and ASC (B, C, E), was measured at transcript (A, B) and protein (C-E) levels with or without FSL-1 treatment, using RT-qPCR and Western blot, respectively. Representative Western Blot data are shown in C. Transcript and protein levels were evaluated 4 hours or 20 hours after 250ng/mL of FSL-1 exposition, respectively.

Statistics: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

NLRP: Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor, Pyrin domain containing ; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain ; AEC: Amnion Epithelial Cells ; FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1.

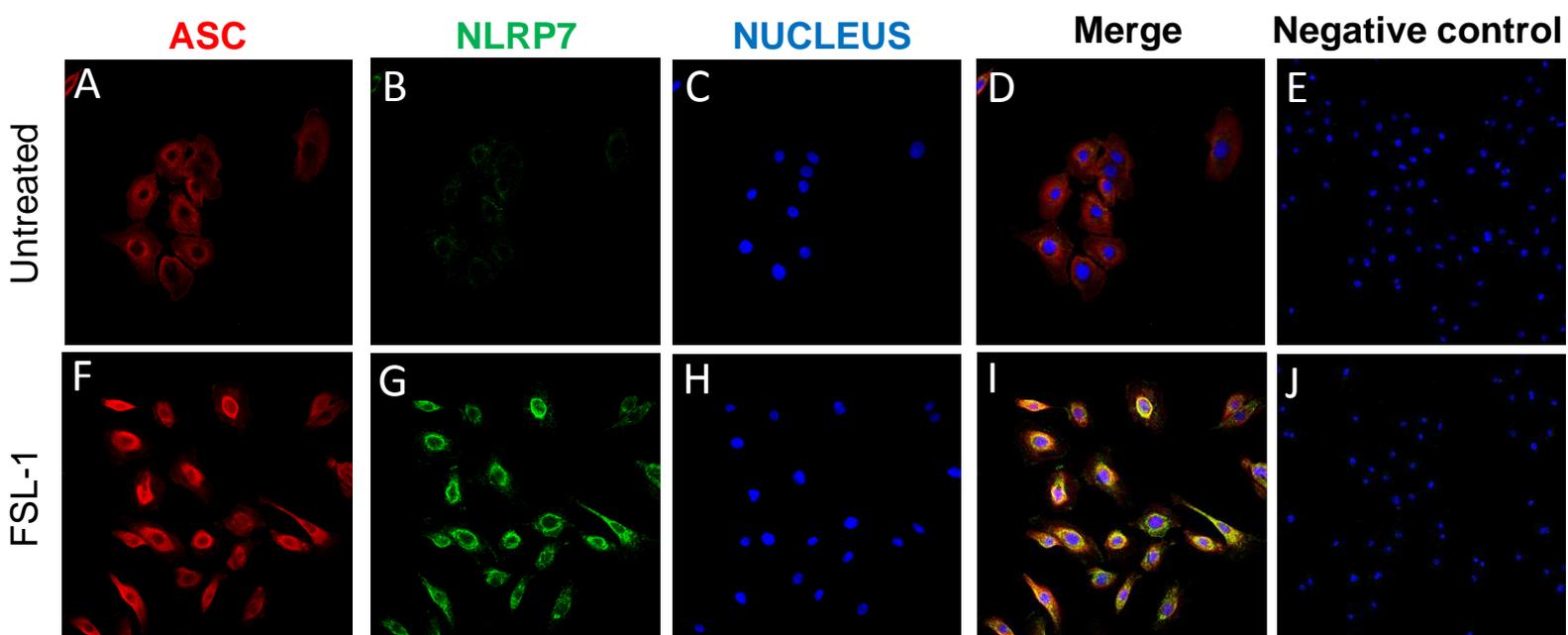


Figure 4: NLRP7 and ACS colocalize in response to FSL-1 in AEC. Immunofluorescence assay of AEC treated (F-J) or not (A-E) with 250ng/mL of FSL-1 during 20 hours. ASC proteins were stained in red (A, F), NLRP7 proteins in green (B, G), and nucleus in blue with the Hoescht staining (C, H). Merge pictures are seen in D and I. Negative controls, corresponding to secondary antibodies incubation without primary antibodies, attested the specificity of antibodies used (E, J). Magnification: x400 (except for negative controls, x200).

NLRP: Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor, Pyrin domain containing ; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain ; AEC: Amnion Epithelial Cells ; FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1.

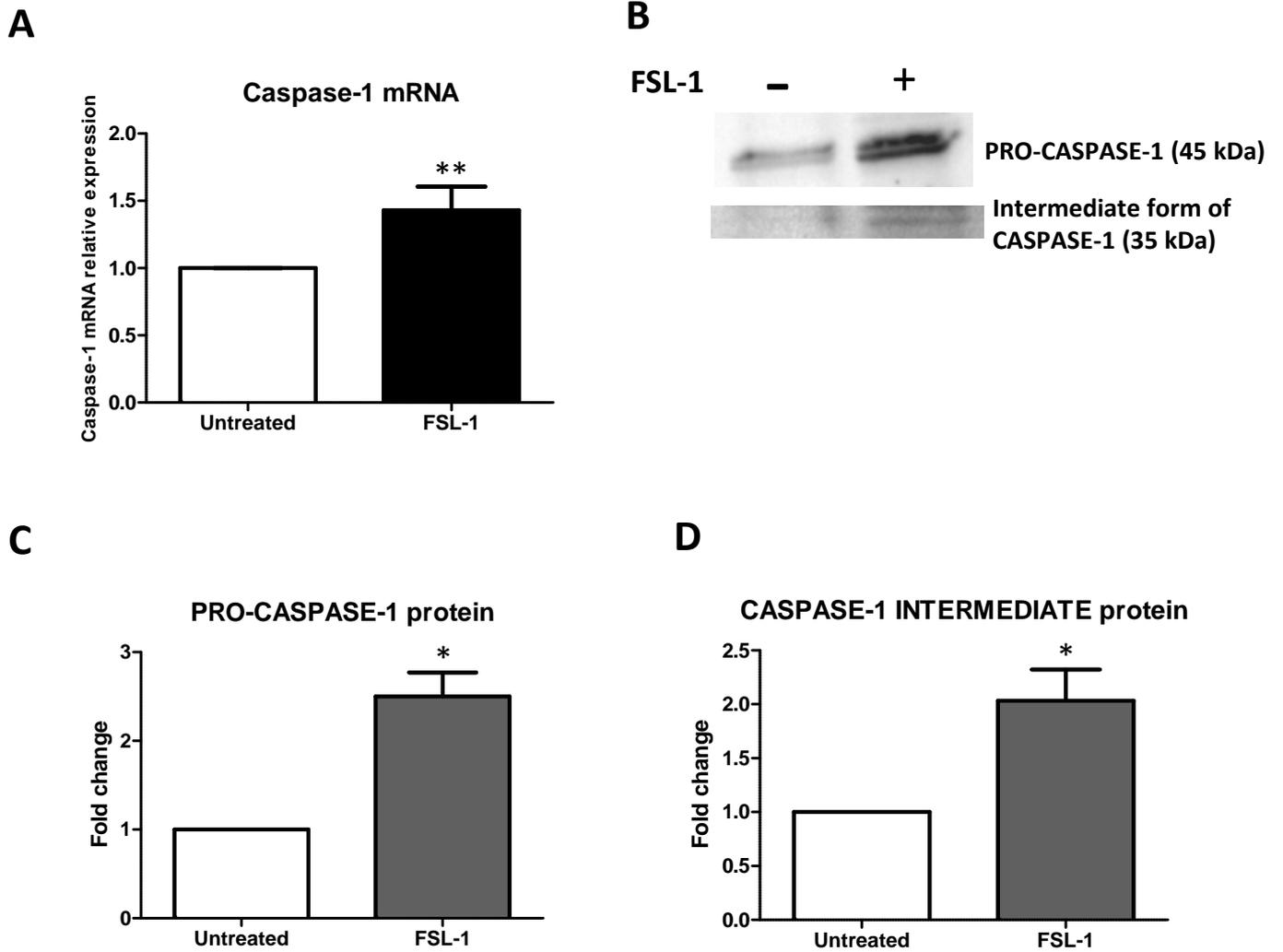


Figure 5: Caspase-1 expression and processing are increased in response to FSL-1 in AEC. Expression of Caspase-1 forms was measured at transcript (A) and protein (B-D) levels with or without FSL-1 treatment, using RT-qPCR and Western blot, respectively. Representative Western Blot data are shown in B. Transcript and protein levels were evaluated 4 hours or 20 hours after 250ng/mL of FSL-1 exposition, respectively. Statistics: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1 ; AEC: Amnion Epithelial Cells.

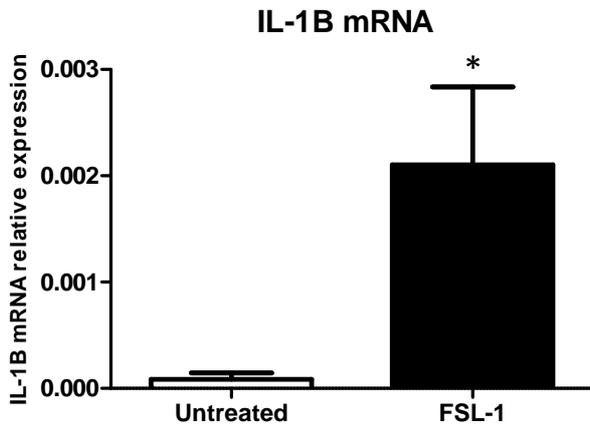
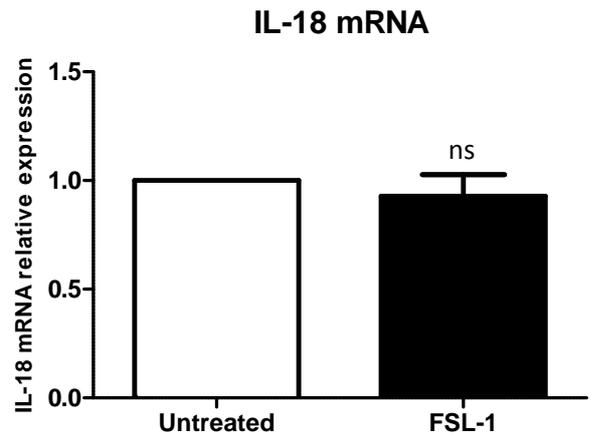
A**B**

Figure 6: IL-1 β but not IL-18 transcripts are increased in response to FSL-1 in AEC. Transcripts expression of IL-1 β (A) and IL-18 (B) was measured in AEC treated or not with 250ng/mL of FSL-1 during 4 hours.

Statistics: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

IL: Interleukin ; AEC: Amnion Epithelial Cells ; FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1.

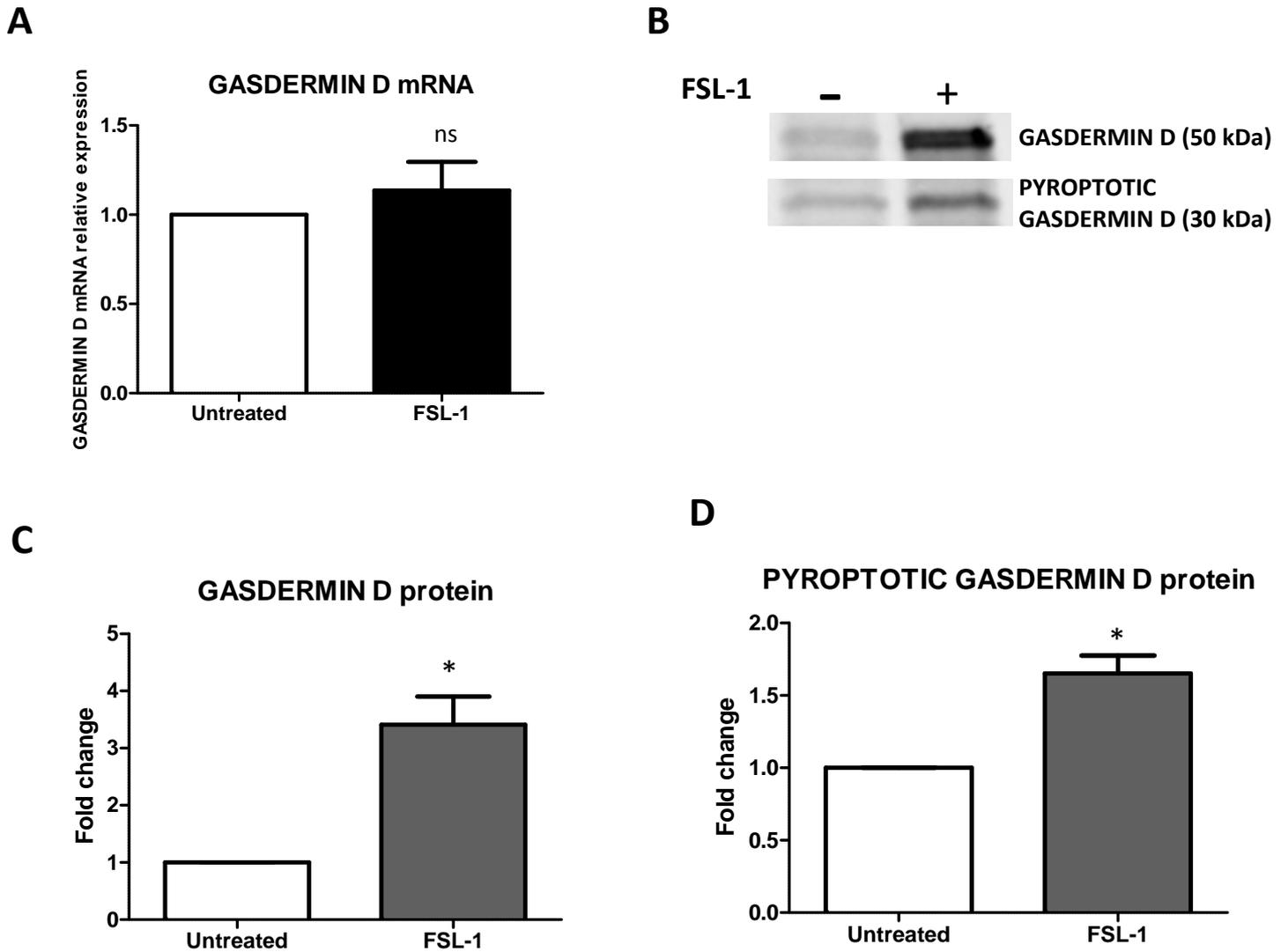


Figure 7: Gasdermin D protein is increased and processed in response to FSL-1 in AEC. Expression of Gasdermin D and its pyroptotic form was measured at transcript (A) and protein (B-D) levels with or without FSL-1 treatment, using RT-qPCR and Western blot, respectively. Representative Western Blot data are shown in B. Transcript and protein levels were evaluated 4 hours or 20 hours after 250ng/mL of FSL-1 exposition, respectively.

Statistics: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

AEC : Amnion Epithelial Cells ; FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1.

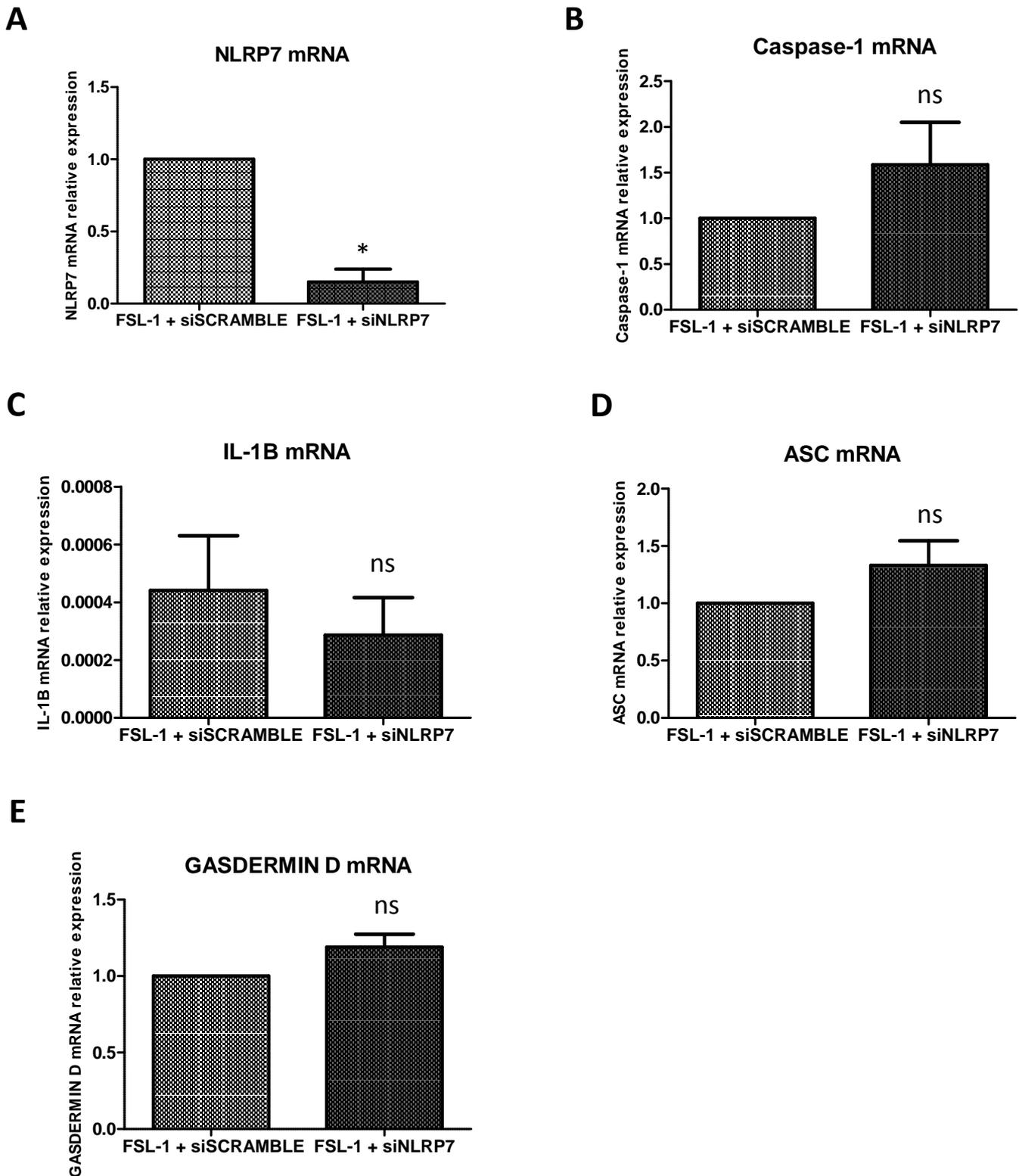


Figure 8: Caspase-1, IL-1 β , ASC and Gasdermine D transcript expression is independent of NLRP7. Transcript expression of NLRP7 (A), Caspase-1 (B), IL-1 β (C), ASC (D) and Gasdermin D (E) was measured in AEC treated or not with 250ng/mL of FSL-1 during 4 hours, after siSCRAMBLE or siNLRP7 transfection during 24 hours.

Statistics: non parametric T-test, Mann-Whitney test. ns: not significant ; * : p<0,05 ; ** : p<0,01.

NLRP: Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor, Pyrin domain containing ; IL: Interleukin ; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain ; AEC: Amnion Epithelial Cells ; FSL-1: Fibroblast-Stimulating Lipopeptide 1.

***RESULTATS
COMPLEMENTAIRES***

A

Gène humain	Séquence Sens (5'→3')	Séquence Anti-sens (5'→3')	Température d'hybridation pour la RT-PCR (°C)
NLRP1	AATAGCACATCCTCACTCAAGC	TGGGAAGATCTTGCTCACGTC	62
NLRP2	TAAACCTCTCCGACAATGAGC	ACACAGCAGCAAGGTCCTTG	61
NLRP3	TACTCAGCACTAATCAGAATCTC	AGGTCAGAAGTGTGGAAAGATC	62
NLRP4	TGAGACACCCAGAGTGTGCC	TGATGGTCAGGTTAGGATTTCTC	61
NLRP5	AGGCATGTGGACTGACTTCTG	TTGAGTAGCTGCACTTCTCC	61
NLRP6	TCTGCCGAGACCTTTCTGAGG	TGGGGGTCAGGCAGCTGTAC	62
NLRP7	TGCTGTACAAGACCATGACACG	ACTCAAGCCCTCACACAGAAAC	62
NLRP8	AGAGTAAGATGCTGACCCACC	AGCGCAGAGATCATATCCTGAC	61
NLRP9	ACTGGTGTGACAGAGTTATGTG	ACCACTGCATCAGCATCCAAG	61
NLRP10	AGCTCAGCCATATTTGTCTGC	TCCACCGTGACAGACTCCAG	61
NLRP11	AGCTGCTATGTGGTGGTTTGGAG	TGGGCTGATCAAGCTCTCAAG	61
NLRP12	AGGATGGATCTCAGTGGCAAC	TGCCGAGCACAGAAGCCATC	61
NLRP13	TCTGTTAGCAGTCACATCCTTG	TTCAGTGCAAGACAGAGACCC	61
NLRP14	AAAGCCTGGAGTGTGTCTCTC	ACTGCCTCCTGATCTTCTTGTG	61

B

Transcrits Tissus	NLRP													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Amnios à terme	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+
Chorion à terme	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+

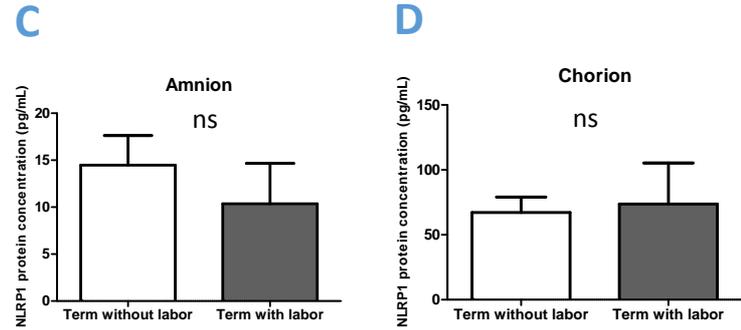
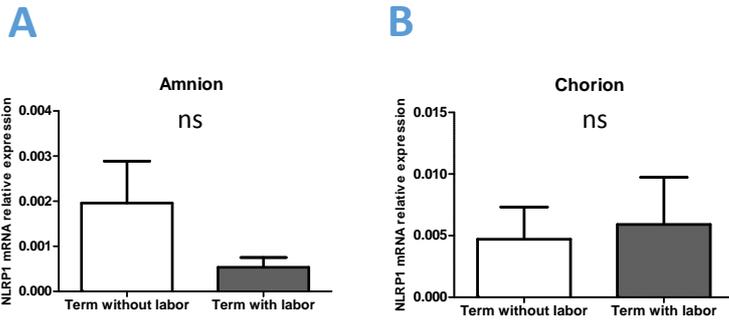
Tableau 3 : Résultats des RT-PCR pour l'expression des transcrits des quatorze gènes NLRP dans les membranes fœtales humaines à terme (B) obtenus grâce aux amorces spécifiques de chaque gène (A).

Les ARN totaux de l'amnios et du chorion, récoltés chez des femmes après un accouchement par césarienne à terme, ont été extraits grâce au RNazol®. Une Rétrotranscription (RT), via des amorces de type oligo-dT, a été effectuée afin d'obtenir les ADN complémentaires. Une PCR a ensuite été réalisée à partir de ces échantillons avec des couples d'amorces spécifiques de chaque NLRP (A). Une migration sur un gel d'agarose 2% des produits PCR amplifiés a permis de visualiser les transcrits pour chaque NLRP. Les symboles « + » et « 0 » indiquent que les transcrits sont présents ou absents, respectivement (B).

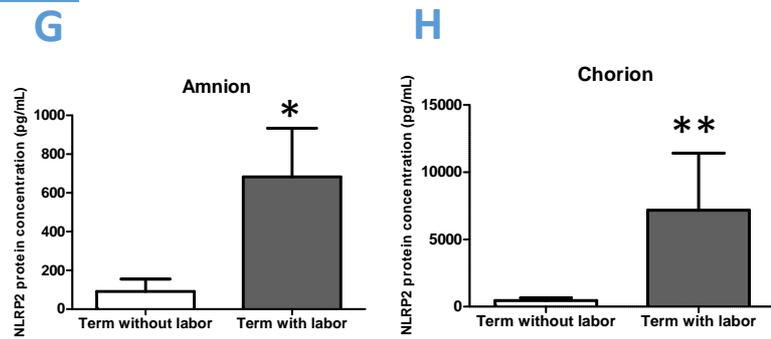
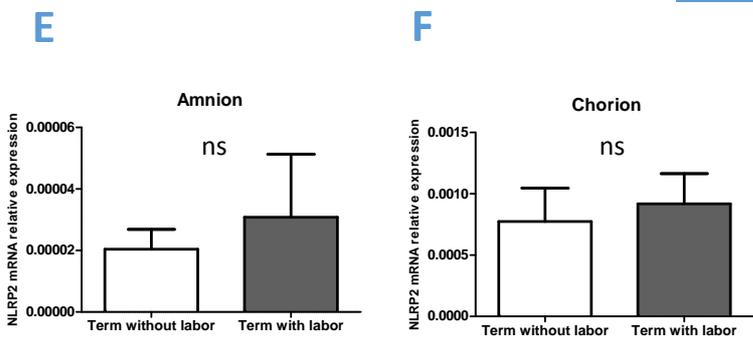
TRANSCRITS

PROTEINES

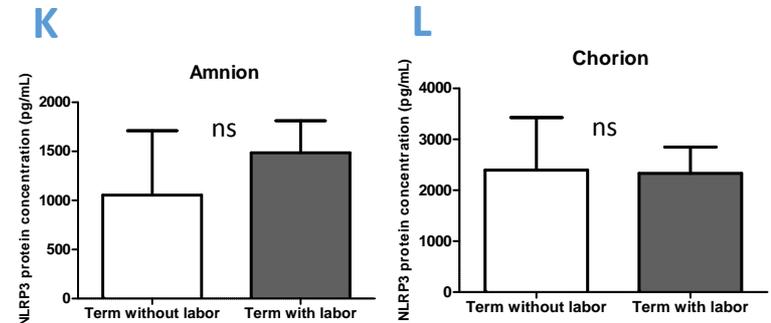
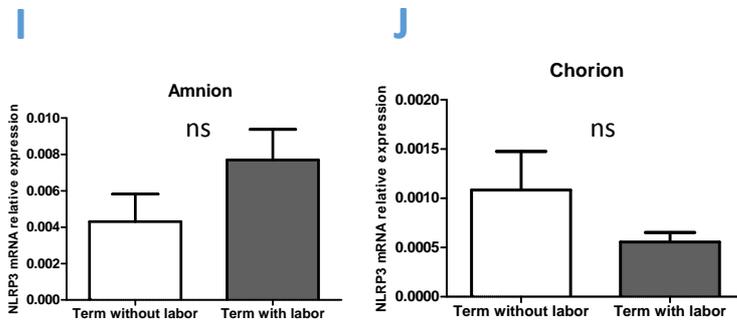
NLRP1



NLRP2



NLRP3



NLRP7

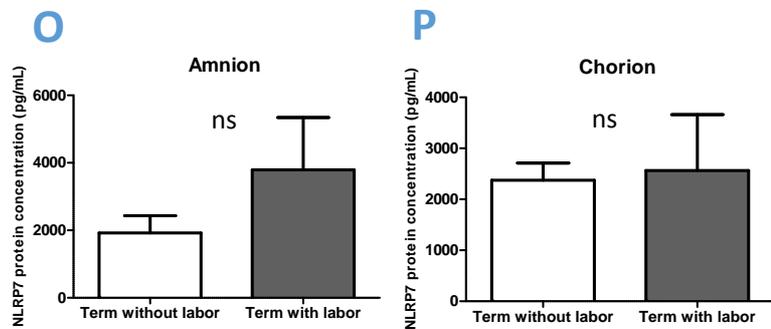
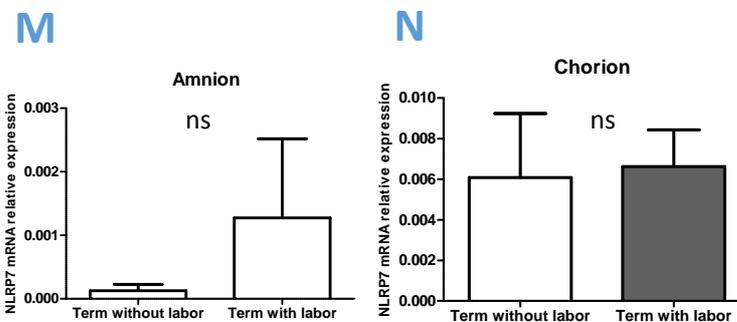


Figure 25 : Effet du travail sur l'expression des transcrits et protéines de NLRP1 (A-D), NLRP2 (E-H), NLRP3 (I-L) et NLRP7 (M-P) à terme dans l'amnios et le chorion.

La quantification des ARNm et protéines a été faite par RT-qPCR et tests ELISA, respectivement, à partir d'explants d'amnios et de chorion récoltés à terme avant travail (Term without labor, n=7) ou après travail (Term with labor, n=8).

Statistiques : T-test ; ns: non significatif ; *: p<0,05 ; **: p<0,01.

Au cours de ce travail de thèse, des travaux complémentaires ont été menés mais n'ont pas fait l'objet d'une publication car un approfondissement reste nécessaire pour valoriser au mieux ce travail. Néanmoins, les résultats préliminaires obtenus sont présentés ici et constituent des pistes pour de futurs travaux.

Profil d'expression des transcrits et protéines NLRP dans les membranes fœtales humaines à terme :

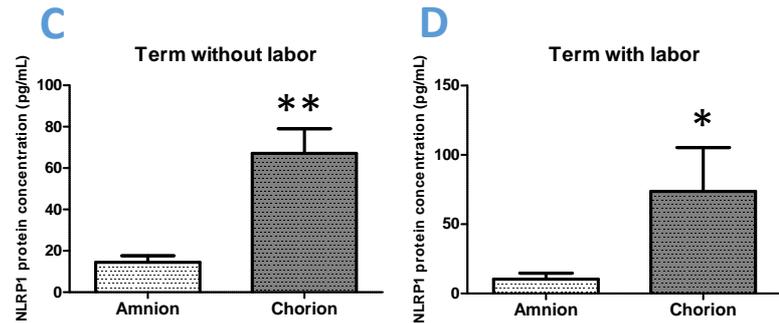
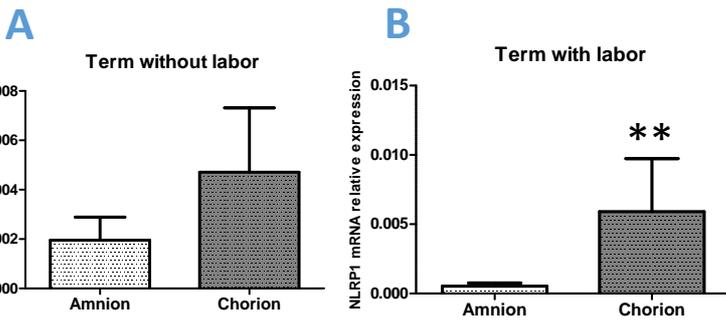
Dans le but de mieux caractériser les processus inflammatoires liés aux inflammasomes de type NLRP ayant lieu en fin de grossesse au sein des membranes fœtales, un des objectifs de ce travail de thèse a été d'identifier les NLRP exprimés dans les membranes fœtales à terme. Les transcrits des quatorze NLRP ont donc été recherchés par des expériences de RT-PCR dans l'amnios et le chorion à terme avant le travail, grâce à l'utilisation de couples d'amorces spécifiques (**Tableau 3 A**). Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 3 B**. Parmi les quatorze NLRP, neuf ont été détectés dans les membranes fœtales : NLRP1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12 et 14, sachant que le NLRP12 n'a été retrouvé que dans le chorion. Les transcrits des NLRP4, 5, 8, 11 et 13 ne sont pas présents dans les membranes fœtales à terme. Certains de ces résultats sont en accord avec ceux de Romero *et al.* qui avaient également détecté les transcrits de NLRP1 et NLRP3 dans les membranes fœtales humaines à terme (165). Parmi les neuf NLRP retrouvés dans les membranes fœtales, cinq ont été identifiés dans la littérature comme étant capables de former des inflammasomes chez l'Homme : il s'agit du NLRP1 (419), NLRP2 (642), NLRP3 (643), NLRP7 (453) et NLRP12 (644). Par la suite, un intérêt particulier a été porté aux NLRP1, 2, 3 et 7 car le NLRP12 n'est que faiblement exprimé dans les membranes fœtales. Ainsi, les profils d'expression des transcrits et protéines des NLRP1, 2, 3 et 7 ont été déterminés par RT-qPCR et tests ELISA, respectivement.

Dans un premier temps, et étant donné que le travail et l'accouchement sont caractérisés par des phénomènes inflammatoires importants (645), nous avons cherché à savoir si le travail a un impact sur l'expression des transcrits et protéines de NLRP1, 2, 3 et 7 dans les membranes fœtales (**Figure 25**), ce qui indiquerait leur potentielle implication dans ces phénomènes. La seule différence significative a été observée pour la protéine NLRP2 dont l'expression augmente avec le travail à terme. Il est à noter que cette différence n'est pas observée pour les transcrits de NLRP2. L'expression des transcrits et protéines de NLRP1, NLRP3 et NLRP7 ne varie pas avec le travail. La plupart de ces données indique donc que l'expression des NLRP étudiés ne semble pas être affectée par le travail. Toutefois, il apparaît essentiel d'augmenter un peu le nombre d'échantillons pour affiner ces résultats.

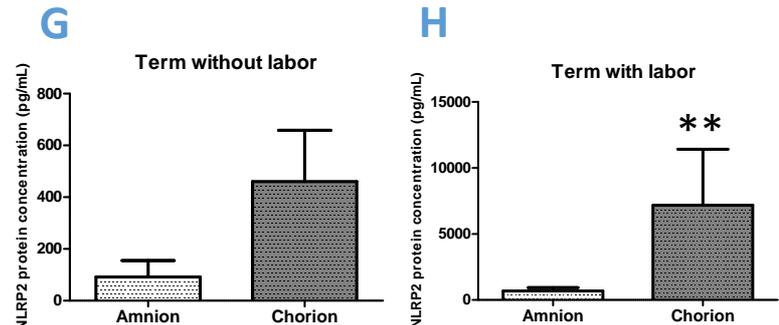
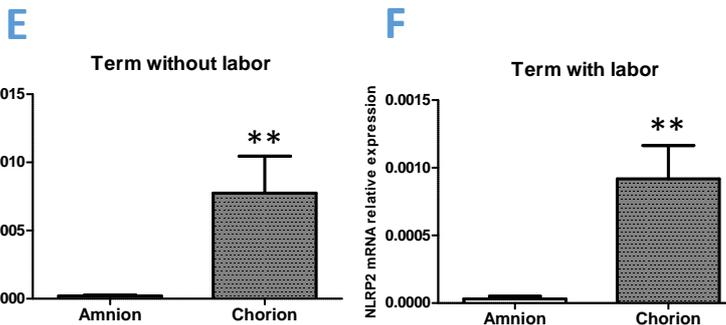
TRANSCRITS

PROTEINES

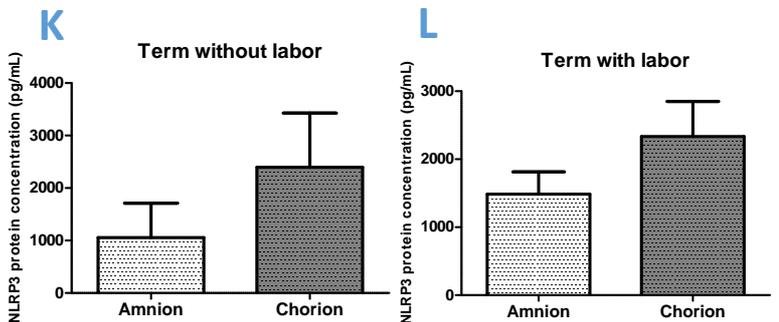
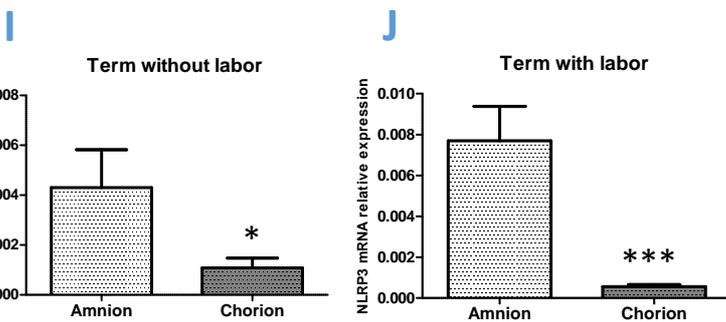
NLRP1



NLRP2



NLRP3



NLRP7

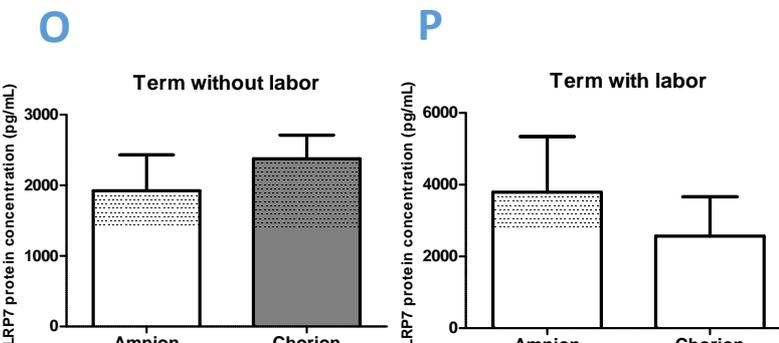
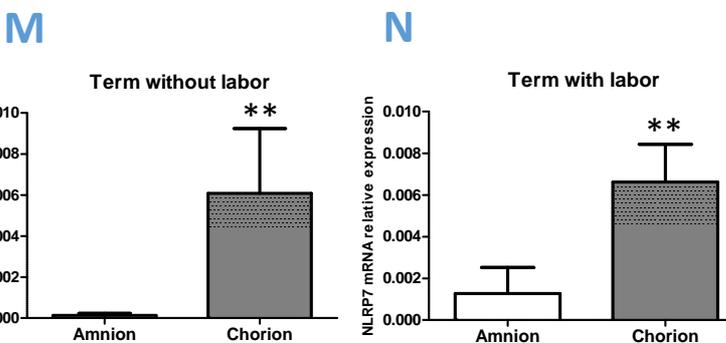


Figure 26 : Comparaison de l'expression des transcrits et protéines de NLRP1 (A-D), NLRP2 (E-H), NLRP3 (I-L) et NLRP7 (M-P) à terme entre l'amnios et le chorion.

La quantification des ARNm et protéines a été faite par RT-qPCR et tests ELISA, respectivement, à partir d'explants d'amnios et de chorion récoltés à terme avant travail (Term without labor, n=7) ou après travail (Term with labor, n=8).

Statistiques : T-test ; ns: non significatif ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à un pan relativement négligé de la littérature, en étudiant les différences existant entre l'amnios et le chorion. Les niveaux d'expression des transcrits et protéines de NLRP1, 2, 3 et 7 ont donc été quantifiés dans l'amnios et le chorion (**Figure 26**). De nombreuses différences d'expression ont été observées entre ces deux feuillets. Au niveau des transcrits, NLRP1, NLRP2 et NLRP7 sont plus exprimés dans le chorion par rapport à l'amnios, que les échantillons aient été récoltés avant ou après travail (sauf pour NLRP1 avant travail). Les transcrits de NLRP3, quant à eux, sont plus exprimés dans l'amnios que dans le chorion. Au niveau protéique, NLRP1 est également augmenté dans le chorion par rapport à l'amnios, avant et après travail, et le niveau de NLRP2 est plus élevé après le travail dans le chorion comparé à l'amnios. Les autres variations d'expression des transcrits observées entre les deux feuillets n'ont pas été retrouvées au niveau protéique. Là encore, une augmentation du nombre d'échantillons serait nécessaire afin de confirmer ces résultats. Ces premiers résultats nous permettent néanmoins de suggérer que des inflammasomes différents peuvent être mis en place dans l'amnios et le chorion à terme, en fonction de l'environnement auquel ces deux tissus sont exposés (*i. e.* le liquide amniotique pour l'amnios vs la décidue maternelle et le vagin pour le chorion) et donc en fonction des ligands pro-inflammatoires présents dans ces environnements. Ceci n'avait pour l'instant jamais été étudié dans la littérature.

En plus d'augmenter le nombre d'échantillons afin d'obtenir des résultats plus pertinents, des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour compléter ces travaux. En effet, afin de confirmer le rôle pro-inflammatoire des NLRP exprimés dans l'amnios et le chorion, la formation d'inflammasomes par ces NLRP devrait être attestée, par exemple par des expériences de co-immunoprécipitation ou de co-localisation par immunohistochimie entre un NLRP et l'ASC ou la caspase-1 que nous avons commencé à mettre au point. Il serait également intéressant de déterminer quel ligand endogène induit l'expression de chaque NLRP à terme et de mieux caractériser les voies de signalisation induites par ces ligands au sein des membranes fœtales. L'utilisation de cellules primaires, de lignées ou d'explants permettrait de répondre à ces questions. Enfin, à terme, l'un des objectifs de l'équipe est d'analyser l'expression et le rôle des NLRP en cas de pPROM, ce qui permettrait de mieux caractériser leur implication possible dans cette pathologie et éventuellement de développer des thérapies ciblant leurs voies de signalisation.

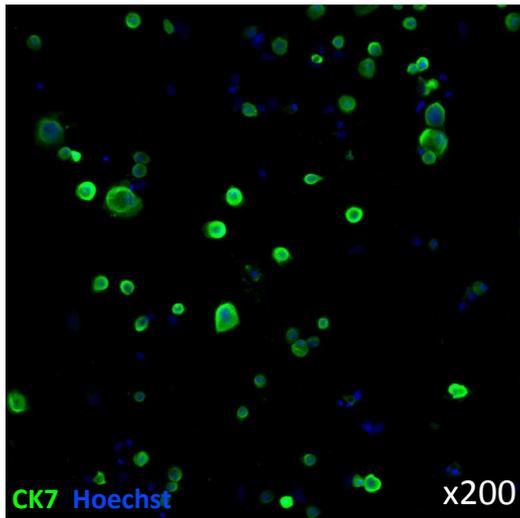
De par l'implication de la protéine NLRP7 dans certaines pathologies de la grossesse, mais aussi, l'absence d'études sur sa fonction au sein des membranes fœtales, notre intérêt s'est porté sur cette protéine et sa capacité à former un inflammasome dans les membranes fœtales humaines. Les transcrits et protéines de NLRP7 ont été retrouvés à terme dans l'amnios et le chorion, suggérant que NLRP7 joue un rôle dans ces deux feuillets. Nous avons commencé notre caractérisation de la fonction de NLRP7 au sein de l'amnios, via l'utilisation des cellules épithéliales amniotiques, et nous développons actuellement un outil pour l'étude de sa fonction dans le chorion, via l'immortalisation de trophoblastes chorioniques.

Immortalisation des trophoblastes chorioniques :

Pour étudier des mécanismes biologiques ayant lieu au sein des membranes fœtales, plusieurs outils peuvent être utilisés tels que les explants, les cellules primaires ou encore les lignées cellulaires. Les explants d'amnios, de chorion ou de membranes fœtales entières sont souvent utilisés (55,56,109,122,401). Ils présentent l'avantage de rendre compte de la réponse globale d'un tissu à un stimulus, même s'il y a quelques inconvénients comme la durée de culture courte et l'impossibilité d'utiliser la technique de transfection d'ARN interférents. En ce qui concerne les cellules, l'extraction et la culture de cellules épithéliales et mésenchymateuses amniotiques sont aujourd'hui bien mises au point et largement utilisées (108,125,132,180,585,646). De plus, il existe trois lignées de cellules épithéliales amniotiques humaines, les cellules WISH, AV3 et FL – mais elles sont peu utilisées – et une équipe japonaise a immortalisé des cellules mésenchymateuses (647). Du côté chorionique, l'extraction et la culture de cellules primaires mésenchymateuses et trophoblastiques ont été reportées dans quelques publications (59,108,648). En revanche, il n'existe toujours pas de lignées pour les cellules trophoblastiques des membranes fœtales. C'est pourquoi notre équipe met actuellement au point une lignée immortalisée de trophoblastes chorioniques.

La première étape a consisté à prélever les trophoblastes du chorion à partir d'un placenta récupéré à l'issue d'un accouchement par césarienne. Un protocole d'extraction des trophoblastes placentaires a été utilisé pour l'extraction des trophoblastes chorioniques. Ainsi, après plusieurs étapes de digestions enzymatiques de la chorioidécidue, les cellules récoltées ont été séparées selon leur densité grâce à un gradient de Percoll. Les cellules correspondant à la densité des trophoblastes ont été prélevées et lavées. Puis, afin d'éliminer les cellules déciduales éventuellement récoltées, une étape de purification a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été placées dans des boîtes de pétri recouvertes d'anticorps anti-HLA-A, anti-HLA-B et anti-HLA-C (Sigma-Aldrich, H1650) qui ont fixé et retenu spécifiquement les cellules déciduales.

A Cytokératine 7



B Vimentine

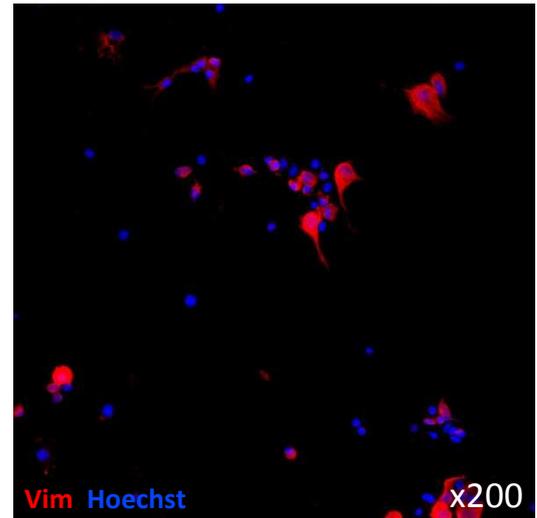


Figure 27 : Marquage des cellules avec des anticorps anti-cytokératine 7 (A) et anti-vimentine (B) après purification des trophoblastes.

Des anticorps anti-cytokératine 7 (A ; DAKO, M7018) et anti-vimentine (B ; Santa-Cruz Biotechnology, sc-6260), respectivement spécifiques des cellules épithéliales (dont les trophoblastes) et des cellules fibroblastiques et déciduales, ont été utilisés pour vérifier la purification des trophoblastes (A, cellules vertes). Malgré plusieurs étapes d'élimination des cellules déciduales avec les anticorps anti-HLA-A, B et C (Sigma-Aldrich, H1650), quelques cellules déciduales persistent (B, cellules rouges). Les noyaux ont été colorés grâce au colorant Hoechst (bleu). (Grossissement x200).

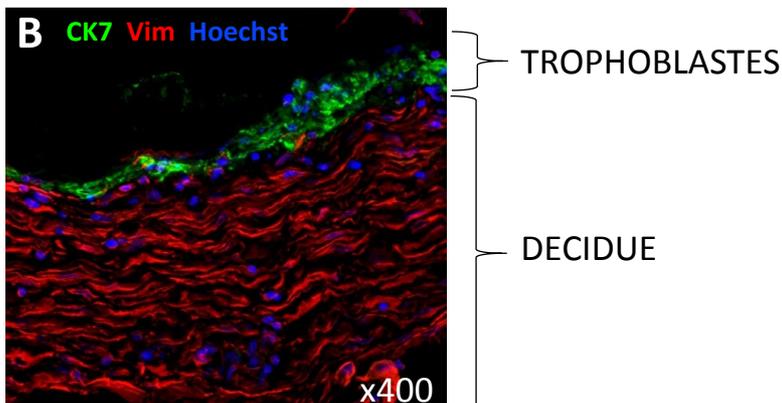
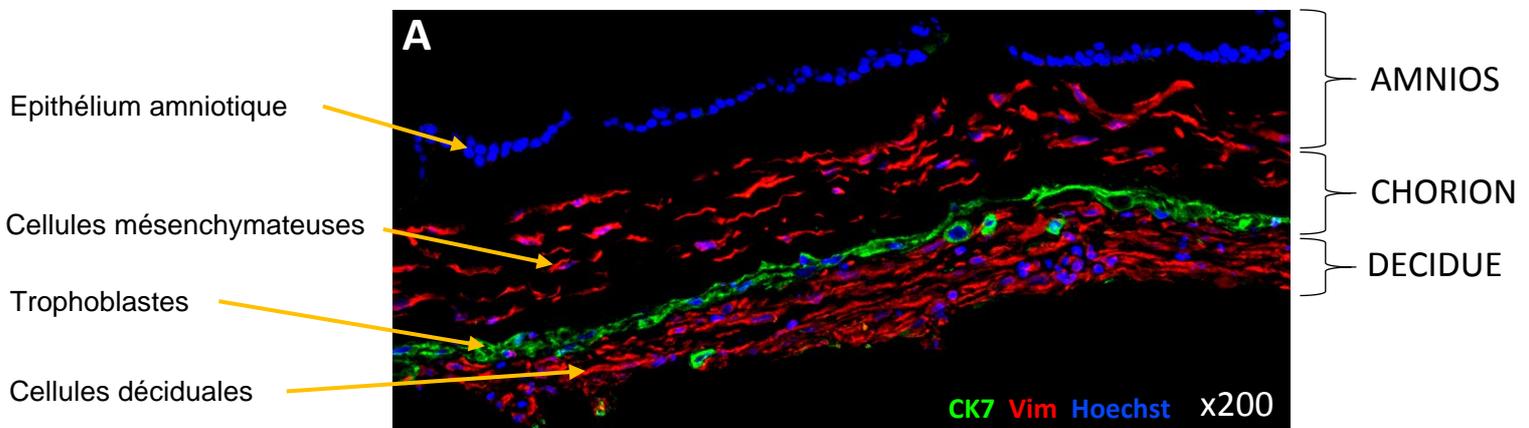


Figure 28 : Marquage d'une coupe de membranes fœtales (A) et de chorio-décidue (B) avec des anticorps anti-cytokératine 7 (vert) et anti-vimentine (rouge).

L'anticorps anti-cytokératine 7 (vert ; DAKO, M7018) permet de visualiser les trophoblastes chorioniques et l'anticorps anti-vimentine (rouge ; CELL Signaling Technology, D21H3) permet de visualiser la décidue et les cellules mésenchymateuses entre l'épithélium amniotique et les trophoblastes. Les noyaux ont été colorés grâce au colorant Hoechst (bleu). (Grossissements x200 (A) et x400 (B)).

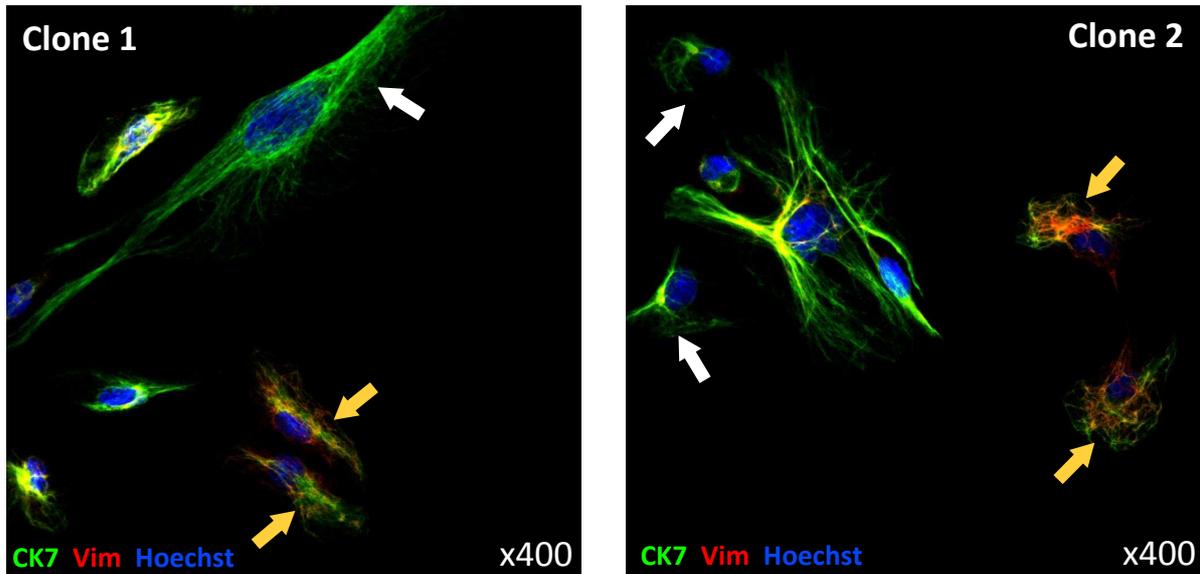


Figure 29 : Marquage avec des anticorps anti-cytokératine 7 (CK7, vert) et anti-vimentine (Vim, rouge) des cellules de deux clones obtenus après dilution limite et dosage de la β -HCG.

Des anticorps anti-cytokératine 7 (vert ; DAKO, M7018) et anti-vimentine (rouge ; CELL Signaling Technology, D21H3), respectivement spécifiques des cellules épithéliales (dont les trophoblastes) et des cellules fibroblastiques et déciduales, ont été utilisés pour déterminer la nature des cellules de clones sélectionnés après dilution limite et dosage de la β -HCG. Deux exemples de clones sont montrés ici. Les flèches blanches indiquent les cellules positives pour la cytokératine 7, soit les trophoblastes, et les flèches jaunes indiquent les cellules doublement marquées avec la cytokératine 7 et la vimentine. Les noyaux ont été colorés grâce au colorant Hoechst (bleu). (Grossissement x400).

Une expérience d'immunocytochimie a ensuite été effectuée afin de vérifier la pureté des cellules. L'utilisation d'anticorps anti-cytokératine 7 (spécifiques des cellules épithéliales, dont les trophoblastes) et anti-vimentine (spécifiques des fibroblastes et des cellules déciduales) nous a permis de nous rendre compte que, malgré plusieurs étapes de purification avec les anticorps anti-HLA-A, B et C, quelques cellules déciduales persistent (**Figure 27**). L'importante contamination par les cellules déciduales s'explique par deux raisons. D'une part, les trophoblastes ne représentent qu'une faible portion de cellules par rapport à l'ensemble des cellules de la choriodécidue. En effet, des coupes de membranes fœtales entières (**Figure 28 A**) et de choriodécidue (**Figure 28 B**) montrent que la couche de trophoblastes est très fine et contient peu de cellules par rapport à la décidue. D'autre part, contrairement à l'amnios et au chorion qui se séparent facilement l'un de l'autre, la décidue et le chorion constituent deux tissus fortement liés. Malgré la persistance de quelques cellules déciduales après les étapes de purification par les anticorps anti-HLA-A, B et C, nous avons fait le choix de mettre en culture les cellules récoltées et de les envoyer à une plateforme de l'UMR1089, à Nantes, pour l'immortalisation. En effet, notre objectif a été de limiter au maximum le nombre de passages afin de conserver au mieux les caractéristiques originelles des trophoblastes, qui seraient séparés des cellules déciduales par la technique de clonage par dilution limite.

A la réception des cellules immortalisées, la technique de clonage par dilution limite a donc été utilisée de façon à séparer les deux types cellulaires. Cette technique consiste à obtenir des clones cellulaires ayant poussé à partir d'une seule cellule, mais aucun clone n'a été obtenu au laboratoire. Nous avons donc augmenté le nombre de cellules par puits (dans le but de réaliser d'autres dilutions limites par la suite) et cette fois-ci, des clones ont été obtenus. Le dosage de l'hormone Chorionique Gonadotrope (β -HCG), spécifiquement sécrétée par les trophoblastes, nous a permis par la suite de sélectionner quelques clones contenant des trophoblastes. Des analyses d'immunocytochimie, avec les anticorps anti-cytokératine 7 et anti-vimentine, nous ont permis de constater que les clones sélectionnés contenaient bien des trophoblastes, mais aussi, de façon plus surprenante, des cellules ayant un double marquage cytokératine 7 et vimentine (**Figure 29**).

Ce double marquage peut être le signe d'un changement de caractéristique cellulaire. Un co-marquage de cytokératines et de la vimentine a été identifié dans des cellules d'origine trophoblastique chez le lapin (649), la chauve-souris (650) et la souris (651,652), et dans ces études la présence de la vimentine a été associée à des propriétés invasives. De plus, il est aujourd'hui bien connu que des phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ont lieu au cours du développement cancéreux et impliquent la présence de la vimentine (653–655). Nous pouvons ainsi supposer qu'une TEM ait eu lieu dans les cellules issues des clones étudiés, c'est-à-dire dans ce cas une transition d'une cellule trophoblastique à une cellule

mésenchymateuse. Il est à noter que le processus d'immortalisation lui-même peut induire de la TEM (656). Une transition mésenchymo-épithéliale (TME) a pu également avoir eu lieu dans les clones analysés, c'est-à-dire ici une transition d'une cellule déciduale vers une cellule épithéliale. En effet, Zhang *et al.* ont montré que des cellules mésenchymateuses utérines de souris subissent une TME au cours de la décidualisation *in vitro*. Ces cellules perdent l'expression de la vimentine et expriment des cytokératines (657).

Les passages cellulaires successifs des clones ont révélé une contamination de plus en plus importante par les cellules doublement marquées par la cytokératine 7 et la vimentine. Ceci suggère une instabilité des cellules en culture qui subissent une TEM ou une TME active, ou bien, il y a une différence de la vitesse de division entre les trophoblastes immortalisés et les cellules contaminantes. Les investigations sur la purification et la culture des trophoblastes immortalisés sont donc à poursuivre. La cytométrie en flux permettrait par exemple d'éliminer les cellules déciduales grâce au marquage des protéines HLA-A, B et C (mais seulement si elles ont gardé ces caractéristiques).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'enrichir les connaissances disponibles sur les mécanismes inflammatoires dépendant des inflammasomes et ayant lieu au sein des membranes fœtales humaines. Les données obtenues sont discutées ici, ainsi que les questions qu'elles soulèvent et les investigations supplémentaires qui pourraient être menées pour compléter ces données.

1. Expression d'acteurs de l'inflammation dans les cellules épithéliales amniotiques

La mobilisation de l'inflammasome NLRP7 dans les cellules épithéliales amniotiques (AEC) a particulièrement fait l'objet d'attention au cours de ce travail de thèse. Notre étude a montré pour la première fois qu'en présence du ligand pro-inflammatoire FSL-1, la transcription de NLRP7, Caspase-1 et IL-1 β est stimulée dans les AEC. Ceci constitue l'étape de priming transcriptionnel, un processus notamment bien décrit pour l'inflammasome NLRP3 (479), au cours duquel certains acteurs de la réponse cellulaire sont transcrits. La transcription d'ASC, quant à elle, diminue, ce qui est en désaccord avec de nombreuses études similaires dans lesquelles la transcription augmente ou reste inchangée en réponse à un ligand pro-inflammatoire (478,480–484). Une quantification précoce des transcrits d'ASC pourrait expliquer ces résultats (quantification 4 heures après le traitement FSL-1 contre 6 à 18 heures dans d'autres travaux). Une autre hypothèse serait que FSL-1 entrave l'expression d'ASC. Ce type de mécanisme a déjà été montré dans une étude américaine dans laquelle la bactérie intracellulaire *Legionella pneumophila* induit une diminution du niveau protéique d'ASC dans des monocytes humains afin de limiter la défense de l'hôte. Les auteurs ont montré que cet effet est annihilé si ASC est exprimé sous la dépendance d'un promoteur insensible à *L. pneumophila* (658).

Au niveau protéique, nos expériences ont montré que la protéine ASC est présente dans la cellule en l'absence de stimuli pro-inflammatoire et que sa quantité augmente en présence de FSL-1. L'enrichissement en protéines ASC en présence d'un stimulus pro-inflammatoire a d'ailleurs été reporté dans d'autres études similaires (480,659–662). Ces données pourraient ainsi indiquer que la protéine ASC est présente à un niveau basal dans la cellule AEC et que sa quantité est régulée par une dégradation constante, celle-ci étant inhibée lors d'une stimulation par un ligand pro-inflammatoire, de façon à augmenter la quantité de protéines ASC disponibles dans le cytosol pour répondre à la stimulation. Ce type de régulation a déjà été montrée pour la protéine NLRP7 elle-même (607).

La voie de signalisation intracellulaire menant à la transcription de NLRP7, caspase-1 et IL-1 β n'a pas été analysée ici. La voie NF- κ B est couramment impliquée dans l'étape de priming transcriptionnel de la voie canonique des inflammasomes. En plus de ce facteur de

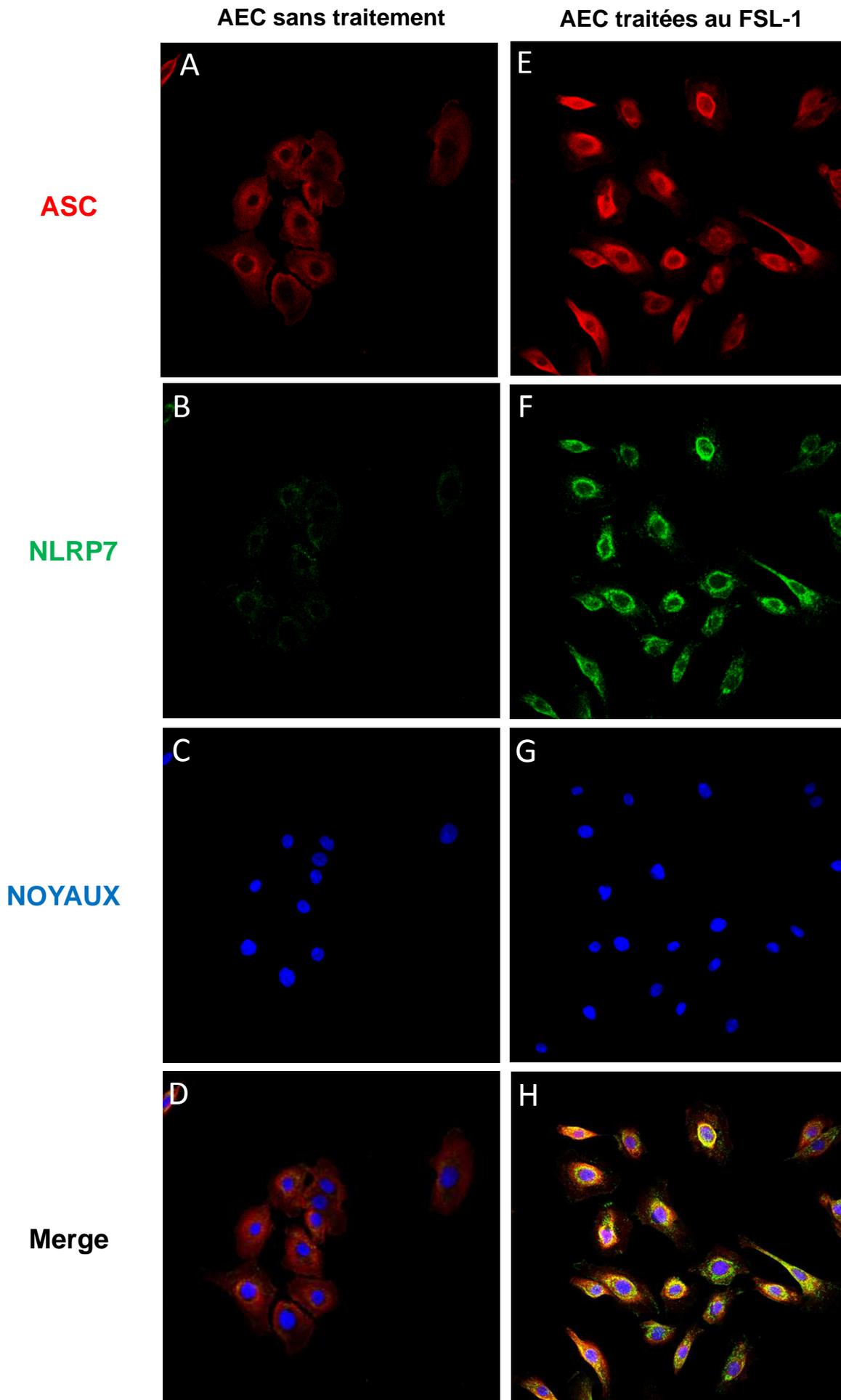


Figure 30 : Assemblage de l'inflammasome NLRP7 dans les AEC.

Les AEC non traitées (A-D) ou traitées avec FSL-1 (E-H) durant 20H ont été fixées avec du paraformaldéhyde. L'utilisation d'anticorps anti-ASC (rouge) et anti-NLRP7 (vert) a permis de visualiser respectivement ASC et NLRP7 dans les AEC. Les noyaux ont été colorés grâce au colorant Hoechst (bleu). (Grossissement x400).

transcription, le priming dépend aussi d'autres protéines intracellulaires telles que la caspase-8 et les adaptateurs protéiques Myd88, TRIF, TRAF6 et FADD (465,479,663). L'équipe de M. Lappas a montré que FSL-1 induit la transcription et la production de facteurs pro-inflammatoires et pro-travail sous la dépendance des protéines Myd88, TRAF6 et NF- κ B dans des cellules myométriales (637). De plus, d'autres travaux ont montré que la réponse cellulaire mise en place après un traitement par FSL-1 implique entre autres Myd88, TRIF et NF- κ B (664,665). Ainsi, nous pourrions envisager que certains de ces facteurs soient impliqués dans la réponse transcriptionnelle des AEC stimulées avec FSL-1. Afin de vérifier l'activation du facteur NF- κ B dans les AEC, la phosphorylation de son inhibiteur I κ B (par Western Blot) ou la translocation de NF- κ B dans le noyau (par Western Blot ou immunocytochimie) pourraient être étudiées. Des ARN interférents dirigés contre les protéines intracellulaires adaptatrices citées précédemment pourraient également être utilisés pour vérifier leur implication ou non dans la réponse des AEC au ligand FSL-1.

2. Assemblage de l'inflammasome NLRP7 dans les AEC

L'assemblage d'un inflammasome est souvent présenté comme un « speck », soit un point unique dans la cellule (585,666,667). Cependant, dans la littérature, il a également été montré que les acteurs d'un inflammasome s'assemblent tout autour du noyau de la cellule après une stimulation par un ligand pro-inflammatoire (585,668), ce qui est le cas dans notre étude. En effet, dans les AEC, le ligand FSL-1 induit d'une part la relocalisation de la protéine ASC du cytosol vers la région périnucléaire, et d'autre part, la co-localisation de ASC et NLRP7 (**Figure 30**). La localisation subcellulaire des acteurs de l'inflammasome autour du noyau suggère que ces protéines puissent interagir avec des organites, nécessaires à leur fonctionnement. En effet, il a notamment été montré que NLRP7 co-localise avec l'appareil de Golgi et le Centre Organisateur des Microtubules dans des cellules mononucléées du sang périphérique, les auteurs ayant ainsi suggéré un rôle de NLRP7 dans la sécrétion de cytokines (603). Ajouté à cela, de plus en plus de travaux montrent un rôle des mitochondries (situées à proximité du noyau) dans l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (669–675).

Afin de confirmer l'interaction entre NLRP7 et ASC dans les AEC, la technique de co-immunoprécipitation pourrait être utilisée. Cette expérience a été testée au laboratoire et demande encore une amélioration importante du protocole. Enfin, pour vérifier si ces protéines co-localisent avec la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique, une immunocytochimie pourrait être réalisée avec des marqueurs spécifiques de ces organites.

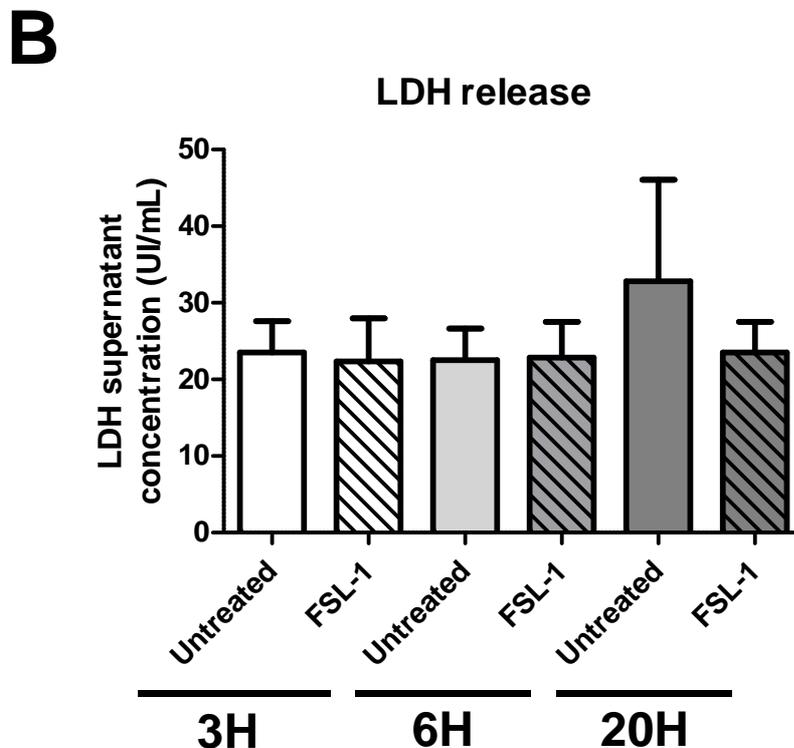
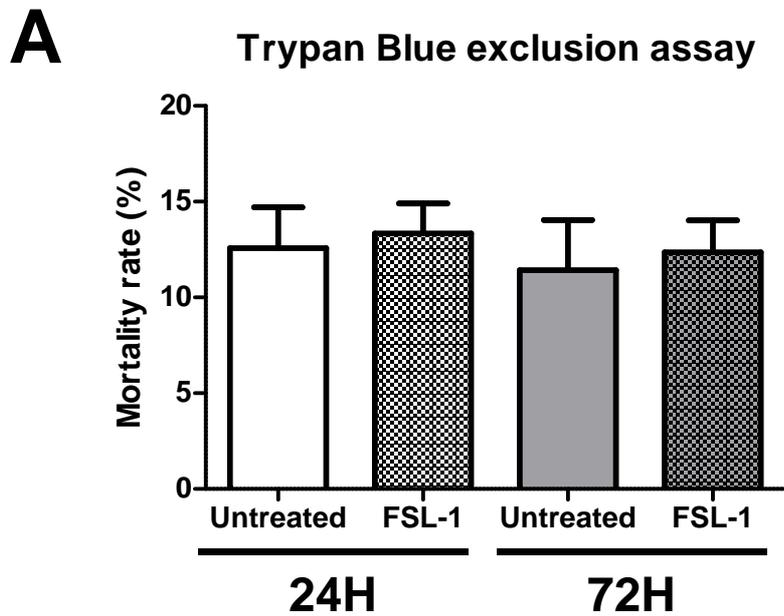


Figure 31 : Mesure de la mortalité cellulaire des AEC par coloration au bleu Trypan (A) et dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) (B).

- (A) Les AEC ont été traitées ou non avec FSL-1 pendant 24 heures ou 72 heures. L'ensemble des cellules (*i. e.* les cellules présentes dans le surnageant et les cellules adhérentes) ont ensuite été récoltées et incubées avec du bleu Trypan. Les cellules bleues (mortes) et les cellules blanches (vivantes) ont été comptées sous microscope et le taux de mortalité a été calculé comme suit : $[(\text{nombre de cellules mortes} \times 100) / \text{nombre total de cellules}]$. $n=4$.
- (B) Les AEC ont été traitées ou non avec FSL-1 pendant 3, 6 ou 20 heures. Les milieux de culture ont été récoltés puis centrifugés 15 minutes à 1500 tours/minute pour éliminer les débris cellulaires. La LDH a été dosée dans le surnageant. $n=3$.

3. Le devenir des AEC et la propagation de la réponse inflammatoire

La formation d'un inflammasome à la suite d'une stimulation par un ligand pro-inflammatoire conduit à la maturation de la caspase-1. Nos analyses ont montré d'une part un enrichissement pour la pro-caspase-1 avec le traitement FSL-1, et d'autre part, un enrichissement de la forme intermédiaire (p35) de la caspase-1, celle-ci étant la plus forme la plus active selon les derniers travaux de Boucher *et al.* (463). Il est toutefois nécessaire de confirmer l'implication de l'inflammasome NLRP7 dans la maturation de la caspase-1, par exemple via l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre NLRP7 ; ces analyses étant en cours dans notre laboratoire.

De plus, à l'aide d'un kit de la société Promega (Caspase-Glo® 1 Inflammasome assay, G9951), nous avons essayé de mesurer l'activité de la caspase-1 dans les AEC traitées ou non avec FSL-1, mais sans succès. Ce kit a aussi été utilisé pour mesurer l'activité de la caspase-1 dans des explants de membranes fœtales à terme, sans succès également puisque les résultats obtenus se sont révélés non reproductibles. Ainsi, pour pallier ces difficultés, le protocole d'utilisation de ce kit pourrait être amélioré, ou bien, l'activité de la caspase-1 pourrait être quantifiée à l'aide d'un kit basé sur une autre méthode. En effet, le kit de Promega est basé sur la méthode de chimioluminescence mais d'autres kits, basés par exemple sur une méthode colorimétrique, sont disponibles.

L'activation d'inflammasomes dans une cellule induit sa mort par pyroptose. Nous avons donc vérifié si le pourcentage de mortalité cellulaire des AEC augmente avec le traitement FSL-1 par un comptage des cellules mortes colorées au bleu Trypan (n=4). Contrairement à nos attentes, le taux de mortalité des AEC ne varie pas avec le traitement FSL-1, que les cellules aient été traitées 24 ou 72 heures avec le ligand (**Figure 31 A**). Ces résultats peuvent s'expliquer par la méthode choisie ici pour déterminer le taux de mortalité cellulaire qui est relativement approximative. La technique plus précise du dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) dans les milieux de culture d'AEC a donc été utilisé et, comme pour la coloration au bleu Trypan, n'a montré aucune différence avec ou sans FSL-1 (n=3) (**Figure 31 B**). D'autres techniques existent pour déterminer la viabilité des cellules, par exemple le test au Tétrazolium de Méthyle (MTT). Cependant, il est important de noter qu'aucune technique d'évaluation de la mortalité cellulaire n'est spécifique de la pyroptose, malgré le fait que de nombreux auteurs utilisent dans leurs travaux le dosage de la LDH pour évaluer la pyroptose (472,606,676–678).

Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les pores de gasdermine D ne sont pas formés à la membrane plasmique des AEC. En effet, le traitement des AEC avec FSL-1 induit bien une accumulation plus importante de la protéine gasdermine D et de son

fragment pyroptotique, mais le devenir de ce fragment n'a pas été étudié. La formation de pores membranaires pourrait être visualisée grâce à un microscope électronique ou un microscope à force atomique, comme cela a été fait dans d'autres travaux (679,680). La présence des fragments pyroptotiques à la membrane plasmique pourrait également être vérifiée par des expériences d'immunocytochimie ou Western Blot (après une centrifugation différentielle des lysats cellulaires pour isoler les structures membranaires).

De plus, plusieurs travaux ont montré que la pyroptose n'est pas une conséquence obligatoire de la formation de pores de gasdermine D. En effet, la cellule peut être dans un état dit « hyperactivé » au cours duquel les pores de gasdermine D sont formés à la membrane plasmique – permettant la libération modérée de cytokines – mais ne conduisent pas à la mort de la cellule par pyroptose (503,681–684). Evavold *et al.* ont également montré que, dans cet état hyperactivé, la LDH ne peut pas passer au travers des pores formés par la gasdermine D car c'est une enzyme tétramérique de poids moléculaire trop important (503). Nos résultats concernant l'évaluation de la mort cellulaire pourraient donc être le reflet de ce mécanisme d'hyperactivation sans pyroptose.

Enfin, il est à noter qu'une vérification de l'implication de la caspase-1 dans le clivage de la gasdermine D serait nécessaire, par exemple grâce à l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la caspase-1 ou d'un inhibiteur de cette caspase.

La mise en place d'inflammasomes suite à une stimulation par un ligand pro-inflammatoire conduit à la production et la sécrétion des interleukines IL-1 β et IL-18. Notre étude a montré que l'expression des transcrits de IL-1 β est augmentée dans les AEC avec le traitement FSL-1, mais pas celle de IL-18. Ces données sont en accord avec d'autres travaux réalisés sur les membranes fœtales. En effet, une stimulation d'explants de membranes fœtales humaines ou murines avec du LPS conduit à une augmentation de l'expression du transcrit de IL-1 β mais pas de IL-18 (589,685). De plus, la transcription de IL-1 β est augmentée dans les membranes fœtales avec le travail à terme alors que ce n'est pas le cas pour IL-18 (165). Ainsi, l'augmentation de l'expression des transcrits de IL-1 β au sein des membranes fœtales est retrouvée dans des conditions physiologiques (travail à terme) et pathologiques (stimulation par le LPS ou FSL-1).

L'analyse protéique des interleukines est en cours au laboratoire. Le dosage des interleukines IL-1 β et IL-18 dans les milieux de culture d'AEC traitées ou non avec FSL-1 a été testé par ELISA mais les interleukines n'ont été détectées dans aucune condition (n=3). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les interleukines ne sont pas maturées et/ou sécrétées par les AEC traitées avec le ligand FSL-1. Une autre possibilité est que la

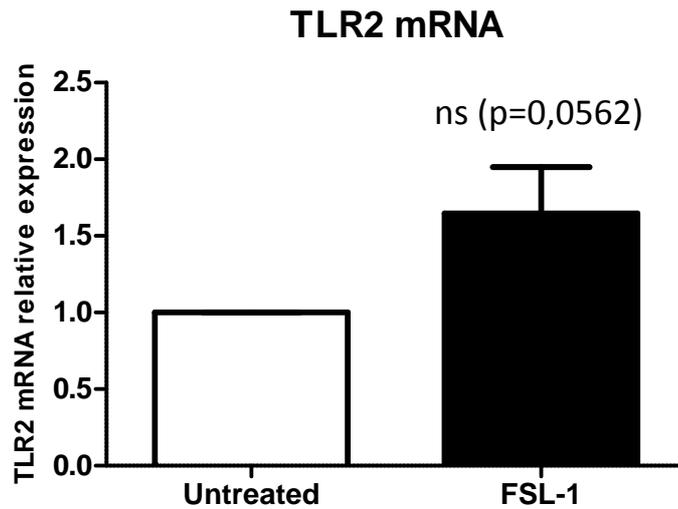


Figure 32 : Expression des transcrits de TLR2 dans les AEC traitées ou non avec le ligand FSL-1.

Les AEC ont été traitées ou non avec le ligand FSL-1 durant 4 heures. Après l'extraction des ARNm et une Rétrotranscription (RT), la quantification des ARNm a été effectuée par qPCR (n=6).

Statistiques : T-test ; ns: non significatif ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

quantité d'interleukines sécrétées est trop faible pour être détectée par le test ELISA. En effet, Evavold *et al.* ont montré que la quantité d'interleukines libérées par des cellules hyperactivées est moindre par rapport à la quantité d'interleukines libérées en cas de pyroptose (et donc de rupture de la membrane plasmique) (503).

Seules les interleukines IL-1 β et IL-18 ont fait l'objet d'attention dans ce travail, mais il a été montré que, dans divers types cellulaires, FSL-1 induit la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8, TNF- α , CCL20, la Protéine 1 Chimioattractante des Monocytes (MCP-1) ou encore le Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et de Macrophages (GM-CSF) (635,686–688). Des investigations supplémentaires pourraient donc être menées afin de compléter nos données concernant les cytokines produites et sécrétées par les AEC, par exemple via l'évaluation de la transcription des cytokines par qPCR ou encore le dosage des cytokines sécrétées dans le milieu par multiplex.

Enfin, notre étude monocellulaire ne nous permet pas d'évaluer les effets de la sécrétion de cytokines par les AEC sur les cellules du système immunitaire. Pour pallier ce problème, diverses solutions sont envisageables telles que la co-culture d'AEC avec des cellules immunitaires, ou bien, la culture de cellules immunitaires avec du milieu conditionné issu de culture d'AEC.

4. Etude mécanistique de l'inflammasome NLRP7 grâce au ligand FSL-1

Khare *et al.* ont identifié le ligand FSL-1 comme un activateur spécifique de l'inflammasome NLRP7, dépendant du récepteur TLR2, dans les monocytes et macrophages (453). Des travaux complémentaires ont montré que l'hétérodimère TLR2/TLR6 accentue fortement la réponse cellulaire induite par FSL-1, par rapport au récepteur TLR2 seul (635,689,690). L'expression des transcrits du récepteur TLR2 a donc été étudiée dans les AEC traitées avec FSL-1 durant quatre heures et nous avons pu observer une tendance à l'augmentation d'expression des transcrits de TLR2 sans pour autant atteindre la significativité statistique ($p=0.0562$; $n=6$) (**Figure 32**). Une augmentation du nombre d'échantillons ou une quantification plus tardive de ces transcrits nous permettrait sûrement d'obtenir des résultats significatifs. La quantification des transcrits de TLR6 est en cours au laboratoire et complètera ces résultats. De plus, il serait nécessaire de vérifier l'implication de TLR2 et TLR6 dans la réponse des AEC stimulées avec le FSL-1, en utilisant par exemple des ARN interférents dirigés contre ces récepteurs ou des inhibiteurs.

L'équipe de K. Shibata a constaté que, dans des macrophages de souris, le FSL-1 est internalisé via l'endocytose dépendante des clathrines pour être dégradé par les lysosomes

(691,692). Le devenir de FSL-1 n'a pas été analysé dans les AEC mais pourrait également être étudié ici grâce au marquage de ce ligand par un fluorochrome, permettant de le tracer dans la cellule.

L'internalisation de FSL-1, démontrée par l'équipe de K. Shibata, est un processus qui n'implique pas TLR2 mais dépend des récepteurs CD14 et CD36 (691,692). De plus, des macrophages ayant une mutation pour le gène CD36 ne répondent plus au ligand MALP-2, un peptide diacylé dont la structure est très proche de celle de FSL-1 (693). Ces données suggèrent donc qu'en plus des récepteurs TLR2/TLR6, les récepteurs CD14 et CD36 sont nécessaires pour la réponse cellulaire face à une stimulation par un lipopeptide diacylé. Après une vérification de l'expression de CD36 et CD14 dans les AEC, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre ces récepteurs, ou de molécules bloquant ces récepteurs, pourraient nous permettre de vérifier leur implication dans la réponse des AEC au ligand FSL-1.

Enfin, Khare *et al.* ont démontré que le ligand MALP-2 induit la sécrétion de IL-1 β sous la dépendance de la protéine NLRP7 (453). MALP-2 pourrait donc également être un bon outil pour l'étude de l'inflammasome NLRP7. Cependant, même si la structure de MALP-2 est très proche de celle de FSL-1, la séquence et la longueur de la partie protéique diffèrent entre ces deux lipopeptides ce qui conduit, selon une étude de l'équipe de K. Shibata, à une plus faible activité de MALP-2 par rapport à FSL-1 dans des cellules HEK293 et THP-1 (635).

5. *Mycoplasma salivarium* et *Mycoplasma fermentans*, deux nouveaux mycoplasmes identifiés dans les membranes fœtales humaines

La rupture physiologique des membranes fœtales est la conséquence de nombreux mécanismes, dont l'inflammation stérile, induite par des ligands pro-inflammatoires endogènes. La rupture pathologique des membranes fœtales survient quant à elle suite à une inflammation septique (même si l'inflammation stérile intervient également dans le processus inflammatoire suite aux dommages tissulaires causés par l'inflammation septique). L'inflammation septique des membranes fœtales est causée par des agents pathogènes, comme les mycoplasmes, dont certains ont été identifiés dans la sphère placentaire (336–344). Notre étude a permis d'identifier deux nouveaux mycoplasmes dans les membranes fœtales humaines, *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma salivarium*, ce dernier étant susceptible d'activer l'inflammasome NLRP7 puisque le ligand FSL-1 dérive d'une de ses lipoprotéines (633). *M. fermentans* pourrait également activer l'inflammasome NLRP7 dans les membranes fœtales étant donné que le ligand MALP-2, évoqué précédemment, dérive d'une lipoprotéine de ce mycoplasme (634).

M. fermentans a été retrouvé au niveau des articulations et des systèmes respiratoire et urogénital où il a été associé à l'arthrite rhumatoïde et des infections. *M. salivarium*, quant à lui, est un mycoplasme principalement retrouvé dans la sphère orale (694–697). La présence de *M. salivarium* dans les membranes fœtales analysées ici peut avoir deux explications : (i) les mycoplasmes peuvent avoir été transportés de la sphère orale jusqu'à la sphère placentaire via le système sanguin, ou bien, (ii) ces mycoplasmes peuvent avoir contaminé le tractus génital de la femme enceinte suite à la pratique de sexe oral avec son partenaire. En effet, de nombreuses études ont montré que des infections de la sphère orale chez la mère, ou bien, la détection de bactéries du microbiote oral au niveau de la sphère placentaire, sont associées à des pathologies obstétricales telles que la pPROM, le travail avant terme et l'accouchement prématuré (698–707). Ces données ont été corroborées par des études sur des modèles murins d'infections de la sphère orale (703,708,709) et des études cellulaires ont suggéré une implication du récepteur TLR2 dans la sécrétion de cytokines induite par des bactéries du microbiote buccal (703,704). Ainsi, dans le but de mieux comprendre l'étiologie de certaines pathologies de la grossesse comme la pPROM ou la chorioamniotite, il semblerait intéressant de tester la présence de *M. salivarium* et *M. fermentans* dans les membranes fœtales et/ou le liquide amniotique de patientes subissant ces complications. En effet, ces deux mycoplasmes n'ont jamais été recherchés dans ces contextes (sauf dans un article pour *M. fermentans* (344)).

Enfin, dans notre étude, *M. salivarium* et *M. fermentans* ont été détectés dans les membranes fœtales issues de femmes ayant accouché à terme par voie basse ou par césarienne, sans aucune anomalie. Ceci indique que certaines femmes sont des porteuses saines de ces deux mycoplasmes. Nous pourrions ainsi supposer que *M. salivarium* et *M. fermentans*, ainsi que d'autres mycoplasmes présents dans le tractus génital féminin, puissent contribuer de manière normale à la rupture des membranes fœtales humaines en fin de grossesse, en mettant éventuellement en jeu l'inflammasome NLRP7.

6. Les limites techniques, les intérêts thérapeutiques et les perspectives à long terme de l'étude

Il est important de préciser que quelques limites techniques ont été rencontrées au cours de ce travail. La première limite technique concerne le faible nombre de membranes fœtales disponibles et répondant à nos critères de sélection (par exemple : membranes fœtales issues d'accouchements à terme par césariennes prévues, grossesse singleton uniquement, absence d'infection par le VIH ou les virus de l'hépatite, pas de maladie chronique chez la mère, pas de chorioamniotite, pas de diabète gestationnel). De même, aucune

information n'est connue concernant l'ethnie des patientes, leur consommation ou non de cigarettes ou de drogues pendant la grossesse, leur indice de masse corporelle ou des complications éventuellement survenues lors de précédentes grossesses. Or, ces facteurs sont connus pour avoir un impact sur les membranes fœtales. Une autre difficulté pour l'étude de l'inflammasome NLRP7 concerne l'impossibilité d'utiliser le modèle murin chez qui le gène NLRP7 est absent. Cependant, une surexpression ectopique du gène NLRP7, par exemple via la transfection transitoire de vecteurs d'expression, pourrait être une solution pour remédier à ce problème.

De plus, dans le but de développer des outils pour l'étude de l'inflammasome NLRP7 dans les cellules amniotiques, nous avons commencé à mettre au point un modèle d'inactivation génique de NLRP7 dans une lignée de cellules épithéliales amniotiques WISH grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Les investigations sont actuellement toujours en cours. Enfin, notre étude a porté sur les cellules épithéliales amniotiques, mais il serait également intéressant de réaliser des études similaires sur des cellules issues du chorion car ce feuillet est le premier à se rompre et il est situé à proximité de la flore vaginale, et donc des bactéries qu'elle contient. La culture et l'immortalisation de trophoblastes chorioniques doivent encore être améliorées au laboratoire. Cependant, une collaboration récente avec l'équipe du Dr. R. Menon (Galveston, Texas), qui a réussi à mettre au point un protocole efficace de prélèvement et de culture de trophoblastes chorioniques, nous permettrait de pallier les différents problèmes que nous avons rencontrés.

En conclusion, ce travail a permis tout d'abord d'identifier deux nouveaux mycoplasmes dans la sphère placentaire, puis, de mettre en évidence un nouvel acteur potentiellement impliqué dans la rupture des membranes fœtales à terme, à savoir l'inflammasome NLRP7. Il s'agit de la première étude sur les inflammasomes dans l'équipe du Pr. Vincent SAPIN. Ainsi, en plus des résultats obtenus, ce travail a également permis de tester et mettre au point des outils et techniques permettant une analyse plus approfondie de l'inflammasome NLRP7, mais aussi des autres inflammasomes NLRP. Ceci permettra de mieux caractériser les phénomènes inflammatoires ayant lieu au sein des membranes fœtales dans des contextes physiologiques et pathologiques, dans le but, *in fine*, de développer des thérapies préventives ou curatives de pathologies obstétricales.

REMERCIEMENTS

➤ Aux rapporteurs,

Je remercie la Professeure Marie-Noëlle DIEUDONNE, la Docteure Céline MEHATS et le Professeur Jean GUIBOURDENCHE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

➤ Aux membres et au Président du jury,

Je remercie le Professeur Vincent SAPIN, Président du jury, ainsi que la Professeure Marie-Noëlle DIEUDONNE, la Professeure Pascale GUIERARD, la Docteure Céline MEHATS, le Docteur Loïc BLANCHON et le Professeur Jean GUIBOURDENCHE, membres du jury, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Je tiens également à vous remercier d'avoir lu ce manuscrit jusqu'à la fin !

➤ A l'équipe,

Je remercie le Professeur Vincent SAPIN de m'avoir acceptée dans son équipe de recherche pour ces trois années de thèse, le Docteur Loïc BLANCHON d'avoir encadré ce travail de thèse et la Docteure Corinne BELVILLE pour son encadrement également. Votre soutien, vos conseils, votre bonne humeur au quotidien, votre confiance et votre bienveillance ont fait de cette thèse une expérience enrichissante et agréable. Je vous remercie également pour tout ce que j'ai appris auprès de vous pendant ces presque quatre années dans l'équipe. Je tiens aussi à remercier Régine, Karen, Denis, Damien, Geoffroy, Matthieu, Raïko et Jules pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur écoute.

Je remercie mes voisines de bureau Héléna, Christelle et plus récemment Julia pour tous les bons moments que nous avons passés, nos fous rires, nos discussions (scientifiques, mais pas seulement ^^) et bien sûr nos nombreux grignotages ! Merci aussi à Ruoyang, Clarisse, Valentin, Shaam et Jean pour leurs encouragements pendant ces longs mois d'écriture.

Je remercie également tous les stagiaires qui ont contribué à l'avancée de mon projet : Solène, Laurine, Aurélie et Shaam.

Je souhaite à toute l'équipe de belles années de recherche et plein d'articles !

⇒ A mes collègues du Laboratoire GReD,

Je remercie toutes les personnes dans le laboratoire qui ont contribué à la réussite de cette thèse, en particulier Caroline VACHIAS pour m'avoir formée à l'utilisation des microscopes.

Je tiens également à remercier les « filles du midi » : Françoise, Nadège, Annie, Nathalie, Graziella et Nolwenn. Nos retrouvailles chaque midi et nos rigolades vont me manquer ! Merci pour votre soutien et votre aide tout au long de ma thèse.

⇒ A ma famille et mes amis,

Je tiens à remercier mes parents chéris de m'avoir permis de faire des études dans un domaine qui me passionne et de réaliser mon rêve : faire de la recherche. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé, depuis toutes ces années, dans ma scolarité. Merci également à mes deux sœurs pour leur soutien et leurs encouragements. Mais surtout, je vous remercie pour tous nos moments passés en famille qui m'apportent tant de joies depuis 28 ans maintenant. Je vous aime de tout mon cœur.

Merci également à mes amis Jeanne, Loup, Thomas, Allan et Cécilia d'avoir été là pour moi et de m'avoir encouragé dans les moments difficiles, mais aussi, merci de tous les bons moments que nous avons passés ensemble !

⇒ A Guillaume,

Mon amour, ma vie ne serait pas la même sans toi. Je te remercie mille fois de tout le soutien que tu m'as apporté durant ces trois dernières années. Merci d'avoir lu, relu, re-relu, corrigé et recorrecté mon manuscrit ! Merci de m'avoir permis de me remettre en question et de m'avoir secoué quand il le fallait ^^ . Merci d'être toujours à l'écoute quand j'en ai besoin. Merci de ta tendresse et de ton amour. Et en fait, juste merci d'être toi. J'ai hâte de vivre encore plein de belles choses avec toi et de commencer nos nouvelles aventures ensemble !

Il y aura bientôt deux Docteurs LAVERGNE à la maison ;)

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Standring S. *Gray's Anatomy : The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Elsevier Health Sciences (2015).
2. Jacques Poirier, Isabelle Poirier, Jean Baudet. *Embryologie humaine*. 3ème édition. Maloine (1993).
3. Larsen W, Brauer PR, Schoenwolf GC, Francis-West P. *Embryologie humaine*. De Boeck Supérieur (2017).
4. Kurt Benirschke, Peter Kaufmann. *Pathology of the Human Placenta*. Fourth edition. Springer (2000).
5. Bibbo C, Little SE, Bsat J, Botka KA, Benson CB, Robinson JN. Chorioamniotic Separation Found on Obstetric Ultrasound and Perinatal Outcome. *AJP Rep* (2016) **6**:e337–e343. doi:10.1055/s-0036-1593407
6. Kim YN, Jeong DH, Jeong SJ, Sung MS, Kang MS, Kim KT. Complete chorioamniotic membrane separation with fetal restrictive dermopathy in two consecutive pregnancies. *Prenatal Diagnosis* (2007) **27**:352–355. doi:10.1002/pd.1673
7. Bromley B, Shipp TD, Benacerraf BR. Amnion-chorion separation after 17 weeks' gestation. *Obstet Gynecol* (1999) **94**:1024–1026.
8. Benacerraf BR, Frigoletto FD. Sonographic observation of amniotic rupture without amniotic band syndrome. *Journal of Ultrasound in Medicine* (1992) **11**:109–111. doi:10.7863/jum.1992.11.2.109
9. Sydorak RM, Hirose S, Sandberg PL, Filly RA, Harrison MR, Farmer DL, Albanese CT. Chorioamniotic Membrane Separation Following Fetal Surgery. *Journal of Perinatology* (2002) **22**:407. doi:10.1038/sj.jp.7210753
10. Genbacev O, Vicovac L, Larocque N. The role of chorionic cytotrophoblasts in the smooth chorion fusion with parietal decidua. *Placenta* (2015) **36**:716–722. doi:10.1016/j.placenta.2015.05.002
11. Garrido-Gomez T, Ona K, Kapidzic M, Gormley M, Simón C, Genbacev O, Fisher SJ. Severe pre-eclampsia is associated with alterations in cytotrophoblasts of the smooth chorion. *Development* (2017) **144**:767–777. doi:10.1242/dev.146100
12. Parry-Jones E, Priya S. A study of the elasticity and tension of fetal membranes and of the relation of the area of the gestational sac to the area of the uterine cavity. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* (1976) **83**:205–212. doi:10.1111/j.1471-0528.1976.tb00810.x
13. Millar LK, Stollberg J, DeBuque L, Bryant-Greenwood G. Fetal membrane distention: Determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000) **182**:128–134. doi:10.1016/S0002-9378(00)70501-1
14. Myatt L, Sun K. Role of fetal membranes in signaling of fetal maturation and parturition. *Int J Dev Biol* (2010) **54**:545–553. doi:10.1387/ijdb.082771lm
15. Jabareen M, Mallik AS, Bilic G, Zisch AH, Mazza E. Relation between mechanical properties and microstructure of human fetal membranes: An attempt towards a quantitative analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2009) **144**:S134–S141. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.02.032
16. Brace RA, Wolf EJ. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1989) **161**:382–388. doi:10.1016/0002-9378(89)90527-9
17. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1960) **79**:1070–1073. doi:10.1016/0002-9378(60)90512-3
18. Bourne GL, Lacy D. Ultra-Structure of Human Amnion and its Possible Relation to the Circulation of Amniotic Fluid. *Nature* (1960) **186**:952–954. doi:10.1038/186952a0
19. Bourne G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J* (1962) **38**:193–201. doi:10.1136/pgmj.38.438.193
20. Parry S, Strauss JF. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *New England Journal of Medicine* (1998) **338**:663–670. doi:10.1056/NEJM199803053381006

21. Martin L, Richardson L, Menon R. "Characteristics, Properties, and Functionality of Fetal Membranes: An Overlooked Area in the Field of Parturition (2018)," in *Reference Module in Biomedical Sciences* doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64498-7
22. Aplin JD, Campbell S, Allen TD. The extracellular matrix of human amniotic epithelium : ultrastructure, composition and deposition. *J Cell Sci* (1985) **79**:119–136.
23. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* (1998) **19**:1–11.
24. McDonald C, Siatskas C, C.A. Bernard C. The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of Multiple Sclerosis. *Inflammation and Regeneration* (2011) **31**:256–271. doi:10.2492/inflammregen.31.256
25. Richardson LS, Vargas G, Brown T, Ochoa L, Sheller-Miller S, Saade GR, Taylor RN, Menon R. Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. *Am J Pathol* (2017) **187**:2821–2830. doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.019
26. Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* (1996) **55**:1253–1260. doi:10.1095/biolreprod55.6.1253
27. Aplin JD, Campbell S, Donnai P, Bard JBL, Allen TD. Importance of vitamin C in maintenance of the normal amnion: an experimental study. *Placenta* (1986) **7**:377–389. doi:10.1016/S0143-4004(86)80026-1
28. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *Journal of Pharmacological Sciences* (2007) **105**:215–228. doi:10.1254/jphs.CR0070034
29. Mitchell B, Sharma R. "Chapter 2 - How do the placenta and fetal membranes form?," in *Embryology (Second Edition)*, eds. B. Mitchell, R. Sharma (Churchill Livingstone), 9–14. doi:10.1016/B978-0-7020-3225-7.50005-1
30. Funai E, Labowsky A, Drewes C, Kliman H. Timing of Fetal Meconium Absorption by Amnionic Macrophages. *American Journal of Perinatology* (2009) **26**:093–097. doi:10.1055/s-0028-1103028
31. Reyes L, Wolfe B, Golos T. Hofbauer Cells: Placental Macrophages of Fetal Origin. *Results Probl Cell Differ* (2017) **62**:45–60. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_3
32. Joyce E, Diaz P, Tamarkin S, Moore R, Strohl A, Stetzer B, Kumar D, Sacks M, Moore J. In-vivo Stretch of Term Human Fetal Membranes. *Placenta* (2016) **38**:57–66. doi:10.1016/j.placenta.2015.12.011
33. Verbruggen SW, Loo JHW, Hayat TTA, Hajnal JV, Rutherford MA, Phillips ATM, Nowlan NC. Modeling the biomechanics of fetal movements. *Biomech Model Mechanobiol* (2016) **15**:995–1004. doi:10.1007/s10237-015-0738-1
34. Weiner CP, Heilskov J, Pelzer G, Grant S, Wenstrom K, Williamson RA. Normal values for human umbilical venous and amniotic fluid pressures and their alteration by fetal disease. *Am J Obstet Gynecol* (1989) **161**:714–717. doi:10.1016/0002-9378(89)90387-6
35. Nicolini U, Fisk NM, Talbert DG, Rodeck CH, Kochenour NK, Greco P, Hubinont C, Santolaya J. Intrauterine manometry: technique and application to fetal pathology. *Prenat Diagn* (1989) **9**:243–254.
36. Fisk NM, Ronderos-Dumit D, Tannirandorn Y, Nicolini U, Talbert D, Rodeck CH. Normal amniotic pressure throughout gestation. *BJOG: An international journal of O&G* (1992) **99**:18–22. doi:10.1111/j.1471-0528.1992.tb14385.x
37. Lavery JP, Miller CE. The viscoelastic nature of chorioamniotic membranes. *Obstet Gynecol* (1977) **50**:467–472.
38. Lavery JP, Miller CE, Knight RD. The effect of labor on the rheologic response of chorioamniotic membranes. *Obstet Gynecol* (1982) **60**:87–92.
39. Lavery JP, Miller CE. Deformation and creep in the human chorioamniotic sac. *Am J Obstet Gynecol* (1979) **134**:366–375. doi:10.1016/s0002-9378(16)33077-0

40. Oyen ML, Calvin SE, Landers DV. Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol* (2006) **195**:510–515. doi:10.1016/j.ajog.2006.02.010
41. Benson-Martin J, Zammaretti P, Bilic G, Schweizer T, Portmann-Lanz B, Burkhardt T, Zimmermann R, Ochsenbein-Kölble N. The Young's modulus of fetal preterm and term amniotic membranes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2006) **128**:103–107. doi:10.1016/j.ejogrb.2005.12.011
42. Polishuk WZ, Kohane S, Peranio A. The physical properties of fetal membranes. *Obstet Gynecol* (1962) **20**:204–210.
43. Verbruggen SW, Oyen ML, Phillips ATM, Nowlan NC. Function and failure of the fetal membrane: Modelling the mechanics of the chorion and amnion. *PLoS One* (2017) **12**: doi:10.1371/journal.pone.0171588
44. Schmidt W. The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* (1992) **127**:1–100.
45. Méhats C, Schmitz T, Marcellin L, Breuiller-Fouché M. Biochimie de la rupture des membranes fœtales. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* (2011) **39**:365–369. doi:10.1016/j.gyobfe.2011.04.006
46. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* (1993) **14**:385–406. doi:10.1016/S0143-4004(05)80460-6
47. Artal R, Sokol RJ, Neuman M, Burstein AH, Stojkov J. The mechanical properties of prematurely and non-prematurely ruptured membranes: Methods and preliminary results. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1976) **125**:655–659. doi:10.1016/0002-9378(76)90788-2
48. El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, Redline RW, Mansour JM, J. J. Moore. Term Human Fetal Membranes Have a Weak Zone Overlying the Lower Uterine Pole and Cervix Before Onset of Labor. *Biol Reprod* (2005) **72**:720–726. doi:10.1095/biolreprod.104.033647
49. Arikat S, Novince RW, Mercer BM, Kumar D, Fox JM, Mansour JM, Moore JJ. 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. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006) **194**:211–217. doi:10.1016/j.ajog.2005.06.083
50. Connolly AM, Katz VL, Bash KL, McMahan MJ, Hansen WF. Trauma and Pregnancy. *Amer J Perinatol* (1997) **14**:331–336. doi:10.1055/s-2007-994155
51. Kuo C, Jamieson DJ, McPheeters ML, Meikle SF, Posner SF. Injury hospitalizations of pregnant women in the United States, 2002. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2007) **196**:161.e1-161.e6. doi:10.1016/j.ajog.2006.09.015
52. Cahill AG, Bastek JA, Stamilio DM, Odibo AO, Stevens E, Macones GA. Minor trauma in pregnancy—is the evaluation unwarranted? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2008) **198**:208.e1-208.e5. doi:10.1016/j.ajog.2007.07.042
53. Pearce C, Martin SR. Trauma and Considerations Unique to Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* (2016) **43**:791–808. doi:10.1016/j.ogc.2016.07.008
54. Galask RP, Varner MW, Rosemarie Petzold C, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1984) **148**:915–928. doi:10.1016/0002-9378(84)90534-9
55. Zare-Bidaki M, Sadrinia S, Erfani S, Afkar E, Ghanbarzade N. Antimicrobial Properties of Amniotic and Chorionic Membranes: A Comparative Study of Two Human Fetal Sacs. *J Reprod Infertil* (2017) **18**:218–224.
56. Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2001) **94**:224–229. doi:10.1016/S0301-2115(00)00345-6
57. Zhang Q, Shimoya K, Moriyama A, Yamanaka K, Nakajima A, Nobunaga T, Koyama M, Azuma C, Murata Y. Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes

- and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Mol Hum Reprod* (2001) **7**:573–579. doi:10.1093/molehr/7.6.573
58. Tehrani FA, Modaresifar K, Azizian S, Niknejad H. Induction of antimicrobial peptides secretion by IL-1 β enhances human amniotic membrane for regenerative medicine. *Scientific Reports* (2017) **7**:17022. doi:10.1038/s41598-017-17210-7
 59. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* (2007) **28**:161–169. doi:10.1016/j.placenta.2006.01.006
 60. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide β 3-defensin is produced by the amnion: A possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2004) **191**:1678–1687. doi:10.1016/j.ajog.2004.03.081
 61. Erez O, Romero R, Tarca A, Chaiworapongsa T, Kim Y, Than N, Vaisbuch E, Draghici S, Tromp G. Differential expression pattern of genes encoding for anti-microbial peptides in the fetal membranes of patients with spontaneous preterm labor and intact membranes and those with preterm PROM. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2009) **22**:1103–1115. doi:10.3109/14767050902994796
 62. Steel JH, O'Donoghue K, Kennea NL, Sullivan MHF, Edwards AD. Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation. *Placenta* (2005) **26**:672–677. doi:10.1016/j.placenta.2004.10.003
 63. Lee SD, Kim MR, Hwang PG, Shim S-S, Yoon BH, Kim CJ. Chorionic plate vessels as an origin of amniotic fluid neutrophils. *Pathol Int* (2004) **54**:516–522. doi:10.1111/j.1440-1827.2004.01659.x
 64. Jay RM, Huish JP, Wray JH. "Amniotic membrane in clinical medicine," in *Extracellular Matrix-derived Implants in Clinical Medicine* (Elsevier (2006)), 151–176. doi:10.1016/B978-0-08-100166-0.00009-8
 65. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine Glands Provide Histiotrophic Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) **87**:2954–2959. doi:10.1210/jcem.87.6.8563
 66. Gilbert WM, Newman PS, Eby-Wilkens E, Brace RA. Technetium Tc 99m rapidly crosses the ovine placenta and intramembranous pathway. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1996) **175**:1557–1562. doi:10.1016/S0002-9378(96)70106-0
 67. Wintour EM, Shandley L. Effects of fetal fluid balance on amniotic fluid volume. *Semin Perinatol* (1993) **17**:158–172.
 68. Gilbert WM, Brace RA. Amniotic fluid volume and normal flows to and from the amniotic cavity. *Semin Perinatol* (1993) **17**:150–157.
 69. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* (1997) **40**:280–289.
 70. Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA, Ross MG. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: Evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2001) **185**:1226–1231. doi:10.1067/mob.2001.117971
 71. Mann SE, Ricke EA, Yang BA, Verkman AS, Taylor RN. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2002) **187**:902–907. doi:10.1067/mob.2002.127168
 72. Wang S, Chen J, Huang B, Ross MG. Cloning and cellular expression of aquaporin 9 in ovine fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2005) **193**:841–848. doi:10.1016/j.ajog.2005.01.019
 73. Prat C, Blanchon L, Borel V, Gallot D, Herbet A, Bouvier D, Marceau G, Sapin V. Ontogeny of Aquaporins in Human Fetal Membranes. *Biol Reprod* (2012) **86**: doi:10.1095/biolreprod.111.095448
 74. Kobayashi K, Yasui M. Cellular and subcellular localization of aquaporins 1, 3, 8, and 9 in amniotic membranes during pregnancy in mice. *Cell Tissue Res* (2010) **342**:307–316. doi:10.1007/s00441-010-1065-6

75. Liu H, Koukoulas I, Ross MC, Wang S, Wintour EM. Quantitative Comparison of Placental Expression of Three Aquaporin Genes. *Placenta* (2004) **25**:475–478. doi:10.1016/j.placenta.2003.10.008
76. Ma T, Yang B, Verkman AS. Cloning of a Novel Water and Urea-Permeable Aquaporin from Mouse Expressed Strongly in Colon, Placenta, Liver, and Heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997) **240**:324–328. doi:10.1006/bbrc.1997.7664
77. Mann SE, Ricke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2005) **192**:2041–2044. doi:10.1016/j.ajog.2005.02.046
78. Shioji M, Fukuda H, Kanzaki T, Wasada K, Kanagawa T, Shimoya K, Mu J, Sugimoto Y, Murata Y. Reduction of aquaporin-8 on fetal membranes under oligohydramnios in mice lacking prostaglandin F2 α receptor. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* (2006) **32**:373–378. doi:10.1111/j.1447-0756.2006.00425.x
79. Luo H, Xie A, Hua Y, Wang J, Liu Y, Zhu X. Aquaporin 1 gene deletion affects the amniotic fluid volume and composition as well as the expression of other aquaporin water channels in placenta and fetal membranes. *Clinica Chimica Acta* (2018) **482**:161–165. doi:10.1016/j.cca.2018.04.001
80. Zhu X, Jiang S, Hu Y, Zheng X, Zou S, Wang Y, Zhu X. The expression of aquaporin 8 and aquaporin 9 in fetal membranes and placenta in term pregnancies complicated by idiopathic polyhydramnios. *Early Human Development* (2010) **86**:657–663. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.07.012
81. Zhu XQ, Jiang SS, Zhu XJ, Zou SW, Wang YH, Hu YC. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in Fetal Membranes and Placenta in Human Term Pregnancies with Oligohydramnios. *Placenta* (2009) **30**:670–676. doi:10.1016/j.placenta.2009.05.010
82. Cheung CY, Anderson DF, Brace RA. Multiomics analyses of vesicular transport pathway-specific transcripts and proteins in ovine amnion: responses to altered intramembranous transport. *Physiological Genomics* (2019) **51**:267–278. doi:10.1152/physiolgenomics.00003.2019
83. Bogic LjV, Brace RA, Cheung CY. Cellular Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovine Placenta and Fetal Membranes. *Placenta* (2000) **21**:203–209. doi:10.1053/plac.1999.0467
84. 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* (2001) **22**:265–275. doi:10.1053/plac.2001.0627
85. Cheung CY, Li S, Chen D, Brace RA. Regulation of Caveolin-1 Expression and Phosphorylation by VEGF in Ovine Amnion Cells. *Reprod Sci* (2010) **17**:1112–1119. doi:10.1177/1933719110378175
86. Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Fetal esophageal ligation induces expression of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2001) **184**:175–184. doi:10.1067/mob.2001.108340
87. Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Prolonged hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2002) **186**:303–310. doi:10.1067/mob.2002.119806
88. Cheung CY, Anderson DF, Brace RA. Transport-associated pathway responses in ovine fetal membranes to changes in amniotic fluid dynamics. *Physiol Rep* (2017) **5**: doi:10.14814/phy2.13455
89. Khatun T, Ansari AA, Hamid I, Gupta RS, Ahmad MdP. Oligohydramnios and Fetal Outcome: A Review. *Med Phoenix* (2017) **1**:23–30. doi:10.3126/medphoenix.v1i1.17885
90. Hamza A, Herr D, Solomayer EF, Meyberg-Solomayer G. Polyhydramnios: Causes, Diagnosis and Therapy. *Geburtshilfe Frauenheilkd* (2013) **73**:1241–1246. doi:10.1055/s-0033-1360163
91. Penfield CA, Wing DA. Labor Induction Techniques. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* (2017) **44**:567–582. doi:10.1016/j.ogc.2017.08.011
92. Usta I, Mercer B, Sibai B. Current Obstetrical Practice and Umbilical Cord Prolapse. *Amer J Perinatol* (1999) **16**:0479–0484. doi:10.1055/s-1999-6809

93. Mercer BM, McNanley T, O'Brien JM, Randal L, Sibai BM. Early versus late amniotomy for labor induction: A randomized trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1995) **173**:1321–1325. doi:10.1016/0002-9378(95)91379-3
94. Rasheed FA, Ahmed AA, Hussain SA. The Impact of Early Versus Late Amniotomy on Duration of Labor, Maternal and Neonatal Outcomes in Iraqi Primigravida with Spontaneous Labor. *Medicine Science | International Medical Journal* (2014) **3**:1343–51.
95. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Rev Obstet Gynecol* (2008) **1**:11–22.
96. 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* (2006) **27**:1037–1051. doi:10.1016/j.placenta.2006.01.002
97. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* (1994) **101**:375–386. doi:10.1111/j.1471-0528.1994.tb11908.x
98. McLaren J. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Human Reproduction* (1999) **14**:237–241. doi:10.1093/humrep/14.1.237
99. McParland PC, Taylor DJ, Bell SC. Mapping of zones of altered morphology and chorionic connective tissue cellular phenotype in human fetal membranes (amniochorion and decidua) overlying the lower uterine pole and cervix before labor at term. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2003) **189**:1481–1488. doi:10.1067/S0002-9378(03)00585-4
100. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* (2005) **3**:28. doi:10.1186/1477-7827-3-28
101. Menon R. Initiation of human parturition: signaling from senescent fetal tissues via extracellular vesicle mediated paracrine mechanism. *Obstetrics & Gynecology Science* (2019) **62**:199. doi:10.5468/ogs.2019.62.4.199
102. Chai M, Barker G, Menon R, Lappas M. Increased oxidative stress in human fetal membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries. *Placenta* (2012) **33**:604–610. doi:10.1016/j.placenta.2012.04.014
103. Rao PSS, Ande A, Sinha N, Kumar A, Kumar S. Effects of Cigarette Smoke Condensate on Oxidative Stress, Apoptotic Cell Death, and HIV Replication in Human Monocytic Cells. *PLOS ONE* (2016) **11**:e0155791. doi:10.1371/journal.pone.0155791
104. Seo S-B, Choe ES, Kim K-S, Shim S-M. The effect of tobacco smoke exposure on the generation of reactive oxygen species and cellular membrane damage using co-culture model of blood brain barrier with astrocytes. *Toxicol Ind Health* (2017) **33**:530–536. doi:10.1177/0748233716687708
105. Kim C, Go R, Hwang K, Jeung E, Choi S, Choi K. Apoptotic effects of cigarette smoke extracts on mouse embryonic stem cells via oxidative stress. *Environmental Toxicology* (2019) **34**:689–698. doi:10.1002/tox.22735
106. Poletini J, Richardson LS, Menon R. Oxidative stress induces senescence and sterile inflammation in murine amniotic cavity. *Placenta* (2018) **63**:26–31. doi:10.1016/j.placenta.2018.01.009
107. Sumanasekera WK, Dao HT, Shekhovtsova V, Schultz K, Jani M, Gyamfi F, Tran DM, Le N. The mechanistic role of oxidative stress in cigarette smoke-induced cardiac stem cell dysfunction and prevention by ascorbic acid. *Cell Biol Toxicol* (2019) **35**:111–127. doi:10.1007/s10565-018-9437-x
108. Jin J, Richardson L, Sheller-Miller S, Zhong N, Menon R. Oxidative stress induces p38MAPK-dependent senescence in the feto-maternal interface cells. *Placenta* (2018) **67**:15–23. doi:10.1016/j.placenta.2018.05.008
109. Menon R, Boldogh I, Urrabaz-Garza R, Poletini J, Syed TA, Saade GR, Papaconstantinou J, Taylor RN. Senescence of Primary Amniotic Cells via Oxidative DNA Damage. *PLoS One* (2013) **8**: doi:10.1371/journal.pone.0083416

110. Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, Lappas M, Taylor RN. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. *Placenta* (2011) **32**:317–322. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.015
111. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell* (2013) **153**:1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
112. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2014) **15**:482–496. doi:10.1038/nrm3823
113. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* (2018) **217**:65–77. doi:10.1083/jcb.201708092
114. Brondello J-M, Prieur A, Philipot D, Lemaitre J-M, Lenaers G, Piette J, Dulić V. La sénescence cellulaire - Un nouveau mythe de Janus ? *Med Sci (Paris)* (2012) **28**:288–296. doi:10.1051/medsci/2012283017
115. de Magalhães JP, Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* (2018) **170**:2–9. doi:10.1016/j.mad.2017.07.001
116. Pole A, Dimri M, P. Dimri G, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, School of Medicine and Health Sciences, The George Washington University, Washington DC, USA. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science* (2016) **3**:300–324. doi:10.3934/molsci.2016.3.300
117. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, Taylor RN. Short Fetal Leukocyte Telomere Length and Preterm Prelabor Rupture of the Membranes. *PLoS ONE* (2012) **7**:e31136. doi:10.1371/journal.pone.0031136
118. Phillippe M, Sawyer MR, Edelson PK. The telomere gestational clock: increasing short telomeres at term in the mouse. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2019) **220**:496.e1-496.e8. doi:10.1016/j.ajog.2019.01.218
119. Bonney EA, Krebs K, Saade G, Kechichian T, Trivedi J, Huaizhi Y, Menon R. Differential Senescence in Feto-Maternal Tissues During Mouse Pregnancy. *Placenta* (2016) **43**:26–34. doi:10.1016/j.placenta.2016.04.018
120. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of Ageing and Development* (2019) **177**:37–45. doi:10.1016/j.mad.2018.03.013
121. Jones CW, Gambala C, Esteves KC, Wallace M, Schlesinger R, O'Quinn M, Kidd L, Theall KP, Drury SS. Differences in placental telomere length suggest a link between racial disparities in birth outcomes and cellular aging. *Am J Obstet Gynecol* (2017) **216**:294.e1-294.e8. doi:10.1016/j.ajog.2016.11.1027
122. Menon R, Behnia F, Polettini J, Saade GR, Campisi J, Velarde M. Placental membrane aging and HMGB1 signaling associated with human parturition. *Ageing (Albany NY)* (2016) **8**:216–229.
123. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, Saade GR, Menon R. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2015) **213**:359.e1-359.e16. doi:10.1016/j.ajog.2015.05.041
124. Menon R, Bonney EA, Condon J, Mesiano S, Taylor RN. Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: redundancy and synergy in human parturition. *Hum Reprod Update* (2016) **22**:535–560. doi:10.1093/humupd/dmw022
125. Lavu N, Richardson L, Radnaa E, Kechichian T, Urrabaz-Garza R, Sheller-Miller S, Bonney E, Menon R. Oxidative Stress Induced Downregulation of Glycogen Synthase kinase 3 β (GSK3 β) in Fetal Membranes Promotes Cellular Senescence. *Biol Reprod* (2019) doi:10.1093/biolre/iox119
126. Richardson L, Dixon CL, Aguilera-Aguirre L, Menon R. Oxidative stress-induced TGF-beta/TAB1-mediated p38MAPK activation in human amnion epithelial cells. *Biol Reprod* (2018) **99**:1100–1112. doi:10.1093/biolre/iocy135
127. Menon R, Fortunato SJ. The Role of Matrix Degrading Enzymes and Apoptosis in Rupture of Membranes. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* (2004) **11**:427–437. doi:10.1016/j.jsigi.2004.04.001

128. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of Four Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in Human Fetal Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology* (1998) **40**:395–400. doi:10.1111/j.1600-0897.1998.tb00424.x
129. Riley S, Leask R, Denison F, Wisely K, Calder A, Howe D. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. *Journal of Endocrinology* (1999) **162**:351–359. doi:10.1677/joe.0.1620351
130. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000) **182**:409–416. doi:10.1016/S0002-9378(00)70232-8
131. Khwad ME, Pandey V, Stetzer B, Mercer BM, Kumar D, Moore RM, Fox J, Redline RW, Mansour JM, Moore JJ. Fetal Membranes From Term Vaginal Deliveries Have a Zone of Weakness Exhibiting Characteristics of Apoptosis and Remodeling. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* (2006) **13**:191–195. doi:10.1016/j.jsigi.2005.12.010
132. Moore RM, Redline RW, Kumar D, Mercer BM, Mansour JM, Yohannes E, Novak JB, Chance MR, Moore JJ. Differential expression of fibulin family proteins in the para-cervical weak zone and other areas of human fetal membranes. *Placenta* (2009) **30**:335–341. doi:10.1016/j.placenta.2009.01.007
133. Nhan-Chang C-L, Romero R, Tarca AL, Mittal P, Kusanovic JP, Erez O, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hotra J, Than NG, et al. Characterization of the transcriptome of chorioamniotic membranes at the site of rupture in spontaneous labor at term. *Am J Obstet Gynecol* (2010) **202**:462.e1-462.41. doi:10.1016/j.ajog.2010.02.045
134. Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon KB, Jeffrey JJ, Strauss JF. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* (1996) **98**:1971–1978. doi:10.1172/JCI119001
135. Lei H, Kalluri R, Furth EE, Baker AH, Strauss JF. Rat Amnion Type IV Collagen Composition and Metabolism: Implications for Membrane Breakdown. *Biology of Reproduction* (1999) **60**:176–182. doi:10.1095/biolreprod60.1.176
136. Mi Y, Wang W, Lu J, Zhang C, Wang Y, Ying H, Sun K. Proteasome-mediated degradation of collagen III by cortisol in amnion fibroblasts. *Journal of Molecular Endocrinology* (2018) **60**:45–54. doi:10.1530/JME-17-0215
137. Mi Y, Wang W, Zhang C, Liu C, Lu J, Li W, Zuo R, Myatt L, Sun K. Autophagic Degradation of Collagen 1A1 by Cortisol in Human Amnion Fibroblasts. *Endocrinology* (2017) **158**:1005–1014. doi:10.1210/en.2016-1829
138. Wang L-Y, Wang W-S, Wang Y-W, Lu J-W, Lu Y, Zhang C-Y, Li W-J, Sun K, Ying H. Drastic induction of MMP-7 by cortisol in the human amnion: implications for membrane rupture at parturition. *The FASEB Journal* (2019) **33**:2770–2781. doi:10.1096/fj.201801216R
139. Liu C, Guo C, Wang W, Zhu P, Li W, Mi Y, Myatt L, Sun K. Inhibition of Lysyl Oxidase by Cortisol Regeneration in Human Amnion: Implications for Rupture of Fetal Membranes. *Endocrinology* (2016) **157**:4055–4065. doi:10.1210/en.2016-1406
140. Meinert M, Malmström A, Tufvesson E, Westergren-Thorsson G, Petersen AC, Laurent C, Uldbjerg N, Eriksen GV. Labour Induces Increased Concentrations of Biglycan and Hyaluronan in Human Fetal Membranes. *Placenta* (2007) **28**:482–486. doi:10.1016/j.placenta.2006.09.006
141. Bryant-Greenwood GD, Mamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1995) **172**:63–70. doi:10.1016/0002-9378(95)90085-3
142. Chai M, Walker SP, Riley C, Rice GE, Permezel M, Lappas M. Effect of Supracervical Apposition and Spontaneous Labour on Apoptosis and Matrix Metalloproteinases in Human Fetal Membranes. *Biomed Res Int* (2013) **2013**: doi:10.1155/2013/316146
143. Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes.

- American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000) **182**:458–464. doi:10.1016/S0002-9378(00)70239-0
144. Alfaidy N, Li W, MacIntosh T, Yang K, Challis J. Late Gestation Increase in 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Expression in Human Fetal Membranes: A Novel Intrauterine Source of Cortisol. *None* (2003) **88**:5033–5038. doi:10.1210/jc.2002-021915
 145. Pearson Murphy BE. Chorionic membrane as an extra-adrenal source of foetal cortisol in human amniotic fluid. *Nature* (1977) **266**:179–181. doi:10.1038/266179a0
 146. Pearson Murphy BE. Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: A role for cortisone in human fetal development. *Journal of Steroid Biochemistry* (1981) **14**:811–817. doi:10.1016/0022-4731(81)90226-0
 147. Sharp-Cageorge SM, Blicher BM, Gordon ER, Murphy BE. Amniotic-fluid cortisol and human fetal lung maturation. *N Engl J Med* (1977) **296**:89–92. doi:10.1056/NEJM197701132960207
 148. Wang W, Li W, Wang Y, Wang L, Mi Y, Lu J, Lu Y, Zhang C, Sun K. Involvement of serum amyloid A1 in the rupture of fetal membranes through induction of collagen I degradation. *Clinical Science* (2019) **133**:515–530. doi:10.1042/CS20180950
 149. Wang Y, Wang W, Wang L, Bao Y, Lu J, Lu Y, Zhang C, Li W, Sun K, Ying H. Extracellular matrix remodeling effects of serum amyloid A1 in the human amnion: Implications for fetal membrane rupture. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) doi:10.1111/aji.13073
 150. Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, Guller S. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* (1998) **83**:660–666. doi:10.1210/jcem.83.2.4600
 151. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Human Reproduction* (1999) **14**:2895–2900. doi:10.1093/humrep/14.11.2895
 152. Reti NG, Lappas M, Riley C, Wlodek ME, Permezel M, Walker S, Rice GE. Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2007) **196**:484.e1-484.e10. doi:10.1016/j.ajog.2007.01.021
 153. Lappas M, Riley C, Rice GE, Permezel M. Increased Expression of ac-FoxO1 Protein in Prelabor Fetal Membranes Overlying the Cervix: Possible Role in Human Fetal Membrane Rupture. *Reproductive Sciences* (2009) **16**:635–641. doi:10.1177/1933719109332831
 154. Lappas M, Lim R, Riley C, Menon R, Permezel M. Expression and Localisation of FoxO3 and FoxO4 in Human Placenta and Fetal Membranes. *Placenta* (2010) **31**:1043–1050. doi:10.1016/j.placenta.2010.09.009
 155. Harirah H, Borahay M, Zaman W, Ahmed M, G Hager I, Hankins G. Increased Apoptosis in Chorionic Trophoblasts of Human Fetal Membranes with Labor at Term. *International Journal of Clinical Medicine* (2012) **2012**:136–142. doi:10.4236/ijcm.2012.32027
 156. Kumagai K, Otsuki Y, Ito Y, Shibata M-A, Abe H, Ueki M. Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Mol Hum Reprod* (2001) **7**:681–689. doi:10.1093/molehr/7.7.681
 157. Hsu C-D, Meaddough E, Basherra H, Harirah H, Lu L-C. Increased Apoptosis in Human Amnion is Associated with Labor at Term. *American Journal of Reproductive Immunology* (2000) **43**:255–258. doi:10.1111/j.8755-8920.2000.430502.x
 158. Wang W, Liu C, Sun K. Induction of Amnion Epithelial Apoptosis by Cortisol via tPA/Plasmin System. *Endocrinology* (2016) **157**:4487–4498. doi:10.1210/en.2016-1464
 159. Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K, Rice GE. Labour-associated increase in interleukin-1 alpha release in vitro by human gestational tissues. *J Endocrinol* (1996) **150**:515–522. doi:10.1677/joe.0.1500515
 160. Gunn L, Hardiman P, Tharmaratnam S, Lowe D, Chard T. Measurement of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in pregnancy-associated tissues. *Reprod Fertil Dev* (1996) **8**:1069–1073.

161. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* (1996) **3**:328–335.
162. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* (1999) **181**:1530–1536. doi:10.1016/s0002-9378(99)70400-x
163. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Mazor M, Romero R. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *Am J Obstet Gynecol* (2006) **195**:394.e1-394.24. doi:10.1016/j.ajog.2005.08.057
164. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, Tromp G, Espinoza J, Bujold E, Abrahams VM, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* (2004) **191**:1346–1355. doi:10.1016/j.ajog.2004.07.009
165. Romero R, Xu Y, Plazyo O, Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Unkel R, Than NG, Chiang PJ, Dong Z, Xu Z, et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at Term. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) **79**:e12440. doi:10.1111/aji.12440
166. Veith GL, Rice GE. Interferon gamma expression during human pregnancy and in association with labour. *Gynecol Obstet Invest* (1999) **48**:163–167. doi:10.1159/000010165
167. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* (2003) **9**:41–45. doi:10.1093/molehr/gag001
168. Marcellin L, Schmitz T, Messaoudene M, Chader D, Parizot C, Jacques S, Delaire J, Gogusev J, Schmitt A, Lesaffre C, et al. Immune Modifications in Fetal Membranes Overlying the Cervix Precede Parturition in Humans. *The Journal of Immunology* (2017) **198**:1345–1356. doi:10.4049/jimmunol.1601482
169. Geutskens SB, Hordijk PL, Hennik PB van. The Chemorepellent Slit3 Promotes Monocyte Migration. *The Journal of Immunology* (2010) **185**:7691–7698. doi:10.4049/jimmunol.0903898
170. Lim R, Barker G, Lappas M. SLIT3 is Increased in Supracervical Human Foetal Membranes and in Labouring Myometrium and Regulates Pro-Inflammatory Mediators. *American Journal of Reproductive Immunology* (2014) **71**:297–311. doi:10.1111/aji.12181
171. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R, Romero R. The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* (1999) **181**:1142–1148. doi:10.1016/s0002-9378(99)70097-9
172. Cox SM, Casey ML, MacDonald PC. Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Hum Reprod Update* (1997) **3**:517–527. doi:10.1093/humupd/3.5.517
173. Kumar D, Fung W, Moore RM, Pandey V, Fox J, Stetzer B, Mansour JM, Mercer BM, Redline RW, Moore JJ. Proinflammatory Cytokines Found in Amniotic Fluid Induce Collagen Remodeling, Apoptosis, and Biophysical Weakening of Cultured Human Fetal Membranes. *Biol Reprod* (2006) **74**:29–34. doi:10.1095/biolreprod.105.045328
174. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* (2002) **187**:1159–1162. doi:10.1067/mob.2002.127457
175. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. TNF- α Promotes Caspase Activation and Apoptosis in Human Fetal Membranes. *J Assist Reprod Genet* (2002) **19**:201–204. doi:10.1023/A:1014898130008
176. Ito A, Nakamura T, Uchiyama T, Hirose K, Hirakawa S, Sasaguri Y, Mori Y. Stimulation of the biosynthesis of interleukin 8 by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in cultured human chorionic cells. *Biol Pharm Bull* (1994) **17**:1463–1467. doi:10.1248/bpb.17.1463

177. Trautman MS, Dudley DJ, Edwin SS, Collmer D, Mitchell MD. Amnion cell biosynthesis of interleukin-8: Regulation by inflammatory cytokines. *Journal of Cellular Physiology* (1992) **153**:38–43. doi:10.1002/jcp.1041530107
178. Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin (IL)-6 and IL-8 Production by Human Amnion: Regulation by Cytokines, Growth Factors, Glucocorticoids, Phorbol Esters, and Bacterial Lipopolysaccharide. (1997) doi:10.1095/biolreprod57.6.1438
179. Lim R, Barker G, Lappas M. SMAD7 regulates proinflammatory and prolabor mediators in amnion and myometrium†. *Biology of Reproduction* (2017) **97**:288–301. doi:10.1093/biolre/iox080
180. Poletini J, Behnia F, Taylor BD, Saade GR, Taylor RN, Menon R. Telomere Fragment Induced Amnion Cell Senescence: A Contributor to Parturition? *PLoS One* (2015) **10**: doi:10.1371/journal.pone.0137188
181. Bredeson S, Papaconstantinou J, Deford JH, Kechichian T, Syed TA, Saade GR, Menon R. HMGB1 Promotes a p38MAPK Associated Non-Infectious Inflammatory Response Pathway in Human Fetal Membranes. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0113799
182. Dixon CL, Richardson L, Sheller-Miller S, Saade G, Menon R. A distinct mechanism of senescence activation in amnion epithelial cells by infection, inflammation, and oxidative stress. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) **79**:e12790. doi:10.1111/aji.12790
183. Sheller-Miller S, Trivedi J, Yellon SM, Menon R. Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy. *Scientific Reports* (2019) **9**: doi:10.1038/s41598-018-37002-x
184. Sheller S, Papaconstantinou J, Urrabaz-Garza R, Richardson L, Saade G, Salomon C, Menon R. Amnion-Epithelial-Cell-Derived Exosomes Demonstrate Physiologic State of Cell under Oxidative Stress. *PLoS One* (2016) **11**: doi:10.1371/journal.pone.0157614
185. Sheller-Miller S, Urrabaz-Garza R, Saade G, Menon R. Damage-Associated Molecular Pattern Markers HMGB1 and Cell-Free Fetal Telomere Fragments in Oxidative-Stressed Amnion Epithelial Cell-Derived Exosomes. *J Reprod Immunol* (2017) **123**:3–11. doi:10.1016/j.jri.2017.08.003
186. Hadley EE, Sheller-Miller S, Saade G, Salomon C, Mesiano S, Taylor RN, Taylor BD, Menon R. Amnion epithelial cell-derived exosomes induce inflammatory changes in uterine cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2018) **219**:478.e1-478.e21. doi:10.1016/j.ajog.2018.08.021
187. Lappas M. A20, an essential component of the ubiquitin-editing protein complex, is a negative regulator of inflammation in human myometrium and foetal membranes. *MHR: Basic science of reproductive medicine* (2017) **23**:628–645. doi:10.1093/molehr/gax041
188. Lim R, Barker G, Liong S, Nguyen-Ngo C, Tong S, Kaitu'u-Lino T, Lappas M. ATF3 is a negative regulator of inflammation in human fetal membranes. *Placenta* (2016) **47**:63–72. doi:10.1016/j.placenta.2016.09.006
189. Lim R, Barker G, Lappas M. Pellino 1 is a novel regulator of TNF and TLR signalling in human myometrial and amnion cells. *J Reprod Immunol* (2018) **127**:24–35. doi:10.1016/j.jri.2018.04.003
190. Goradia P, Lim R, Lappas M. DREAM Is Involved in the Genesis of Inflammation-Induced Prolabour Mediators in Human Myometrial and Amnion Cells. *Biomed Res Int* (2018) **2018**: doi:10.1155/2018/8237087
191. Lim R, Lappas M. Expression and function of macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) in inflammation driven parturition in fetal membranes and myometrium. *Clin Exp Immunol* (2019) **197**:95–110. doi:10.1111/cei.13281
192. Lim R, Barker G, Lappas M. Inhibition of PIM1 kinase attenuates inflammation-induced pro-labour mediators in human foetal membranes in vitro. *Mol Hum Reprod* (2017) **23**:428–440. doi:10.1093/molehr/gax013
193. Lim R, Lappas M. Novel anti-inflammatory actions of TIPE2 in human primary amnion and myometrial cells. *Reproduction* (2019) doi:10.1530/REP-19-0063
194. Lim R, Lappas M. GIT2 deficiency attenuates inflammation-induced expression of pro-labor mediators in human amnion and myometrial cells. *Biol Reprod* (2019) **100**:1617–1629. doi:10.1093/biolre/ioz041

195. Lim R, Barker G, Lappas M. PARK7 regulates inflammation-induced pro-labour mediators in myometrial and amnion cells. *Reproduction* (2018) **155**:207–218. doi:10.1530/REP-17-0604
196. Radisky ES, Radisky DC. Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2010) **15**:201–212. doi:10.1007/s10911-010-9177-x
197. Liu M, Qi Y, Zhao L, Chen D, Zhou Y, Zhou H, Lv Y, Zhang L, Jin S, Li S, et al. Matrix metalloproteinase-14 induces epithelial-to-mesenchymal transition in synovial sarcoma. *Human Pathology* (2018) **80**:201–209. doi:10.1016/j.humpath.2017.12.031
198. Zhang Y, Zheng W, Shen K, Shen W. Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting matrix metalloproteinase-9 in endometrial cancer. *Oncology Letters* (2018) **15**:8527–8535. doi:10.3892/ol.2018.8407
199. Duong TD, Erickson CA. MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Developmental Dynamics* (2004) **229**:42–53. doi:10.1002/dvdy.10465
200. Giambernardi TA, Sakaguchi AY, Gluhak J, Pavlin D, Troyer DA, Das G, Rodeck U, Klebe RJ. Neutrophil collagenase (MMP-8) is expressed during early development in neural crest cells as well as in adult melanoma cells. *Matrix Biology* (2001) **20**:577–587. doi:10.1016/S0945-053X(01)00166-4
201. Janzen C, Sen S, Lei MYY, Gagliardi de Assumpcao M, Challis J, Chaudhuri G. The Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Membrane Rupture. *J Clin Endocrinol Metab* (2016) **102**:1261–1269. doi:10.1210/jc.2016-3150
202. Uchida K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* (2000) **95**:851–855.
203. Maradny EE, Kanayama N, Halim A, Maehara K, Terao T. Stretching of fetal membranes increases the concentration of interleukin-8 and collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* (1996) **174**:843–849. doi:10.1016/s0002-9378(96)70311-3
204. Maehara K, Kanayama N, Maradny EE, Uezato T, Fujita M, Terao T. Mechanical stretching induces interleukin-8 gene expression in fetal membranes: a possible role for the initiation of human parturition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (1996) **70**:191–196.
205. Chowdhury B, David AL, Thrasivoulou C, Becker DL, Bader DL, Chowdhury TT. Tensile strain increased COX-2 expression and PGE2 release leading to weakening of the human amniotic membrane. *Placenta* (2014) **35**:1057–1064. doi:10.1016/j.placenta.2014.09.006
206. Barrett DW, John RK, Thrasivoulou C, Mata A, Deprest JA, Becker DL, David AL, Chowdhury TT. Targeting mechanotransduction mechanisms and tissue weakening signals in the human amniotic membrane. *Scientific Reports* (2019) **9**:6718. doi:10.1038/s41598-019-42379-4
207. Mohan AR, Sooranna SR, Lindstrom TM, Johnson MR, Bennett PR. The effect of mechanical stretch on cyclooxygenase type 2 expression and activator protein-1 and nuclear factor-kappaB activity in human amnion cells. *Endocrinology* (2007) **148**:1850–1857. doi:10.1210/en.2006-1289
208. Kanayama N, Fukamizu H. Mechanical stretching increases prostaglandin E2 in cultured human amnion cells. *Gynecol Obstet Invest* (1989) **28**:123–126. doi:10.1159/000293546
209. Menon R. Human Fetal Membranes at Term: Dead Tissue or Signalers of Parturition? *Placenta* (2016) **44**:1–5. doi:10.1016/j.placenta.2016.05.013
210. Menon R, Mesiano S, Taylor RN. Programmed Fetal Membrane Senescence and Exosome-Mediated Signaling: A Mechanism Associated With Timing of Human Parturition. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2017) **8**: doi:10.3389/fendo.2017.00196
211. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* (2014) **15**:1139–1153. doi:10.15252/embr.201439245
212. Badir S, Mazza E, Zimmermann R, Bajka M. Cervical softening occurs early in pregnancy: characterization of cervical stiffness in 100 healthy women using the aspiration technique. *Prenatal Diagnosis* (2013) **33**:737–741. doi:10.1002/pd.4116

213. Timmons B, Akins M, Mahendroo M. Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition. *Trends Endocrinol Metab* (2010) **21**:353–361. doi:10.1016/j.tem.2010.01.011
214. Macdonald PC, Koga S, Casey ML. Decidual Activation in Parturition: Examination of Amniotic Fluid for Mediators of the Inflammatory Response. *Ann NY Acad Sci* (1991) **622**:315–330. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb37877.x
215. Garite TJ, Combs CA. “Obstetric Issues, Labor, and Delivery,” in *Fetal and Neonatal Secrets* (Elsevier), 33–48. doi:10.1016/B978-0-323-09139-8.00003-1
216. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* (2003) **101**:178–193.
217. Sirak B, Mesfin E. Maternal and perinatal outcome of pregnancies with preterm Premature Rupture Of Membranes (pPROM) at Tikur Anbessa specialized teaching hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop Med J* (2014) **52**:165–172.
218. Al-Riyami N, Al-Shezawi F, Al-Ruheili I, Al-Dughaisi T, Al-Khabori M. Perinatal Outcome in Pregnancies with Extreme Preterm Premature Rupture of Membranes (Mid-Trimester PROM). *Sultan Qaboos Univ Med J* (2013) **13**:51–56.
219. van der Marel I, de Jonge R, Duvetkot J, Reiss I, Brussé I. Maternal and Neonatal Outcomes of Preterm Premature Rupture of Membranes before Viability. *Klin Padiatr* (2016) **228**:69–76. doi:10.1055/s-0041-111174
220. Yang LC, Taylor DR, Kaufman HH, Hume R, Calhoun B. Maternal and Fetal Outcomes of Spontaneous Preterm Premature Rupture of Membranes. *J Am Osteopath Assoc* (2004) **104**:537–542. doi:10.7556/jaoa.2004.104.12.537
221. Webb GA. Maternal death associated with premature rupture of the membranes: An analysis of 54 cases. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1967) **98**:594–601. doi:10.1016/0002-9378(67)90170-6
222. Linehan LA, Walsh J, Morris A, Kenny L, O’Donoghue K, Dempsey E, Russell N. Neonatal and maternal outcomes following midtrimester preterm premature rupture of the membranes: a retrospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth* (2016) **16**:25. doi:10.1186/s12884-016-0813-3
223. Jaiswal AA, Hariharan C, Dewani DKC. Study of maternal and fetal outcomes in premature rupture of membrane in central rural India. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* (2017) **6**:1409. doi:10.18203/2320-1770.ijrcog20171400
224. Khashoggi TY. Outcome of pregnancies with preterm premature rupture of membranes. *Saudi Med J* (2004) **25**:1957–1961.
225. Holmgren PA, Olofsson JI. Preterm premature rupture of membranes and the associated risk for placental abruption. Inverse correlation to gestational length. *Acta Obstet Gynecol Scand* (1997) **76**:743–747.
226. Suzuki S. Clinical Significance of Preterm Singleton Pregnancies Complicated by Placental Abruption following Preterm Premature Rupture of Membranes Compared with Those without p-PROM. *ISRN Obstet Gynecol* (2012) **2012**: doi:10.5402/2012/856971
227. Ananth C, Oyelese Y, Srinivas N, Yeo L, Vintzileos A. Preterm Premature Rupture of Membranes, Intrauterine Infection, and Oligohydramnios: Risk Factors for Placental Abruption. *Obstetrics & Gynecology* (2004) **104**:71–77. doi:10.1097/01.AOG.0000128172.71408.a0
228. Vintzileos AM, Campbell WA, Nochimson DJ, Weinbaum PJ. Preterm premature rupture of the membranes: a risk factor for the development of abruptio placentae. *Am J Obstet Gynecol* (1987) **156**:1235–1238. doi:10.1016/0002-9378(87)90153-0
229. Nelson DM, Stempel LE, Zuspan FP. Association of prolonged, preterm premature rupture of the membranes and abruptio placentae. *J Reprod Med* (1986) **31**:249–253.
230. Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri A, Erez O, Mazor M. Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2000) **92**:209–216. doi:10.1016/S0301-2115(99)00257-2

231. Seo K, McGregor JA, French JI. Preterm birth is associated with increased risk of maternal and neonatal infection. *Obstet Gynecol* (1992) **79**:75–80.
232. Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol* (2005) **32**:571–600. doi:10.1016/j.clp.2005.05.001
233. Verspyck E, Landman T, Marpeau L. Méthodes diagnostiques et critères pronostiques en cas de rupture prématurée des membranes (hormis les marqueurs de l'infection). *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* (1999) **28**:626.
234. Adoni A, Ben Chetrit A, Zacut D, Palti Z, Hurwitz A. Prolongation of the latent period in patients with premature rupture of the membranes by avoiding digital examination. *Int J Gynaecol Obstet* (1990) **32**:19–21.
235. Newton ER, Prihoda TJ, Gibbs RS. Logistic regression analysis of risk factors for intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* (1989) **73**:571–575.
236. Schreiber J, Benedetti T. Conservative management of preterm premature rupture of the fetal membranes in a low socioeconomic population. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1980) **136**:92–96. doi:10.1016/0002-9378(80)90572-4
237. Burchell RC. Premature spontaneous rupture of the membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1964) **88**:251–255. doi:10.1016/0002-9378(64)90265-0
238. Shepherd E, Flenady V, McBain RD, Crowther CA, Middleton P. Planned early birth versus expectant management (waiting) for prelabour rupture of membranes at term (37 weeks or more). *Cochrane Database Syst Rev* (2017) **2017**: doi:10.1002/14651858.CD005302.pub3
239. Mondal A, Kanoongo S. A study on management of premature rupture of membranes. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* (2018) **7**:855. doi:10.18203/2320-1770.ijrcog20180412
240. Dale PO, Tanbo T, Bendvold E, Moe N. Duration of the latency period in preterm premature rupture of the membranes. Maternal and neonatal consequences of expectant management. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (1989) **30**:257–262. doi:10.1016/0028-2243(89)90010-5
241. Beckmann CRB. *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams & Wilkins (2010).
242. Sayed Ahmed WA, Hamdy MA. Optimal management of umbilical cord prolapse. *Int J Womens Health* (2018) **10**:459–465. doi:10.2147/IJWH.S130879
243. Murphy DJ, MacKenzie IZ. The mortality and morbidity associated with umbilical cord prolapse. *Br J Obstet Gynaecol* (1995) **102**:826–830. doi:10.1111/j.1471-0528.1995.tb10850.x
244. Khan RS, Naru T, Nizami F. Umbilical cord prolapse--a review of diagnosis to delivery interval on perinatal and maternal outcome. *J Pak Med Assoc* (2007) **57**:487–491.
245. Ocviyanti D, Wahono WT. Risk Factors for Neonatal Sepsis in Pregnant Women with Premature Rupture of the Membrane. *J Pregnancy* (2018) **2018**:4823404. doi:10.1155/2018/4823404
246. Chan GJ, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Risk of Early-Onset Neonatal Infection with Maternal Infection or Colonization: A Global Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med* (2013) **10**: doi:10.1371/journal.pmed.1001502
247. Pryles CV, Steg NL, Nair S, Gellis SS, Tenney B. A Controlled Study of the Influence on the Newborn of Prolonged Premature Rupture of the Amniotic Membranes and/or Infection in the Mother. *Pediatrics* (1963) **31**:608–622.
248. Torchin H, Ancel P-Y. [Epidemiology and risk factors of preterm birth]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* (2016) **45**:1213–1230. doi:10.1016/j.jgyn.2016.09.013
249. Platt MJ. Outcomes in preterm infants. *Public Health* (2014) **128**:399–403. doi:10.1016/j.puhe.2014.03.010
250. Epipage. Available at: <https://epipage2.inserm.fr/index.php/fr/> [Accessed August 16, 2019]
251. EPICure. Available at: <http://www.epicure.ac.uk/> [Accessed August 16, 2019]
252. Getahun D, Strickland D, Ananth CV, Fassett MJ, Sacks DA, Kirby RS, Jacobsen SJ. Recurrence of preterm premature rupture of membranes in relation to interval between pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* (2010) **202**:570.e1–6. doi:10.1016/j.ajog.2009.12.010

253. Asrat T, Lewis DF, Garite TJ, Major CA, Nageotte MP, Towers CV, Montgomery DM, Dorchester WA. Rate of recurrence of preterm premature rupture of membranes in consecutive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* (1991) **165**:1111–1115. doi:10.1016/0002-9378(91)90481-6
254. Lee T, Carpenter MW, Heber WW, Silver HM. Preterm premature rupture of membranes: risks of recurrent complications in the next pregnancy among a population-based sample of gravid women. *Am J Obstet Gynecol* (2003) **188**:209–213. doi:10.1067/mob.2003.115
255. van der Heyden JL, van Kuijk SMJ, van der Ham DP, Notten KJB, Janssen T, Nijhuis JG, Willekes C, Porath M, van der Post JA, Halbertsma F, et al. Subsequent Pregnancy after Preterm Prelabor Rupture of Membranes before 27 Weeks' Gestation. *AJP Rep* (2013) **3**:113–118. doi:10.1055/s-0033-1353389
256. Boskabadi H, Maamouri G, Mafinejad S. Neonatal Complications Related with Prolonged Rupture of Membranes. *Clinical Science* (2011)
257. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, Knox GE, Polk BF. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol* (1990) **163**:130–137. doi:10.1016/s0002-9378(11)90686-3
258. Silverman R, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns* (1998) **5**:181.
259. Hackenhaar AA, Albernaz EP, Fonseca TMV da, Hackenhaar AA, Albernaz EP, Fonseca TMV da. Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections. *Jornal de Pediatria* (2014) **90**:197–202. doi:10.1016/j.jped.2013.08.003
260. 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* (2013) **30**:821–826. doi:10.1055/s-0032-1333408
261. Ekwo EE, Gosselink CA, Moawad A. Unfavorable outcome in penultimate pregnancy and premature rupture of membranes in successive pregnancy. *Obstet Gynecol* (1992) **80**:166–172.
262. Nabet C, Lelong N, Ancel P-Y, Saurel-Cubizolles M-J, Kaminski M. Smoking during pregnancy according to obstetric complications and parity: results of the EUROPOP study. *Eur J Epidemiol* (2007) **22**:715–721. doi:10.1007/s10654-007-9172-8
263. Homsup P, Phaloprakarn C, Tangjitgamol S, Manusirivithaya S. Maternal characteristics and pregnancy outcomes among illicit drug-using women in an urban setting. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* (2018) **57**:83–88. doi:10.1016/j.tjog.2017.12.014
264. Neerhof MG, MacGregor SN, Retzky SS, Sullivan TP. Cocaine abuse during pregnancy: peripartum prevalence and perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* (1989) **161**:633–638. doi:10.1016/0002-9378(89)90368-2
265. Cherukuri R, Minkoff H, Feldman J, Parekh A, Glass L. A cohort study of alkaloidal cocaine (“crack”) in pregnancy. *Obstet Gynecol* (1988) **72**:147–151.
266. Addis A, Moretti ME, Ahmed Syed F, Einarson TR, Koren G. Fetal effects of cocaine: an updated meta-analysis. *Reproductive Toxicology* (2001) **15**:341–369. doi:10.1016/S0890-6238(01)00136-8
267. Myles TD, Espinoza R, Meyer W, Bieniarz A, Nguyen T. Effects of smoking, alcohol, and drugs of abuse on the outcome of “expectantly” managed cases of preterm premature rupture of membranes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* (1998) **7**:157–161. doi:10.3109/14767059809020433
268. Rau MJ, Rusdianingsih D, Arifuddin A, Herawanto -, Nur R, Salmawati L, Pitriani -. Impact of smoke exposure and preeclampsia to premature rupture of membranes ; Case study in Anutapura Hospital. *ASIAN JOURNAL OF ENVIRONMENT, HISTORY AND HERITAGE* (2018) **2**:
269. Abdelati DIH, Ibrahim S. The Health Effects of Exposure to Secondhand Smoke on Labor Outcome and Neonates Parameters: A prospective study. (2016)
270. Maryam Eftekhari, Soheila Pourmasumi, Parvin Sabet, Fatane Mirhossein. Relation of Second Hand Smoker and Effect on Pregnancy Outcome and Newborns Parameters. *Women's Health & Gynecology* (2016) **2**:6.

271. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Poletini J, Syed TA, Fortunato SJ, Saade GR, Papaconstantinou J, Taylor RN. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol* (2014) **184**:1740–1751. doi:10.1016/j.ajpath.2014.02.011
272. Kovavisarach E, Sermsak P. Risk factors related to premature rupture of membranes in term pregnant women: a case-control study. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* (2000) **40**:30–32. doi:10.1111/j.1479-828X.2000.tb03162.x
273. Gaillard R, Durmuş B, Hofman A, Mackenbach JP, Steegers EAP, Jaddoe VWV. Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Obesity* (2013) **21**:1046–1055. doi:10.1002/oby.20088
274. Zhong Y, Cahill AG, Macones GA, Zhu F, Odibo AO. The association between prepregnancy maternal body mass index and preterm delivery. *Am J Perinatol* (2010) **27**:293–298. doi:10.1055/s-0029-1241736
275. Choudhary M, Rathore S, Chowdhary J, Garg S. Pre and post conception risk factors in PROM. *International Journal of Research in Medical Sciences* (2015) 2594–2598. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20150797
276. Faucett AM, Metz TD, DeWitt PE, Gibbs RS. Effect of obesity on neonatal outcomes in pregnancies with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* (2016) **214**:287.e1-287.e5. doi:10.1016/j.ajog.2015.09.093
277. Casanueva E, Ripoll C, Tolentino M, Morales RM, Pfeffer F, Vilchis P, Vadillo-Ortega F. Vitamin C supplementation to prevent premature rupture of the chorioamniotic membranes: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* (2005) **81**:859–863. doi:10.1093/ajcn/81.4.859
278. Hajifoghaha M, Keshavarz T, Parsanejad ME, Rajaei Fard A. Vitamin C Supplementation and PROM. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* (2008) **11**:33–39.
279. Sharma R, Mehta S. Ascorbic Acid Concentration and Preterm Premature Rupture of Membranes. *J Obstet Gynaecol India* (2014) **64**:417–420. doi:10.1007/s13224-014-0570-z
280. Osaikhuwuomwan JA, Okpere EE, Okonkwo CA, Ande AB, Idogun ES. Plasma vitamin C levels and risk of preterm prelabour rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* (2011) **284**:593–597. doi:10.1007/s00404-010-1741-5
281. Darma IY, Amir A, Basyir V. The Relationship Vitamin C Level and MMP-2 Serum with Premature Rupture of Membranes and Normal Pregnancy. *World Journal of Research and Review* (2018) **7**: doi:10.31871/WJRR.7.4.8
282. Stuart EL, Evans GS, Lin YS, Powers HJ. Reduced Collagen and Ascorbic Acid Concentrations and Increased Proteolytic Susceptibility with Prelabor Fetal Membrane Rupture in Women. *Biol Reprod* (2005) **72**:230–235. doi:10.1095/biolreprod.104.033381
283. Nusgens BV, Humbert P, Rougier A, Colige AC, Haftek M, Lambert CA, Richard A, Creidi P, Lapière CM. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol* (2001) **116**:853–859. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01362.x
284. Huang TL, Yang CH, Yanai G, Liao JY, Sumi S, Yang KC. Synergistic effect of l-ascorbic acid and hyaluronic acid on the expressions of matrix metalloproteinase-3 and -9 in human chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* (2018) **106**:1809–1817. doi:10.1002/jbm.b.33988
285. Kim JE, Lee J, Kim H, Kim J, Cho Y. Effect of Vitamin C, Silicon and Iron on Collagen Synthesis and Break-Down Enzyme Expression in the Human Dermal Fibroblast Cell (HS27). *Korean J Nutr* (2009) **42**:505. doi:10.4163/kjn.2009.42.6.505
286. Phillips CL, Combs SB, Pinnell SR. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* (1994) **103**:228–232. doi:10.1111/1523-1747.ep12393187
287. Hantke B, Lahmann C, Venzke K, Fischer T, Kocourek A, Windsor LJ, Bergemann J, Stäb F, Tschesche H. Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem Photobiol Sci* (2002) **1**:826–833.

288. Vadillo Ortega F, Pfeffer Burak F, Bermejo Martínez ML, Hernández Miranda MA, Beltrán Montoya J, Tejero Barrera E, Casanueva y López E. [Dietetic factors and premature rupture of fetal membranes. Effect of vitamin C on collagen degradation in the chorioamnion]. *Ginecol Obstet Mex* (1995) **63**:158–162.
289. Zhang Q, Ananth CV, Li Z, Smulian JC. Maternal anaemia and preterm birth: a prospective cohort study. *Int J Epidemiol* (2009) **38**:1380–1389. doi:10.1093/ije/dyp243
290. Pratiwi PI, Emilia O, Kartini F. The effect of anemia on the incidence of PROM in Kertha Usada Hospital, Singaraja, BALI. *Belitung Nursing Journal* (2018) **4**:336–342. doi:10.33546/bnj.391
291. Allen LH. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J Nutr* (2001) **131**:581S-589S. doi:10.1093/jn/131.2.581S
292. Li W, Challis JRG. Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* (2005) **90**:6569–6574. doi:10.1210/jc.2005-1445
293. Wolfe CD, Patel SP, Linton EA, Campbell EA, Anderson J, Dornhorst A, Lowry PJ, Jones MT. Plasma corticotrophin-releasing factor (CRF) in abnormal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* (1988) **95**:1003–1006. doi:10.1111/j.1471-0528.1988.tb06504.x
294. Sae-Lin P, Wanitpongpan P. Incidence and risk factors of preterm premature rupture of membranes in singleton pregnancies at Siriraj Hospital. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* (2019) **45**:573–577. doi:10.1111/jog.13886
295. Basirat Z, Asnafi N, Kashifard M. Correlation between Abnormal Glucose Challenge Test and Pregnancy Outcomes. *Journal of Reproduction & Infertility* (2010) **11**:113–119.
296. Ding T, Xiang J, Luo B, Hu J. Relationship between the IADPSG-criteria-defined abnormal glucose values and adverse pregnancy outcomes among women having gestational diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)* (2018) **97**: doi:10.1097/MD.00000000000012920
297. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* (1991) **325**:836–842. doi:10.1056/NEJM199109193251202
298. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. */data/revues/12623636/00270005/535/* (2008)
299. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* (2015) **5**:194–222. doi:10.3390/biom5010194
300. Kansu-Celik H, Tasci Y, Karakaya BK, Cinar M, Candar T, Caglar GS. Maternal serum advanced glycation end products level as an early marker for predicting preterm labor/PPROM: a prospective preliminary study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019) **32**:2758–2762. doi:10.1080/14767058.2018.1449202
301. Shen TT, DeFranco EA, Stamilio DM, Chang JJ, Muglia LJ. A population-based study of race-specific risk for preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2008) **199**:373.e1-373.e7. doi:10.1016/j.ajog.2008.05.011
302. Savitz DA, Blackmore CA, Thorp JM. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: etiologic heterogeneity. *Am J Obstet Gynecol* (1991) **164**:467–471.
303. Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Ferrand PE, Kuivaniemi H, Tromp G, Halder I, Shriver MD, Romero R, et al. Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Hum Mol Genet* (2004) **13**:2659–2669. doi:10.1093/hmg/ddh287
304. Ferrand PE, Parry S, Sammel M, Macones GA, Kuivaniemi H, Romero R, Strauss JF. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod* (2002) **8**:494–501. doi:10.1093/molehr/8.5.494
305. Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Kuivaniemi H, Tromp G, Argyropoulos G, Halder I, Shriver MD, Romero R, et al. A functional SNP in the promoter of the SERPINH1 gene increases

- risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) **103**:13463–13467. doi:10.1073/pnas.0603676103
306. Modi BP, Teves ME, Pearson LN, Parikh HI, Haymond-Thornburg H, Tucker JL, Chaemsaitong P, Gomez-Lopez N, York TP, Romero R, et al. Mutations in fetal genes involved in innate immunity and host defense against microbes increase risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Mol Genet Genomic Med* (2017) **5**:720–729. doi:10.1002/mgg3.330
307. Modi BP, Teves ME, Pearson LN, Parikh HI, Chaemsaitong P, Sheth NU, York TP, Romero R, Strauss JF. Rare mutations and potentially damaging missense variants in genes encoding fibrillar collagens and proteins involved in their production are candidates for risk for preterm premature rupture of membranes. *PLoS One* (2017) **12**: doi:10.1371/journal.pone.0174356
308. Modi BP, Parikh HI, Teves ME, Kulkarni R, Liyu J, Romero R, York TP, Strauss JF. Discovery of rare ancestry-specific variants in the fetal genome that confer risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM) and preterm birth. *BMC Med Genet* (2018) **19**: doi:10.1186/s12881-018-0696-4
309. Treadwell MC, Bronsteen RA, Bottoms SF. Prognostic factors and complication rates for cervical cerclage: a review of 482 cases. *Am J Obstet Gynecol* (1991) **165**:555–558. doi:10.1016/0002-9378(91)90283-w
310. Charles D, Edwards WR. Infectious complications of cervical cerclage. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1981) **141**:1065–1071. doi:10.1016/S0002-9378(16)32698-9
311. Borgida AF, Mills AA, Feldman DM, Rodis JF, Egan JF. Outcome of pregnancies complicated by ruptured membranes after genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* (2000) **183**:937–939. doi:10.1067/mob.2000.108872
312. Vigeh M, Yokoyama K, Shinohara A, Afshinrokh M, Yunesian M. Early pregnancy blood lead levels and the risk of premature rupture of the membranes. *Reprod Toxicol* (2010) **30**:477–480. doi:10.1016/j.reprotox.2010.05.007
313. Fahim MS, Fahim Z, Hall DG. Effects of subtoxic lead levels on pregnant women in the state of Missouri. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1976) **13**:309–331.
314. Baghurst PA, Robertson EF, Oldfield RK, King BM, McMichael AJ, Vimpani GV, Wigg NR. Lead in the placenta, membranes, and umbilical cord in relation to pregnancy outcome in a lead-smelter community. *Environ Health Perspect* (1991) **90**:315–320. doi:10.1289/ehp.90-1519491
315. Huang S, Xia W, Sheng X, Qiu L, Zhang B, Chen T, Xu S, Li Y. Maternal lead exposure and premature rupture of membranes: a birth cohort study in China. *BMJ Open* (2018) **8**:e021565. doi:10.1136/bmjopen-2018-021565
316. Falcón M, Viñas P, Luna A. Placental lead and outcome of pregnancy. *Toxicology* (2003) **185**:59–66.
317. Huang S, Xia W, Li Y, Zhang B, Zhou A, Zheng T, Qian Z, Huang Z, Lu S, Chen Z, et al. Association between maternal urinary chromium and premature rupture of membranes in the Healthy Baby Cohort study in China. *Environmental Pollution* (2017) **230**:53–60. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.050
318. Jin S, Xia W, Jiang Y, Sun X, Huang S, Zhang B, Zhou A, Zheng T, Xu S, Li Y. Urinary vanadium concentration in relation to premature rupture of membranes: A birth cohort study. *Chemosphere* (2018) **210**:1035–1041. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.07.110
319. Yorifuji T, Naruse H, Kashima S, Ohki S, Murakoshi T, Takao S, Tsuda T, Doi H. Residential proximity to major roads and preterm births. *Epidemiology* (2011) **22**:74–80. doi:10.1097/EDE.0b013e3181fe759f
320. Dadvand P, Basagaña X, Figueras F, Martinez D, Beelen R, Cirach M, de Nazelle A, Hoek G, Ostro B, Nieuwenhuijsen MJ. Air Pollution and Preterm Premature Rupture of Membranes: A Spatiotemporal Analysis. *Am J Epidemiol* (2014) **179**:200–207. doi:10.1093/aje/kwt240
321. Pereira G, Bell ML, Belanger K, de Klerk N. Fine particulate matter and risk of preterm birth and pre-labor rupture of membranes in Perth, Western Australia 1997–2007: a longitudinal study. *Environ Int* (2014) **73**:143–149. doi:10.1016/j.envint.2014.07.014

322. Wallace ME, Grantz KL, Liu D, Zhu Y, Kim SS, Mendola P. Exposure to Ambient Air Pollution and Premature Rupture of Membranes. *Am J Epidemiol* (2016) **183**:1114–1121. doi:10.1093/aje/kwv284
323. Joyce SJ, Cook A, Newnham J, Brenters M, Ferguson C, Weinstein P. Water disinfection by-products and pre-labor rupture of membranes. *Am J Epidemiol* (2008) **168**:514–521. doi:10.1093/aje/kwn188
324. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhaas C, Das A, Menard MK, Caritis SN, Thurnau GR, Dombrowski MP, et al. The Preterm Prediction Study: Prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000) **183**:738–745. doi:10.1067/mob.2000.106766
325. Lallar M, Anam ul Haq, Nandal R. Perinatal Outcome in Idiopathic Polyhydramnios. *J Obstet Gynaecol India* (2015) **65**:310–314. doi:10.1007/s13224-014-0625-1
326. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, Paidas M, Buchwalder L, Krikun G, Schatz F. Mechanisms of Abruption-Induced Premature Rupture of the Fetal Membranes. *Am J Pathol* (2005) **167**:1443–1449.
327. Ebbing C, Johnsen SL, Albrechtsen S, Sunde ID, Vekseth C, Rasmussen S. Velamentous or marginal cord insertion and the risk of spontaneous preterm birth, prelabor rupture of the membranes, and anomalous cord length, a population-based study. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2017) **96**:78–85. doi:10.1111/aogs.13035
328. Hua M, Odibo AO, Longman RE, Macones GA, Roehl KA, Cahill AG. Congenital uterine anomalies and adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2011) **205**:558.e1-558.e5. doi:10.1016/j.ajog.2011.07.022
329. Spinillo A, Nicola S, Piazzi G, Ghazal K, Colonna L, Baltaro F. Epidemiological correlates of preterm premature rupture of membranes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* (1994) **47**:7–15. doi:10.1016/0020-7292(94)90454-5
330. Naeye RL, Peters EC. Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. *Lancet* (1980) **1**:192–194.
331. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaitong P, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Yoon BH, Hassan SS, et al. Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *Am J Reprod Immunol* (2014) **72**:458–474. doi:10.1111/aji.12296
332. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2015) **213**:S29–S52. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.040
333. Higgins RD, Saade G, Polin RA, Grobman WA, Buhimschi IA, Watterberg K, Silver RM, Raju TN. Evaluation and Management of Women and Newborns With a Maternal Diagnosis of Chorioamnionitis: Summary of a Workshop. *Obstet Gynecol* (2016) **127**:426–436. doi:10.1097/AOG.0000000000001246
334. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* (2011) **118**:164–174. doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02766.x@10.1002/(ISSN)1471-0528(CAT)ThemedIssues(VI)January2011Infectionsinpregnancy
335. Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, Knox CL. The Human *Ureaplasma* Species as Causative Agents of Chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev* (2017) **30**:349–379. doi:10.1128/CMR.00091-16
336. Kacerovský M, Boudys L. [Preterm premature rupture of membranes and *Ureaplasma urealyticum*]. *Ceska Gynekol* (2008) **73**:154–159.
337. Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2009) **52**:117–120.
338. Kwak D-W, Hwang H-S, Kwon J-Y, Park Y-W, Kim Y-H. Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2014) **27**:333–337. doi:10.3109/14767058.2013.818124

339. Paramel Jayaprakash T, Wagner EC, van Schalkwyk J, Albert AYK, Hill JE, Money DM, PPRM Study Group. High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort Study. *PLOS ONE* (2016) **11**:e0166794. doi:10.1371/journal.pone.0166794
340. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* (1988) **319**:972–978. doi:10.1056/NEJM198810133191503
341. Cox C, Saxena N, Watt AP, Gannon C, McKenna JP, Fairley DJ, Sweet D, Shields MD, L Cosby S, Coyle PV. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2016) **29**:3646–3651. doi:10.3109/14767058.2016.1140734
342. Musilova I, Pliskova L, Kutova R, Hornychova H, Jacobsson B, Kacerovsky M. *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in cervical fluid of pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2016) **29**:1–7. doi:10.3109/14767058.2014.984606
343. Latino MA, Botta G, Badino C, Maria DD, Petrozziello A, Sensini A, Leli C. Association between genital mycoplasmas, acute chorioamnionitis and fetal pneumonia in spontaneous abortions. *J Perinat Med* (2018) **46**:503–508. doi:10.1515/jpm-2016-0305
344. Blanchard A, Hamrick W, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Use of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma genitalium* in the Urogenital Tract and Amniotic Fluid. (1993)
345. Martin LF, Moço NP, de Lima MD, Polettini J, Miot HA, Corrêa CR, Menon R, da Silva MG. Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery. *BMC Pregnancy Childbirth* (2017) **17**:376. doi:10.1186/s12884-017-1549-4
346. Longini M, Perrone S, Vezzosi P, Marzocchi B, Kenanidis A, Centini G, Rosignoli L, Buonocore G. Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. *Clinical Biochemistry* (2007) **40**:793–797. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.03.004
347. Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M, Menon R. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod* (2016) **22**:143–157. doi:10.1093/molehr/gav074
348. Maleki J, Haghghi L, Korani M, Fallah S, Firozrai M, Seifi M. Maternal oxidative stress and enzymatic antioxidant status in premature rupture of membranes. *Afr J Biochem Res* (2012)
349. Ilhan N, Aygun BK, Gungor H. The relationship between the latency period, infection markers, and oxidant and antioxidant states in women with preterm premature rupture of membranes. *Ir J Med Sci* (2017) **186**:965–970. doi:10.1007/s11845-017-1570-7
350. Ilhan N, Celik E, Kumbak B. Maternal plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, vitamins C, E and A, 8-isoprostane and oxidative status in women with preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2015) **28**:316–319. doi:10.3109/14767058.2014.916674
351. Kim YH, Noh EJ, Back JA, Kim JW, Song T-B. Oxidative Stress Markers in the Venous Plasma of Women with Preterm Labor and Preterm Premature Rupture of Membranes. *Korean J Perinatol* (2015) **26**:336. doi:10.14734/kjp.2015.26.4.336
352. Menon R. Oxidative Stress Damage as a Detrimental Factor in Preterm Birth Pathology. *Front Immunol* (2014) **5**: doi:10.3389/fimmu.2014.00567
353. Yin B, Zhen M. [Lipid peroxidation in plasma and the activity of superoxide dismutase (SOD) in pregnant women with premature rupture of membrane]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (1995) **75**:463–465, 509.
354. Soydinc HE, Sak ME, Evliyaoglu O, Evsen MS, Turgut A, Özler A, Yıldız İ, Gul T. Prolidase, Matrix Metalloproteinases 1 and 13 Activity, Oxidative-Antioxidative Status as a Marker of

- Preterm Premature Rupture of Membranes and Chorioamnionitis in Maternal Vaginal Washing Fluids. *Int J Med Sci* (2013) **10**:1344–1351. doi:10.7150/ijms.4802
355. Ghomian N, Hafizi L, Takhti Z. The Role of Vitamin C in Prevention of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Iran Red Crescent Med J* (2013) **15**:113–116. doi:10.5812/ircmj.5138
356. Tara F, Rayman MP, Boskabadi H, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, Yazarlu O, Ouladan S, Tavallaie S, Azimi-Nezhad M, Shakeri MT, et al. Selenium supplementation and premature (pre-labour) rupture of membranes: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *J Obstet Gynaecol* (2010) **30**:30–34. doi:10.3109/01443610903267507
357. Ayad MT, Taylor BD, Menon R. Regulation of p38 mitogen-activated kinase-mediated fetal membrane senescence by statins. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) **80**:e12999. doi:10.1111/aji.12999
358. Ozer E. Telomerase activity of chorionic trophoblasts in preterm premature rupture of membranes. *Pediatr Dev Pathol* (2008) **11**:344–349. doi:10.2350/07-10-0361.1
359. Dixon CL, Sheller-Miller S, Saade GR, Fortunato SJ, Lai A, Palma C, Guanzon D, Salomon C, Menon R. Amniotic Fluid Exosome Proteomic Profile Exhibits Unique Pathways of Term and Preterm Labor. *Endocrinology* (2018) **159**:2229–2240. doi:10.1210/en.2018-00073
360. Menon R, Dixon CL, Sheller-Miller S, Fortunato SJ, Saade GR, Palma C, Lai A, Guanzon D, Salomon C. Quantitative Proteomics by SWATH-MS of Maternal Plasma Exosomes Determine Pathways Associated With Term and Preterm Birth. *Endocrinology* (2019) **160**:639–650. doi:10.1210/en.2018-00820
361. Liu C, Yang Q, Fang G, Li B-S, Wu D-B, Guo W-J, Hong S-S, Hong L. Collagen metabolic disorder induced by oxidative stress in human uterosacral ligament-derived fibroblasts: A possible pathophysiological mechanism in pelvic organ prolapse. *Molecular Medicine Reports* (2016) **13**:2999–3008. doi:10.3892/mmr.2016.4919
362. Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, Borel JP. Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. *Biochem Pharmacol* (1983) **32**:53–58. doi:10.1016/0006-2952(83)90651-2
363. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol, Cell Physiol* (2001) **280**:C53–60. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.1.C53
364. Curran SF, Amoruso MA, Goldstein BD, Berg RA. Degradation of soluble collagen by ozone or hydroxyl radicals. *FEBS Lett* (1984) **176**:155–160. doi:10.1016/0014-5793(84)80931-x
365. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala-Ruiz A, Lama MS. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* (1990) **75**:84–88.
366. Skinner SJ, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* (1981) **57**:487–489.
367. Horgan CE, Roumimper H, Tucker R, Lechner BE. Altered Decorin and Smad Expression in Human Fetal Membranes in PPRM. *Biol Reprod* (2014) **91**: doi:10.1095/biolreprod.114.121236
368. Nishihara S, Someya A, Yonemoto H, Ota A, Itoh S, Nagaoka I, Takeda S. Evaluation of the expression and enzyme activity of matrix metalloproteinase-7 in fetal membranes during premature rupture of membranes at term in humans. *Reprod Sci* (2008) **15**:156–165. doi:10.1177/1933719107310308
369. Polettini 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. *Journal of Perinatal Medicine* (2015) **0**: doi:10.1515/jpm-2014-0337
370. Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* (2006) **13**:592–597. doi:10.1016/j.jsg.2006.10.001
371. Wang H, Zhou C, Zhang Y. [Role of matrix metalloproteinase-2,9 and their inhibitors in premature rupture of membranes]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* (2005) **40**:29–33.

372. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* (1999) **27**:362–368. doi:10.1515/JPM.1999.049
373. Lu D, Wang Z, Wang X, Gu X, Wang Y, Fu D. [Clinical significance of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase -1 imbalance in maternal serum, amniotic fluid, umbilical cord serum in patients with premature rupture of the membranes]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* (2006) **41**:20–24.
374. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Athayde N, Edwin S, Yoon BH. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* (2000) **183**:94–99. doi:10.1067/mob.2000.105344
375. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* (2000) **183**:914–920. doi:10.1067/mob.2000.108879
376. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Edwin SS, Gomez R, Seubert DE. Matrilysin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* (2000) **182**:1545–1553. doi:10.1067/mob.2000.107652
377. Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon R. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* (1998) **179**:1248–1253. doi:10.1016/s0002-9378(98)70141-3
378. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* (2001) **184**:1399–1405; discussion 1405-1406. doi:10.1067/mob.2001.115122
379. Litwiniuk M, Radowicka M, Krejner A, Wielgoś M, Grzela T. The MMP-9/TIMP-1 imbalance and the reduced level of TGF- β in the cervical area of amniotic membrane is a possible risk factor of PROM and premature labor - proof-of-concept study. *Ginekol Pol* (2017) **88**:379–384. doi:10.5603/GP.a2017.0071
380. Zhang H, Chen H, Shan L. [Study on the relationship between copper, lysyl oxidase and premature rupture of membranes]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* (2006) **41**:7–11.
381. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1996) **174**:1371–1376. doi:10.1016/S0002-9378(96)70687-7
382. Calmus ML, Macksoud EE, Tucker R, Iozzo RV, Lechner BE. A mouse model of spontaneous preterm birth based on the genetic ablation of biglycan and decorin. *Reproduction* (2011) **142**:183–194. doi:10.1530/REP-10-0387
383. Mogami H, Keller PW, Shi H, Word RA. Effect of Thrombin on Human Amnion Mesenchymal Cells, Mouse Fetal Membranes, and Preterm Birth. *J Biol Chem* (2014) **289**:13295–13307. doi:10.1074/jbc.M114.550541
384. Mogami H, Kishore AH, Shi H, Keller PW, Akgul Y, Word RA. Fetal Fibronectin Signaling Induces Matrix Metalloproteases and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Amnion Cells and Preterm Birth in Mice. *J Biol Chem* (2013) **288**:1953–1966. doi:10.1074/jbc.M112.424366
385. Vadillo Ortega F, Arechevaleta F, Beltrán Montoya J. [Apoptosis and extracellular matrix degradation in chorio-amnion during labor and premature membrane rupture]. *Ginecol Obstet Mex* (1998) **66**:202–207.
386. Canzoneri BJ, Feng L, Grotegut CA, Bentley RC, Heine RP, Murtha AP. The Chorion Layer of Fetal Membranes Is Prematurely Destroyed in Women With Preterm Premature Rupture of the Membranes. *Reprod Sci* (2013) **20**:1246–1254. doi:10.1177/1933719113483009
387. Sağol S, Sağol O, Ozkal S, Asena U. Role of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* (2002) **47**:809–815.

388. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2000) **182**:1468–1476. doi:10.1067/mob.2000.107330
389. Wang X-J, Li L, Cui S-H. [Role of collagen III, CTGF and TNF-alpha in premature rupture of human fetal membranes]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* (2009) **40**:658–661, 675.
390. Negara K, Suwiyoga K, Pemayun T, Sudewi AA, Astawa N, Arijana IG, Tunas K. The Role of Caspase-3, Apoptosis-Inducing Factor, and B-cell Lymphoma-2 Expressions in Term Premature Rupture of Membrane. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics* (2018) **40**:733–739. doi:10.1055/s-0038-1675611
391. Weiyuan Z, Li W. Study of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in maternal serum and amniotic fluid of patients with premature rupture of membranes. *J Perinat Med* (1998) **26**:491–494.
392. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynaecol Obstet* (2002) **79**:209–215.
393. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* (2004) **52**:45–52. doi:10.1111/j.1600-0897.2004.00181.x
394. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* (2001) **18**:276–284. doi:10.1023/a:1016626620137
395. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol* (1992) **166**:1576–1587. doi:10.1016/0002-9378(92)91636-o
396. Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Yoon BH, Edwin SS. Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* (2000) **182**:135–141. doi:10.1016/s0002-9378(00)70502-3
397. Zou L, Zhang H, Zhu J, Zhu J. The value of the soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in maternal serum for determination of occult chorioamnionitis in premature rupture of membranes. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* (2004) **24**:154–157.
398. Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Yuan B, Yamakawa T. Apoptosis in cultured human fetal membrane cells infected with influenza virus. *Biol Pharm Bull* (2002) **25**:109–114. doi:10.1248/bpb.25.109
399. Uchide N, Suzuki A, Ohyama K, Bessho T, Toyoda H. Secretion of Bioactive Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Proteins from Primary Cultured Human Fetal Membrane Chorion Cells Infected with Influenza Virus. *Placenta* (2006) **27**:678–690. doi:10.1016/j.placenta.2005.06.004
400. Fortunato SJ, Lombardi SJ, Menon R. Immunoreactivity of human fetal membranes to peptidoglycan polysaccharide (PGPS): cytokine response. *J Perinat Med* (1998) **26**:442–447.
401. Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidia with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* (2004) **71**:1296–1302. doi:10.1095/biolreprod.104.028621
402. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (2001) **184**:1392–1398. doi:10.1067/mob.2001.115434
403. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* (2000) **95**:240–244. doi:10.1016/s0029-7844(99)00503-7
404. Flores-Espinosa P, Vega-Sánchez R, Mancilla-Herrera I, Bermejo-Martínez L, Preciado-Martínez E, Olmos-Ortiz A, Méndez I, Estrada-Gutiérrez G, Quesada-Reyna B, Helguera-Repetto

- C, et al. Prolactin selectively inhibits the LPS-induced chemokine secretion of human foetal membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019) **0**:1–7. doi:10.1080/14767058.2019.1596255
405. Tong M, Potter JA, Mor G, Abrahams VM. Lipopolysaccharide-Stimulated Human Fetal Membranes Induce Neutrophil Activation and Release of Vital Neutrophil Extracellular Traps. *The Journal of Immunology* (2019) **203**:500–510. doi:10.4049/jimmunol.1900262
406. George R, Kalich J, Yonish B, Murtha A. Apoptosis in the Chorion of Fetal Membranes in Preterm Premature Rupture of Membranes. *American journal of perinatology* (2008) **25**:29–32. doi:10.1055/s-2007-1004828
407. Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH, Romero R. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* (2003) **31**:12–22. doi:10.1515/JPM.2003.002
408. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* (2007) **5**:46. doi:10.1186/1477-7827-5-46
409. Zaga-Clavellina V, Merchant-Larios H, García-López G, Maida-Claros R, Vadillo-Ortega F. Differential secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B streptococci in human fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig* (2006) **13**:271–279. doi:10.1016/j.jsgi.2006.02.006
410. Zaga-Clavellina V, López GG, Estrada-Gutierrez G, Martinez-Flores A, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F. Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses* (2006) **49**:6–13. doi:10.1111/j.1439-0507.2005.01171.x
411. Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, Xu Y, Hussein Y, Dong Z, Kusanovic JP, Kim CJ, Hassan SS. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2011) **24**:1444–1455. doi:10.3109/14767058.2011.591460
412. Yan H, Zhu L, Zhang Z, Li H, Li P, Wang Y, Leng M. HMGB1-RAGE signaling pathway in pPROM. *Taiwan J Obstet Gynecol* (2018) **57**:211–216. doi:10.1016/j.tjog.2018.02.008
413. Kalish RB, Vardhana S, Normand NJ, Gupta M, Witkin SS. Association of a maternal CD14 -159 gene polymorphism with preterm premature rupture of membranes and spontaneous preterm birth in multi-fetal pregnancies. *J Reprod Immunol* (2006) **70**:109–117. doi:10.1016/j.jri.2005.12.002
414. Kalish RB, Nguyen DP, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Witkin SS. A single nucleotide A>G polymorphism at position -670 in the Fas gene promoter: Relationship to preterm premature rupture of fetal membranes in multifetal pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2005) **192**:208–212. doi:10.1016/j.ajog.2004.06.106
415. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JF, Parry S. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1999) **180**:1297–1302. doi:10.1016/S0002-9378(99)70632-0
416. ROMERO R, FRIEL LA, EDWARDS DRV, KUSANOVIC JP, HASSAN SS, MAZAKI-TOVI S, VAISBUCH E, KIM CJ, EREZ O, CHAIWORAPONGSA T, et al. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). *Am J Obstet Gynecol* (2010) **203**:361.e1-361.e30. doi:10.1016/j.ajog.2010.05.026

417. Makieva S, Dubicke A, Rinaldi SF, Fransson E, Ekman-Ordeberg G, Norman JE. The preterm cervix reveals a transcriptomic signature in the presence of premature prelabor rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* (2017) **216**:602.e1-602.e21. doi:10.1016/j.ajog.2017.02.009
418. Konwar C, Price EM, Wang LQ, Wilson SL, Terry J, Robinson WP. DNA methylation profiling of acute chorioamnionitis-associated placentas and fetal membranes: insights into epigenetic variation in spontaneous preterm births. *Epigenetics & Chromatin* (2018) **11**: doi:10.1186/s13072-018-0234-9
419. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* (2002) **10**:417–426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
420. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* (2014) **157**:1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007
421. Schaefer AK, Melnyk JE, He Z, Del Rosario F, Grimes CL. “Pathogen- and Microbial- Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) and the Innate Immune Response in Crohn’s Disease,” in *Immunity and Inflammation in Health and Disease* (Elsevier), 175–187. doi:10.1016/B978-0-12-805417-8.00014-7
422. Jamilloux Y, Magnotti F, Belot A, Henry T. The pyrin inflammasome: from sensing RhoA GTPases-inhibiting toxins to triggering autoinflammatory syndromes. *Pathog Dis* (2018) **76**: doi:10.1093/femspd/fty020
423. Teissier T, Boulanger É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology* (2019) doi:10.1007/s10522-019-09808-3
424. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* (2007) **86**:249–254. doi:10.1177/154405910708600310
425. Fukata M, Arditi M. The Role of Pattern Recognition Receptors in Intestinal Inflammation. *Mucosal Immunol* (2013) **6**:451–463. doi:10.1038/mi.2013.13
426. Salvador B, Arranz A, Francisco S, Córdoba L, Punzón C, Llamas MÁ, Fresno M. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological Research* (2016) **108**:46–56. doi:10.1016/j.phrs.2016.03.038
427. Tangerås LH, Stødle GS, Olsen GD, Leknes A-H, Gundersen AS, Skei B, Vikdal AJ, Ryan L, Steinkjer B, Myklebost MF, et al. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *Journal of Reproductive Immunology* (2014) **106**:89–99. doi:10.1016/j.jri.2014.04.004
428. Gillaux C, Méhats C, Vaiman D, Cabrol D, Breuiller-Fouché M. Functional Screening of TLRs in Human Amniotic Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* (2011) **187**:2766–2774. doi:10.4049/jimmunol.1100217
429. Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, Mor G, Paidas M, Guller S. Expression of Toll-like receptors in the human decidua. *Histol Histopathol* (2007) **22**:847–854. doi:10.14670/HH-22.847
430. Silva-Gomes S, Decout A, Nigou J. “Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs),” in *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, ed. M. Parnham (Basel: Springer Basel), 1–16. doi:10.1007/978-3-0348-0620-6_35-1
431. Sirard J-C, Bayardo M, Didierlaurent A. Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: Mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors. *European Journal of Immunology* (2006) **36**:260–263. doi:10.1002/eji.200535777
432. Rumbo M, Nempont C, Kraehenbuhl J-P, Sirard J-C. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: Lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Letters* (2006) **580**:2976–2984. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.036
433. Lu X, Kurago Z, Brogden KA. Effects of polymicrobial communities on host immunity and response. *FEMS Microbiol Lett* (2006) **265**:141–150. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00485.x
434. Tattoli I, Travassos LH, Carneiro LA, Magalhaes JG, Girardin SE. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol* (2007) **29**:289–301. doi:10.1007/s00281-007-0083-2

435. Eren E, Berber M, Özören N. NLR3 protein inhibits inflammation by disrupting NALP3 inflammasome assembly via competition with the adaptor protein ASC for pro-caspase-1 binding. *J Biol Chem* (2017) **292**:12691–12701. doi:10.1074/jbc.M116.769695
436. Imamura R, Wang Y, Kinoshita T, Suzuki M, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Okamoto H, Suda T. Anti-Inflammatory Activity of PYNOD and Its Mechanism in Humans and Mice. *The Journal of Immunology* (2010) **184**:5874–5884. doi:10.4049/jimmunol.0900779
437. Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Kondo C, Konaka K, Suda T. PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1. *Int Immunol* (2004) **16**:777–786. doi:10.1093/intimm/dxh081
438. Radian AD, Khare S, Chu LH, Dorfleutner A, Stehlik C. ATP binding by NLRP7 is required for inflammasome activation in response to bacterial lipopeptides. *Molecular Immunology* (2015) **67**:294–302. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.013
439. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Ting JP-Y. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**:8041–8046. doi:10.1073/pnas.0611496104
440. Singer H, Biswas A, Zimmer N, Messaed C, Oldenburg J, Slim R, El-Maarri O. NLRP7 inter-domain interactions: the NACHT-associated domain is the physical mediator for oligomeric assembly. *Molecular Human Reproduction* (2014) **20**:990–1001. doi:10.1093/molehr/gau060
441. Botos I, Segal DM, Davies DR. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. *Structure* (2011) **19**:447–459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004
442. Istomin AY, Godzik A. Understanding diversity of human innate immunity receptors: analysis of surface features of leucine-rich repeat domains in NLRs and TLRs. *BMC Immunol* (2009) **10**:48. doi:10.1186/1471-2172-10-48
443. Faustin B, Lartigue L, Bruey J-M, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC. Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. *Molecular Cell* (2007) **25**:713–724. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.032
444. Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, Wang R, Zhang Y, Martinon F, Miao D, et al. Crystal structure of NLR4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science* (2013) **341**:172–175. doi:10.1126/science.1236381
445. Hafner-Bratkovič I, Sušjan P, Lainšček D, Tapia-Abellán A, Cerović K, Kadunc L, Angosto-Bazarra D, Pelegrin P, Jerala R. NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nat Commun* (2018) **9**:1–18. doi:10.1038/s41467-018-07573-4
446. Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, Bertin JJ, Gough PJ. Autolytic Proteolysis within the Function to Find Domain (FIIND) Is Required for NLRP1 Inflammasome Activity. *J Biol Chem* (2012) **287**:25030–25037. doi:10.1074/jbc.M112.378323
447. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J. ASC, a Novel 22-kDa Protein, Aggregates during Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *J Biol Chem* (1999) **274**:33835–33838. doi:10.1074/jbc.274.48.33835
448. Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, Murase S, Sagara J. Expression of Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain, a Pyrin N-terminal Homology Domain-containing Protein, in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2001) **49**:1269–1275. doi:10.1177/002215540104901009
449. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* (2007) **14**:1590–1604. doi:10.1038/sj.cdd.4402194

450. Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, Orazio N, Shi M, Liang Q, Amatya R, Kelly TJ, Iwai K, Ting J, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* (2014) **211**:1333–1347. doi:10.1084/jem.20132486
451. Martin BN, Wang C, Willette-Brown J, Herjan T, Gulen MF, Zhou H, Bulek K, Franchi L, Sato T, Alnemri ES, et al. IKK α negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation. *Nature Communications* (2014) **5**:4977. doi:10.1038/ncomms5977
452. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC). *J Immunol* (2009) **182**:3173–3182. doi:10.4049/jimmunol.0802367
453. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y, Stehlik C. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity* (2012) **36**:464–476. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.001
454. Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. TMS1, a Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is a Target of Methylation-induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. (2000)
455. Malik A, Kanneganti T-D. Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of Cell Science* (2017) **130**:3955–3963. doi:10.1242/jcs.207365
456. Sborgi L, Ravotti F, Dandey VP, Dick MS, Mazur A, Reckel S, Chami M, Scherer S, Huber M, Böckmann A, et al. Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. *PNAS* (2015) **112**:13237–13242. doi:10.1073/pnas.1507579112
457. Lu A, Magupalli V, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos M, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-dependent Inflammasomes. *Cell* (2014) **156**:1193–1206. doi:10.1016/j.cell.2014.02.008
458. Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang Q-X, Halfmann R, Chen ZJ. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* (2014) **156**:1207–1222. doi:10.1016/j.cell.2014.01.063
459. Dick M, Sborgi L, Rühl S, Hiller S, Broz P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature Communications* (2016) **7**:11929. doi:10.1038/ncomms11929
460. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* (1992) **356**:768–774. doi:10.1038/356768a0
461. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Ness KV, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim, Druck T, Cannizzaro LA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* (1992) **256**:97–100. doi:10.1126/science.1373520
462. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem* (2009) **284**:21777–21781. doi:10.1074/jbc.R800084200
463. Boucher D, Monteleone M, Coll R, Chen K, Ross C, Teo J, Gomez G, Holley C, Bierschenk D, J. Stacey K, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *The Journal of Experimental Medicine* (2018) **215**:jem.20172222. doi:10.1084/jem.20172222
464. Kesavardhana S, Kanneganti T-D. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol* (2017) **29**:201–210. doi:10.1093/intimm/dxx018
465. Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, Walle LV, Opdenbosch NV, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *The Journal of Immunology* (2014) **192**:1835–1846. doi:10.4049/jimmunol.1302839
466. Man SM, Tourlomousis P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald KA, Bryant CE. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate interleukin-1 β production. *J Immunol* (2013) **191**: doi:10.4049/jimmunol.1301581

467. Chen M, Xing Y, Lu A, Fang W, Sun B, Chen C, Liao W, Meng G. Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. *The Journal of Immunology* (2015) **195**:4962–4972. doi:10.4049/jimmunol.1500865
468. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle LV, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* (2011) **479**:117–121. doi:10.1038/nature10558
469. Baker PJ, Boucher D, Bierschenk D, Tebartz C, Whitney PG, D’Silva DB, Tanzer MC, Monteleone M, Robertson AAB, Cooper MA, et al. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *European Journal of Immunology* (2015) **45**:2918–2926. doi:10.1002/eji.201545655
470. Casson CN, Yu J, Reyes VM, Taschuk FO, Yadav A, Copenhaver AM, Nguyen HT, Collman RG, Shin S. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) **112**:6688–6693. doi:10.1073/pnas.1421699112
471. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O’Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* (2015) **526**:666–671. doi:10.1038/nature15541
472. Platnich JM, Chung H, Lau A, Sandall CF, Bondzi-Simpson A, Chen H-M, Komada T, Trotman-Grant AC, Brandelli JR, Chun J, et al. Shiga Toxin/Lipopolysaccharide Activates Caspase-4 and Gasdermin D to Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species Upstream of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports* (2018) **25**:1525–1536.e7. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.071
473. Xiang P, Chen T, Mou Y, Wu H, Xie P, Lu G, Gong X, Hu Q, Zhang Y, Ji H. NZ suppresses TLR4/NF- κ B signalings and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Inflamm Res* (2015) **64**:799–808. doi:10.1007/s00011-015-0863-4
474. Sallman DA, List A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood* (2019) **133**:1039–1048. doi:10.1182/blood-2018-10-844654
475. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the NALP3/Cryopyrin Inflammasome. *Current Biology* (2004) **14**:1929–1934. doi:10.1016/j.cub.2004.10.027
476. Pan Q, Mathison J, Fearn C, Kravchenko VV, Da Silva Correia J, Hoffman HM, Kobayashi KS, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, et al. MDP-induced interleukin-1 β processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol* (2007) **82**:177–183. doi:10.1189/jlb.1006627
477. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. TNF- α Mediate Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol* (2009) **183**:792–796. doi:10.4049/jimmunol.0900173
478. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology* (2009) **183**:787–791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
479. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res* (2018) **11**:359–374. doi:10.2147/JIR.S141220
480. Xie Q, Shen W-W, Zhong J, Huang C, Zhang L, Li J. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 β and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells. *International Journal of Molecular Medicine* (2014) **34**:341–349. doi:10.3892/ijmm.2014.1755
481. Curto-Reyes V, Kirschmann G, Pertin M, Drexler S, Decosterd I, Suter M. Neuropathic Pain Phenotype Does Not Involve the NLRP3 Inflammasome and Its End Product Interleukin-1 β in the Mice Spared Nerve Injury Model. *PloS one* (2015) **10**:e0133707. doi:10.1371/journal.pone.0133707
482. Jiang L, Zhang L, Kang K, Fei D, Gong R, Cao Y, Pan S, Zhao M, Zhao M. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2016) **84**:130–138. doi:10.1016/j.biopha.2016.09.020

483. Ganz M, Csak T, Nath B, Szabo G. Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World Journal of Gastroenterology* (2011) **17**:4772–4778. doi:10.3748/wjg.v17.i43.4772
484. Dang R, Guo Y, Zhang K, Jiang P, Zhao M. Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. *Molecular Brain* (2019) **12**:42. doi:10.1186/s13041-019-0463-2
485. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* (2012) **287**:36617–36622. doi:10.1074/jbc.M112.407130
486. Song N, Liu Z-S, Xue W, Bai Z-F, Wang Q-Y, Dai J, Liu X, Huang Y-J, Cai H, Zhan X-Y, et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell* (2017) **68**:185–197.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.08.017
487. Próchnicki T, Mangan MS, Latz E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Research* (2016) **5**: doi:10.12688/f1000research.8614.1
488. Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, Mittal M, Hong Z, Kanneganti T-D, Rehman J, et al. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-induced Inflammation. *Immunity* (2018) **49**:56. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.032
489. Samways DSK, Li Z, Egan TM. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* (2014) **8**:6. doi:10.3389/fncel.2014.00006
490. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* (2013) **126**:2903–2913. doi:10.1242/jcs.124388
491. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol* (2008) **9**:847–856. doi:10.1038/ni.1631
492. Gold M, Khoury JE. β -amyloid, Microglia and the Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Semin Immunopathol* (2015) **37**:607–611. doi:10.1007/s00281-015-0518-0
493. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, et al. ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* (2014) **15**:727–737. doi:10.1038/ni.2913
494. Liu Q, Zhang D, Hu D, Zhou X, Zhou Y. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology* (2018) **103**:115–124. doi:10.1016/j.molimm.2018.09.010
495. Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Molecular Cell* (2013) **49**:331–338. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.009
496. Spalinger MR, Kasper S, Gottier C, Lang S, Atrott K, Vavricka SR, Scharl S, Gutte PM, Grütter MG, Beer H-D, et al. NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *J Clin Invest* (2016) **126**:1783–1800. doi:10.1172/JCI83669
497. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* (1997) **386**:619–623. doi:10.1038/386619a0
498. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* (1997) **275**:206–209. doi:10.1126/science.275.5297.206
499. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* (2015) **526**:660–665. doi:10.1038/nature15514
500. Liu Z, Wang C, Rathkey JK, Yang J, Dubyak GR, Abbott DW, Xiao TS. Structures of the gasdermin D C-terminal domains reveal mechanisms of autoinhibition. *Structure* (2018) **26**:778–784.e3. doi:10.1016/j.str.2018.03.002

501. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang D-C, Shao F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* (2016) **535**:111–116. doi:10.1038/nature18590
502. He W, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang Z-H, Zhong C-Q, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res* (2015) **25**:1285–1298. doi:10.1038/cr.2015.139
503. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* (2018) **48**:35-44.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013
504. Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB, Holley CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R, et al. Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep* (2018) **24**:1425–1433. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.027
505. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* (2013) **341**:1246–1249. doi:10.1126/science.1240248
506. Viganò E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature Communications* (2015) **6**:8761. doi:10.1038/ncomms9761
507. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* (2014) **514**:187–192. doi:10.1038/nature13683
508. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2019) doi:10.1016/j.abb.2019.02.008
509. Wei M, Wang L, Wu T, Xi J, Han Y, Yang X, Zhang D, Fang Q, Tang B. NLRP3 Activation Was Regulated by DNA Methylation Modification during Mycobacterium tuberculosis Infection. *Biomed Res Int* (2016) **2016**: doi:10.1155/2016/4323281
510. Liu C-C, Huang Z-X, Li X, Shen K-F, Liu M, Ouyang H-D, Zhang S-B, Ruan Y-T, Zhang X-L, Wu S-L, et al. Upregulation of NLRP3 via STAT3-dependent histone acetylation contributes to painful neuropathy induced by bortezomib. *Exp Neurol* (2018) **302**:104–111. doi:10.1016/j.expneurol.2018.01.011
511. Hoss F, Mueller JL, Rojas Ringeling F, Rodriguez-Alcazar JF, Brinkschulte R, Seifert G, Stahl R, Broderick L, Putnam CD, Kolodner RD, et al. Alternative splicing regulates stochastic NLRP3 activity. *Nature Communications* (2019) **10**: doi:10.1038/s41467-019-11076-1
512. Bryan NB, Dorfleutner A, Kramer SJ, Yun C, Rojanasakul Y, Stehlik C. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *J Inflamm (Lond)* (2010) **7**:23. doi:10.1186/1476-9255-7-23
513. Zhou Y, Lu M, Du R-H, Qiao C, Jiang C-Y, Zhang K-Z, Ding J-H, Hu G. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* (2016) **11**: doi:10.1186/s13024-016-0094-3
514. Feng X, Luo Q, Wang H, Zhang H, Chen F. MicroRNA-22 suppresses cell proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma by targeting NLRP3. *J Cell Physiol* (2018) **233**:6705–6713. doi:10.1002/jcp.26331
515. Li D, Yang H, Ma J, Luo S, Chen S, Gu Q. MicroRNA-30e regulates neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease by targeting Nlrp3. *Human Cell* (2018) **31**:106. doi:10.1007/s13577-017-0187-5
516. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol* (2012) **189**:4175–4181. doi:10.4049/jimmunol.1201516
517. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of Autophagy by Inflammatory Signals Limits IL-1 β Production by Targeting

- Ubiquitinated Inflammasomes for Destruction. *Nat Immunol* (2012) **13**:255–263. doi:10.1038/ni.2215
518. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol* (2013) **14**:1247–1255. doi:10.1038/ni.2749
519. Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins cIAP1 and cIAP2 Are Required for Efficient Caspase-1 Activation by the Inflammasome. *Immunity* (2011) **35**:897–907. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.016
520. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol* (2008) **9**:866–872. doi:10.1038/ni.1633
521. Indramohan M, Stehlik C, Dorfleutner A. COPs and POPs patrol inflammasome activation. *J Mol Biol* (2018) **430**:153–173. doi:10.1016/j.jmb.2017.10.004
522. de Almeida L, Khare S, Misharin AV, Patel R, Ratsimandresy RA, Wallin MC, Perlman H, Greaves DR, Hoffman HM, Dorfleutner A, et al. The PYRIN Domain-only Protein POP1 Inhibits Inflammasome Assembly and Ameliorates Inflammatory Disease. *Immunity* (2015) **43**:264–276. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.018
523. Ratsimandresy RA, Chu LH, Khare S, de Almeida L, Gangopadhyay A, Indramohan M, Misharin AV, Greaves DR, Perlman H, Dorfleutner A, et al. The PYRIN domain-only protein POP2 inhibits inflammasome priming and activation. *Nat Commun* (2017) **8**: doi:10.1038/ncomms15556
524. Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J* (2003) **373**:101–113. doi:10.1042/BJ20030304
525. Bedoya F, Sandler LL, Harton JA. Pyrin-only protein 2 modulates NF-kappaB and disrupts ASC:CLR interactions. *J Immunol* (2007) **178**:3837–3845. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3837
526. Khare S, Ratsimandresy RA, de Almeida L, Cuda CM, Rellick SL, Misharin AV, Wallin MC, Gangopadhyay A, Forte E, Gottwein E, et al. The PYRIN domain-only protein POP3 inhibits ALR inflammasomes and regulates responses to infection with DNA viruses. *Nat Immunol* (2014) **15**:343–353. doi:10.1038/ni.2829
527. Lu A, Li Y, Schmidt FI, Yin Q, Chen S, Fu T-M, Tong AB, Ploegh HL, Mao Y, Wu H. Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nat Struct Mol Biol* (2016) **23**:416–425. doi:10.1038/nsmb.3199
528. Lamkanfi M, Denecker G, Kalai M, D'hondt K, Meeus A, Declercq W, Saelens X, Vandenabeele P. INCA, a novel human caspase recruitment domain protein that inhibits interleukin-1beta generation. *J Biol Chem* (2004) **279**:51729–51738. doi:10.1074/jbc.M407891200
529. Lee SH, Stehlik C, Reed JC. Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. *J Biol Chem* (2001) **276**:34495–34500. doi:10.1074/jbc.M101415200
530. Druilhe A, Srinivasula SM, Razmara M, Ahmad M, Alnemri ES. Regulation of IL-1beta generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. *Cell Death Differ* (2001) **8**:649–657. doi:10.1038/sj.cdd.4400881
531. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* (2007) **282**:28929–28938. doi:10.1074/jbc.M702633200
532. Tan Y, Yu L, Zhang C, Chen K, Lu J, Tan L. miRNA-146a attenuates inflammation in an in vitro spinal cord injury model via inhibition of TLR4 signaling. *Exp Ther Med* (2018) **16**:3703–3709. doi:10.3892/etm.2018.6645
533. Vickers TA, Zhang H, Graham MJ, Lemonidis KM, Zhao C, Dean NM. Modification of MyD88 mRNA Splicing and Inhibition of IL-1 β Signaling in Cell Culture and in Mice with a 2'-O-Methoxyethyl-Modified Oligonucleotide. *The Journal of Immunology* (2006) **176**:3652–3661. doi:10.4049/jimmunol.176.6.3652

534. Duong BH, Onizawa M, Osés-Prieto JA, Advincula R, Burlingame A, Malynn BA, Ma A. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* (2015) **42**:55–67. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.031
535. Booshehri LM, Hoffman HM. CAPS and NLRP3. *J Clin Immunol* (2019) **39**:277–286. doi:10.1007/s10875-019-00638-z
536. Vento-Tormo R, Álvarez-Errico D, Garcia-Gomez A, Hernández-Rodríguez J, Buján S, Basagaña M, Méndez M, Yagüe J, Juan M, Aróstegui JI, et al. DNA demethylation of inflammasome-associated genes is enhanced in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Allergy Clin Immunol* (2017) **139**:202–211.e6. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.016
537. Verma D, Bivik C, Farahani E, Synnerstad I, Fredrikson M, Enerbäck C, Rosdahl I, Söderkvist P. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* (2012) **25**:506–513. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.01008.x
538. Ungerbäck J, Belenki D, Jawad ul-Hassan A, Fredrikson M, Fransén K, Elander N, Verma D, Söderkvist P. Genetic variation and alterations of genes involved in NF κ B/TNFAIP3- and NLRP3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis* (2012) **33**:2126–2134. doi:10.1093/carcin/bgs256
539. Shimabukuro M, Sato H, Izaki H, Fukuda D, Uematsu E, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Kanayama H-O, et al. Depot- and gender-specific expression of NLRP3 inflammasome and toll-like receptors in adipose tissue of cancer patients. *Biofactors* (2016) **42**:397–406. doi:10.1002/biof.1287
540. Poli G, Brancorsini S, Cochetti G, Barillaro F, Egidi MG, Mearini E. Expression of inflammasome-related genes in bladder cancer and their association with cytokeratin 20 messenger RNA. *Urol Oncol* (2015) **33**:505.e1–7. doi:10.1016/j.urolonc.2015.07.012
541. Takano K, Kondo A, Kurose M, Yamashita K, Nomura K, Obata K, Murayama K, Ito F, Himi T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol* (2016) **77**:98–104. doi:10.1159/000441884
542. Apps JR, Carreno G, Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Guiho R, Cooper JE, Manshaei S, Jani N, Hölsken A, Pettorini B, et al. Tumour compartment transcriptomics demonstrates the activation of inflammatory and odontogenic programmes in human adamantinomatous craniopharyngioma and identifies the MAPK/ERK pathway as a novel therapeutic target. *Acta Neuropathol* (2018) **135**:757–777. doi:10.1007/s00401-018-1830-2
543. Sorrentino R, Terlizzi M, Di Crescenzo VG, Popolo A, Pecoraro M, Perillo G, Galderisi A, Pinto A. Human lung cancer-derived immunosuppressive plasmacytoid dendritic cells release IL-1 α in an AIM2 inflammasome-dependent manner. *Am J Pathol* (2015) **185**:3115–3124. doi:10.1016/j.ajpath.2015.07.009
544. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal* (2012) **2012**: doi:10.1100/2012/756357
545. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* (2008) **9**:857–865. doi:10.1038/ni.1636
546. Neumann K, Schiller B, Tiegs G. NLRP3 Inflammasome and IL-33: Novel Players in Sterile Liver Inflammation. *Int J Mol Sci* (2018) **19**: doi:10.3390/ijms19092732
547. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* (2006) **440**:237–241. doi:10.1038/nature04516
548. Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *European Journal of Immunology* (2018) **48**:230–238. doi:10.1002/eji.201746947
549. Borghini S, Tassi S, Chiesa S, Caroli F, Carta S, Caorsi R, Fiore M, Delfino L, Lasigliè D, Ferraris C, et al. Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an NLRP12 mutation. *Arthritis Rheum* (2011) **63**:830–839. doi:10.1002/art.30170
550. Jéru I, Hentgen V, Normand S, Duquesnoy P, Cochet E, Delwail A, Grateau G, Marlin S, Amselem S, Lecron J-C. Role of interleukin-1 β in NLRP12-associated autoinflammatory disorders

- and resistance to anti-interleukin-1 therapy. *Arthritis Rheum* (2011) **63**:2142–2148.
doi:10.1002/art.30378
551. Zhong FL, Mamai O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, Szeverényi I, Takeichi T, Balaji R, Lau A, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell* (2016) **167**:187–202.e17.
doi:10.1016/j.cell.2016.09.001
552. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* (2007) **356**:1216–1225.
doi:10.1056/NEJMoa061592
553. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JAT, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* (2012) **45**:271–278. doi:10.3109/08916934.2011.637532
554. Naqvi KF, Huante MB, Saito T, Chauhan S, Walker A, Lisinicchia J, Gelman B, Endsley JJ. Targeting the inflammasome as host directed therapy for Mycobacterium tuberculosis and HIV co-infection. *The Journal of Immunology* (2018) **200**:115.5–115.5.
555. Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, Loo G van. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Molecular Medicine* (2019) **11**:
doi:10.15252/emmm.201810248
556. Hoang M, Potter JA, Gysler SM, Han CS, Guller S, Norwitz ER, Abrahams VM. Human Fetal Membranes Generate Distinct Cytokine Profiles in Response to Bacterial Toll-Like Receptor and Nod-Like Receptor Agonists. *Biol Reprod* (2014) **90**: doi:10.1095/biolreprod.113.115428
557. Lappas M. Caspase-1 Activation is Increased with Human Labour in Foetal Membranes and Myometrium and Mediates Infection-Induced Interleukin-1 β Secretion. *Am J Reprod Immunol* (2014) **71**:189–201. doi:10.1111/aji.12174
558. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Garcia-Flores V, Leng Y, Panaitescu B, Miller D, Abrahams VM, Hassan SS. Inflammasome Assembly in the Chorioamniotic Membranes during Spontaneous Labor at Term. *Am J Reprod Immunol* (2017) **77**: doi:10.1111/aji.12648
559. Lim R, Lappas M. NOD-like receptor pyrin domain-containing-3 (NLRP3) regulates inflammation-induced pro-labor mediators in human myometrial cells. *Am J Reprod Immunol* (2018) **79**:e12825. doi:10.1111/aji.12825
560. Gotsch F, Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Vaisbuch E, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Kim CJ, et al. Evidence of the Involvement of Caspase-1 under Physiologic and Pathologic Cellular Stress during Human Pregnancy: A Link Between the Inflammasome and Parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2008) **21**:605–616. doi:10.1080/14767050802212109
561. Gomez-Lopez N, Romero R, Panaitescu B, Miller D, Zou C, Gudicha DW, Tarca AL, Para R, Pacora P, Hassan SS, et al. Gasdermin D: in vivo evidence of pyroptosis in spontaneous labor at term. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019)1–11.
doi:10.1080/14767058.2019.1610740
562. Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, Hussein Y, Dong Z, Kusanovic J, Jai Kim C, S Hassan S. Clinical chorioamnionitis is characterized by changes in the expression of the alarmin HMGB1 and one of its receptors, sRAGE. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* (2012) **25**:558–67. doi:10.3109/14767058.2011.599083
563. Plazyo O, Romero R, Unkel R, Balancio A, Mial TN, Xu Y, Dong Z, Hassan SS, Gomez-Lopez N. HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biol Reprod* (2016) **95**: doi:10.1095/biolreprod.116.144139
564. El-Sayed AAF. Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. *Taiwan J Obstet Gynecol* (2017) **56**:593–598. doi:10.1016/j.tjog.2017.08.004

565. Geldenhuys J, Rossouw TM, Lombaard HA, Ehlers MM, Kock MM. Disruption in the Regulation of Immune Responses in the Placental Subtype of Preeclampsia. *Front Immunol* (2018) **9**: doi:10.3389/fimmu.2018.01659
566. C Weel I, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo JP, Peraçoli MT. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol* (2017) **123**:40–47. doi:10.1016/j.jri.2017.09.002
567. Zenerino C, Nuzzo AM, Giuffrida D, Biolcati M, Zicari A, Todros T, Rolfo A. The HMGB1/RAGE Pro-Inflammatory Axis in the Human Placenta: Modulating Effect of Low Molecular Weight Heparin. *Molecules* (2017) **22**:1997. doi:10.3390/molecules22111997
568. Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Jr JPA, Peraçoli JC, Oliveira L de, Peraçoli MT. Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLOS ONE* (2015) **10**:e0129095. doi:10.1371/journal.pone.0129095
569. Matias ML, Gomes VJ, Romao-Veiga M, Ribeiro VR, Nunes PR, Romagnoli GG, Peracoli JC, Peracoli MTS. Silibinin Downregulates the NF-κB Pathway and NLRP1/NLRP3 Inflammasomes in Monocytes from Pregnant Women with Preeclampsia. *Molecules* (2019) **24**: doi:10.3390/molecules24081548
570. Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi K-C, Krajden M, Leung PCK, Money DM, Patrick DM, et al. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG* (2010) **117**:99–108. doi:10.1111/j.1471-0528.2009.02428.x
571. Koopmans CM, van Pampus MG, Groen H, Aarnoudse JG, van den Berg PP, Mol BWJ. Accuracy of serum uric acid as a predictive test for maternal complications in pre-eclampsia: bivariate meta-analysis and decision analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2009) **146**:8–14. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.05.014
572. Redman CW, Bonnar J. Plasma urate changes in pre-eclampsia. *Br Med J* (1978) **1**:1484–1485. doi:10.1136/bmj.1.6125.1484-d
573. Stødle GS, Silva GB, Tangerås LH, Gierman LM, Nervik I, Dahlberg UE, Sun C, Aune MH, Thomsen LCV, Bjørge L, et al. Placental inflammation in pre-eclampsia by Nod-like receptor protein (NLRP)3 inflammasome activation in trophoblasts. *Clin Exp Immunol* (2018) **193**:84–94. doi:10.1111/cei.13130
574. Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, Tadesse S, Norwitz ER, Guller S, Abrahams VM. Uric acid induces trophoblast IL-1β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* (2011) **65**:542–548. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00960.x
575. Kohli S, Ranjan S, Hoffmann J, Kashif M, Daniel EA, Al-Dabet MM, Bock F, Nazir S, Huebner H, Mertens PR, et al. Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts. *Blood* (2016) **128**:2153–2164. doi:10.1182/blood-2016-03-705434
576. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Plazyo O, Unkel R, Than NG, Chaemsaitong P, Chaiworapongsa T, Dong Z, Tarca AL, et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at Term with Acute Histologic Chorioamnionitis. *Reprod Sci* (2017) **24**:934–953. doi:10.1177/1933719116675058
577. Gomez-Lopez N, Romero R, Maymon E, Kusanovic JP, Panaitescu B, Miller D, Pacora P, Tarca AL, Motomura K, Erez O, et al. Clinical chorioamnionitis at term IX: in vivo evidence of intra-amniotic inflammasome activation. *Journal of Perinatal Medicine* (2019) **47**:276–287. doi:10.1515/jpm-2018-0271
578. Gomez-Lopez N, Romero R, Tarca AL, Miller D, Panaitescu B, Schwenkel G, Gudicha DW, Hassan SS, Pacora P, Jung E, et al. Gasdermin D: Evidence of Pyroptosis in Spontaneous Preterm Labor with Sterile Intra-amniotic Inflammation or Intra-amniotic Infection. *Am J Reprod Immunol* (2019) doi:10.1111/aji.13184
579. Baumbusch MA, Buhimschi CS, Oliver EA, Zhao G, Thung S, Rood K, Buhimschi IA. HIGH MOBILITY GROUP-BOX 1 (HMGB1) LEVELS ARE INCREASED IN AMNIOTIC FLUID OF WOMEN

WITH INTRA-AMNIOTIC INFLAMMATION-DETERMINED PRETERM BIRTH, AND THE SOURCE MAY BE THE DAMAGED FETAL MEMBRANES. *Cytokine* (2016) **81**:82–87.

doi:10.1016/j.cyto.2016.02.013

580. Zhu L, Wang Y, Zhu Y, Zhang W, Zhu J. Expression of NOD1 and downstream factors in placenta, fetal membrane and plasma from pregnancies with premature rupture of membranes and their significance. *Int J Clin Exp Pathol* (2018)
581. Brickle A, Tran HT, Lim R, Liong S, Lappas M. Autophagy, which is decreased in labouring fetal membranes, regulates IL-1 β production via the inflammasome. *Placenta* (2015) **36**:1393–1404. doi:10.1016/j.placenta.2015.10.015
582. Lu M, Ma F, Xiao J, Yang L, Li N, Chen D. NLRP3 inflammasome as the potential target mechanism and therapy in recurrent spontaneous abortions. *Mol Med Rep* (2019) **19**:1935–1941. doi:10.3892/mmr.2019.9829
583. D'Ippolito S, Tersigni C, Marana R, Di Nicuolo F, Gaglione R, Rossi ED, Castellani R, Scambia G, Di Simone N. Inflammasome in the human endometrium: further step in the evaluation of the "maternal side." *Fertility and Sterility* (2016) **105**:111-118.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.027
584. Nicuolo FD, D'Ippolito S, Castellani R, Rossi ED, Masciullo V, Specchia M, Mariani M, Pontecorvi A, Scambia G, Simone ND. Effect of alpha-lipoic acid and myoinositol on endometrial inflammasome from recurrent pregnancy loss women. *American Journal of Reproductive Immunology* (2019) **82**:e13153. doi:10.1111/aji.13153
585. Panaitescu B, Romero R, Gomez-Lopez N, Xu Y, Leng Y, Maymon E, Pacora P, Erez O, Yeo L, Hassan SS, et al. In vivo evidence of inflammasome activation during spontaneous labor at term. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2019) **32**:1978–1991. doi:10.1080/14767058.2017.1422714
586. Pontillo A, Girardelli M, Agostinis C, Masat E, Bulla R, Crovella S. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1 β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. *Reprod Sci* (2013) **20**:563–566. doi:10.1177/1933719112459240
587. Warren AY, Harvey L, Shaw RW, Khan RN. Interleukin-1 β Secretion From Cord Blood Mononuclear Cells In Vitro Involves P2X7 Receptor Activation. *Reproductive Sciences* (2008) **15**:189–194. doi:10.1177/1933719107310710
588. Maneta E, Warren AY, Hay DP, Khan RN. Caspase-1-mediated cytokine release from gestational tissues, placental, and cord blood. *Front Physiol* (2015) **6**: doi:10.3389/fphys.2015.00186
589. Faro J, Romero R, Schwenkel G, Garcia-Flores V, Arenas-Hernandez M, Leng Y, Xu Y, Miller D, Hassan SS, Gomez-Lopez N. Intra-amniotic inflammation induces preterm birth by activating the NLRP3 inflammasome. *Biology of Reproduction* (2019) **100**:1290–1305. doi:10.1093/biolre/iory261
590. Gomez-Lopez N, Romero R, Garcia-Flores V, Leng Y, Miller D, Hassan SS, Hsu C-D, Panaitescu B. Inhibition of the NLRP3 inflammasome can prevent sterile intra-amniotic inflammation, preterm labor/birth, and adverse neonatal outcomes. *Biology of Reproduction* (2019) **100**:1306–1318. doi:10.1093/biolre/iory264
591. Li W, Chang Y, Liang S, Zhong Z, Li X, Wen J, Zhang Y, Zhang J, Wang L, Lin H, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to *Listeria monocytogenes*-induced animal pregnancy failure. *BMC Veterinary Research* (2016) **12**: doi:10.1186/s12917-016-0655-2
592. Kaneko Y, Sano M, Seno K, Oogaki Y, Takahashi H, Ohkuchi A, Yokozawa M, Yamauchi K, Iwata H, Kuwayama T, et al. Olive Leaf Extract (OleaVita) Suppresses Inflammatory Cytokine Production and NLRP3 Inflammasomes in Human Placenta. *Nutrients* (2019) **11**: doi:10.3390/nu11050970
593. Matias ML, Romao-Veiga M, Ribeiro VR, Nunes PR, Medeiros Borges VT, Peracoli JC, Serrao Peracoli MT. P 13 Inflammasome downregulation by silibinin and vitamin D in monocytes from

- pregnant women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health* (2017) **9**:42. doi:10.1016/j.preghy.2017.07.091
594. Gene: NLRP7 (ENSG00000167634) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 97. Available at:
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000167634;r=19:54923509-54966312 [Accessed September 5, 2019]
595. Tian X, Pascal G, Monget P. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evolutionary Biology* (2009) **9**:202. doi:10.1186/1471-2148-9-202
596. Duéñez-Guzmán EA, Haig D. The Evolution of Reproduction-Related NLRP Genes. *Journal of Molecular Evolution* (2014) **78**:194–201. doi:10.1007/s00239-014-9614-3
597. Reddy R, Nguyen NMP, Sarrabay G, Rezaei M, Rivas MCG, Kavasoglu A, Berkil H, Elshafey A, Nunez KP, Dreyfus H, et al. The genomic architecture of NLRP7 is Alu rich and predisposes to disease-associated large deletions. *European Journal of Human Genetics* (2016) **24**:1445–1452. doi:10.1038/ejhg.2016.9
598. Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Suda T. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like Protein, Is a Feedback Regulator of Caspase-1-dependent Interleukin-1 β Secretion. *J Biol Chem* (2005) **280**:21720–21725. doi:10.1074/jbc.M410057200
599. Radian AD, de Almeida L, Dorfleutner A, Stehlik C. NLRP7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease. *Microbes and Infection* (2013) **15**:630–639. doi:10.1016/j.micinf.2013.04.001
600. Okada K, Hirota E, Mizutani Y, Fujioka T, Shuin T, Miki T, Nakamura Y, Katagiri T. Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. *Cancer Science* (2004) **95**:949–954. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03182.x
601. Wang CM, Dixon PH, Decordova S, Hodges MD, Sebire NJ, Ozalp S, Fallahian M, Sensi A, Ashrafi F, Repiska V, et al. Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. *Journal of Medical Genetics* (2009) **46**:569–575. doi:10.1136/jmg.2008.064196
602. Huang J-Y, Yu P-H, Li Y-C, Kuo P-L. NLRP7 contributes to in vitro decidualization of endometrial stromal cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2017) **15**: doi:10.1186/s12958-017-0286-x
603. Messaed C, Akoury E, Djuric U, Zeng J, Saleh M, Gilbert L, Seoud M, Qureshi S, Slim R. NLRP7, a Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor Protein, Is Required for Normal Cytokine Secretion and Co-localizes with Golgi and the Microtubule-organizing Center. *Journal of Biological Chemistry* (2011) **286**:43313–43323. doi:10.1074/jbc.M111.306191
604. Kinoshita T, Kondoh C, Hasegawa M, Imamura R, Suda T. Fas-associated factor 1 is a negative regulator of PYRIN-containing Apaf-1-like protein 1. *Int Immunol* (2006) **18**:1701–1706. doi:10.1093/intimm/dxl104
605. Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, Carlson A, Merriam S, Lora JM, Briskin M, et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett* (2002) **530**:73–78. doi:10.1016/s0014-5793(02)03416-6
606. Zhou Y, Shah SZA, Yang L, Zhang Z, Zhou X, Zhao D. Virulent Mycobacterium bovis Beijing Strain Activates the NLRP7 Inflammasome in THP-1 Macrophages. *PLOS ONE* (2016) **11**:e0152853. doi:10.1371/journal.pone.0152853
607. Bednash JS, Weathington N, Londino J, Rojas M, Gulick DL, Fort R, Han S, McKelvey AC, Chen BB, Mallampalli RK. Targeting the deubiquitinase STAMBP inhibits NALP7 inflammasome activity. *Nature Communications* (2017) **8**:15203. doi:10.1038/ncomms15203
608. Abi Nahed R, Reynaud D, Borg AJ, Traboulsi W, Wetzel A, Sapin V, Brouillet S, Dieudonné MN, Dakouane-Giudicelli M, Benharouga M, et al. NLRP7 is increased in human idiopathic fetal growth restriction and plays a critical role in trophoblast differentiation. *J Mol Med* (2019) **97**:355–367. doi:10.1007/s00109-018-01737-x

609. Ohno S, Kinoshita T, Ohno Y, Minamoto T, Suzuki N, Inoue M, Suda T. Expression of NLRP7 (PYPAF3, NALP7) Protein in Endometrial Cancer Tissues. *ANTICANCER RESEARCH* (2008)
610. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R, Bagga R, Kircheisen R, Ao A, Ratti B, et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nature Genetics* (2006) **38**:300. doi:10.1038/ng1740
611. Zhang P, Dixon M, Zucchelli M, Hambiliki F, Levkov L, Hovatta O, Kere J. Expression Analysis of the NLRP Gene Family Suggests a Role in Human Preimplantation Development. *PLoS ONE* (2008) **3**:e2755. doi:10.1371/journal.pone.0002755
612. Akoury E, Zhang L, Ao A, Slim R. NLRP7 and KHDC3L, the two maternal-effect proteins responsible for recurrent hydatidiform moles, co-localize to the oocyte cytoskeleton. *Human Reproduction* (2015) **30**:159–169. doi:10.1093/humrep/deu291
613. Bebbere D, Masala L, Albertini DF, Ledda S. The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J Assist Reprod Genet* (2016) **33**:1431–1438. doi:10.1007/s10815-016-0788-z
614. Singer H, Biswas A, Nuesgen N, Oldenburg J, El-Maarri O. NLRP7, Involved in Hydatidiform Molar Pregnancy (HYDM1), Interacts with the Transcriptional Repressor ZBTB16. *PLOS ONE* (2015) **10**:e0130416. doi:10.1371/journal.pone.0130416
615. Qian J, Nguyen NMP, Rezaei M, Huang B, Tao Y, Zhang X, Cheng Q, Yang H, Asangla A, Majewski J, et al. Biallelic PADI6 variants linking infertility, miscarriages, and hydatidiform moles. *European Journal of Human Genetics* (2018) **26**:1007–1013. doi:10.1038/s41431-018-0141-3
616. Mahadevan S, Wen S, Wan Y-W, Peng H-H, Otta S, Liu Z, Iacovino M, Mahen EM, Kyba M, Sadikovic B, et al. NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Human Molecular Genetics* (2014) **23**:706–716. doi:10.1093/hmg/ddt457
617. Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, et al. Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole. *GOI* (2016) **81**:353–358. doi:10.1159/000441780
618. Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, Diggie C, Carr I, Rittore C, Touitou I, Philibert L, et al. Mutations Causing Familial Biparental Hydatidiform Mole Implicate C6orf221 as a Possible Regulator of Genomic Imprinting in the Human Oocyte. *Am J Hum Genet* (2011) **89**:451–458. doi:10.1016/j.ajhg.2011.08.002
619. Rezaei M, Nguyen NMP, Foroughinia L, Dash P, Ahmadpour F, Verma IC, Slim R, Fardaei M. Two novel mutations in the KHDC3L gene in Asian patients with recurrent hydatidiform mole. *Human Genome Variation* (2016) **3**: doi:10.1038/hgv.2016.27
620. Sills ES, Obregon-Tito AJ, Gao H, McWilliams TK, Gordon AT, Adams CA, Slim R. Pathogenic variant in NLRP7(19q13.42) associated with recurrent gestational trophoblastic disease: Data from early embryo development observed during in vitro fertilization. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* (2017) **44**:40. doi:10.5653/cerm.2017.44.1.40
621. Ulker V, Gurkan H, Tozkir H, Karaman V, Ozgur H, Numanoglu C, Gedikbasi A, Akbayir O, Uyguner ZO. Novel NLRP7 mutations in familial recurrent hydatidiform mole: are NLRP7 mutations a risk for recurrent reproductive wastage? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2013) **170**:188–192. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.06.028
622. Ji M, Shi X, Xiang Y, Cui Q, Zhao J. NLRP7 and KHDC3L variants in Chinese patients with recurrent hydatidiform moles. *Jpn J Clin Oncol* (2019) doi:10.1093/jjco/hyz036
623. Hemida R, van Doorn H, Fisher R. A Novel Genetic Mutation in a Patient With Recurrent Biparental Complete Hydatidiform Mole: A Brief Report. *Int J Gynecol Cancer* (2016) **26**:1351–1353. doi:10.1097/IGC.0000000000000755
624. Fallahian M, Sebire NJ, Savage PM, Seckl MJ, Fisher RA. Mutations in NLRP7 and KHDC3L confer a complete hydatidiform mole phenotype on digynic triploid conceptions. *Hum Mutat* (2013) **34**:301–308. doi:10.1002/humu.22228

625. El-Maarri O, Seoud M, Coullin P, Herbiniaux U, Oldenburg J, Rouleau G, Slim R. Maternal alleles acquiring paternal methylation patterns in biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* (2003) **12**:1405–1413. doi:10.1093/hmg/ddg152
626. Kou YC, Shao L, Peng HH, Rosetta R, del Gaudio D, Wagner AF, Al-Hussaini TK, Van den Veyver IB. A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles. *Mol Hum Reprod* (2008) **14**:33–40. doi:10.1093/molehr/gam079
627. Hayward BE, De Vos M, Talati N, Abdollahi MR, Taylor GR, Meyer E, Williams D, Maher ER, Setna F, Nazir K, et al. Genetic and Epigenetic Analysis of Recurrent Hydatidiform Mole. *Human Mutation* (2009) **30**:E629–E639. doi:10.1002/humu.20993
628. Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT. A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* (2002) **416**:539–542. doi:10.1038/416539a
629. Sanchez-Delgado M, Martin-Trujillo A, Tayama C, Vidal E, Esteller M, Iglesias-Platas I, Deo N, Barney O, Maclean K, Hata K, et al. Absence of Maternal Methylation in Biparental Hydatidiform Moles from Women with NLRP7 Maternal-Effect Mutations Reveals Widespread Placenta-Specific Imprinting. *PLoS Genetics* (2015) **11**:e1005644. doi:10.1371/journal.pgen.1005644
630. Huang J-Y, Su M, Lin S-H, Kuo P-L. A genetic association study of NLRP2 and NLRP7 genes in idiopathic recurrent miscarriage. *Human Reproduction* (2013) **28**:1127–1134. doi:10.1093/humrep/det001
631. Qian J, Deveault C, Bagga R, Xie X, Slim R. Women heterozygous for NALP7/NLRP7 mutations are at risk for reproductive wastage: report of two novel mutations. *Hum Mutat* (2007) **28**:741. doi:10.1002/humu.9498
632. Messaed C, Chebaro W, Di Roberto RB, Rittore C, Cheung A, Arseneau J, Schneider A, Chen MF, Bernishke K, Surti U, et al. NLRP7 in the spectrum of reproductive wastage: rare non-synonymous variants confer genetic susceptibility to recurrent reproductive wastage. *J Med Genet* (2011) **48**:540–548. doi:10.1136/jmg.2011.089144
633. Shibata K, Hasebe A, Into T, Yamada M, Watanabe T. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol* (2000) **165**:6538–6544. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6538
634. Mühlradt PF, Kieß M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G. Isolation, Structure Elucidation, and Synthesis of a Macrophage Stimulatory Lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* Acting at Picomolar Concentration. *J Exp Med* (1997) **185**:1951–1958.
635. Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, et al. Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasmal Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6. *Infect Immun* (2004) **72**:1657–1665. doi:10.1128/IAI.72.3.1657-1665.2004
636. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* (2001) **13**:933–940. doi:10.1093/intimm/13.7.933
637. Lim R, Barker G, Lappas M. The TLR2 Ligand FSL-1 and the TLR5 Ligand Flagellin Mediate Pro-Inflammatory and Pro-Labour Response via MyD88/TRAF6/NF- κ B-Dependent Signalling. *American Journal of Reproductive Immunology* (2014) **71**:401–417. doi:10.1111/aji.12229
638. Ariza M-E, Glaser R, Kaumaya PTP, Jones C, Williams MV. The EBV-Encoded dUTPase Activates NF- κ B through the TLR2 and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* (2009) **182**:851–859. doi:10.4049/jimmunol.182.2.851
639. Lim R, Tran HT, Liong S, Barker G, Lappas M. The Transcription Factor Interferon Regulatory Factor-1 (IRF1) Plays a Key Role in the Terminal Effector Pathways of Human Preterm Labor1. *Biology of Reproduction* (2016) **94**: doi:10.1095/biolreprod.115.134726
640. Lim R, Lappas M. A novel role for GSK3 in the regulation of the processes of human labour. *REPRODUCTION* (2015) **149**:189–202. doi:10.1530/REP-14-0493

641. Lappas M. Effect of spontaneous term labour on the expression of the NR4A receptors nuclear receptor related 1 protein (Nurr1), neuron-derived clone 77 (Nur77) and neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) in human fetal membranes and myometrium. *Reproduction, Fertility and Development* (2016) **28**:893. doi:10.1071/RD14315
642. Minkiewicz J, Vaccari JP de R, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* (2013) **61**:1113–1121. doi:10.1002/glia.22499
643. Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* (2019) **19**:477–489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
644. Ataide MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza M do C, Franklin BS, Elian S, Martins FS, Pereira D, Reed G, et al. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog* (2014) **10**:e1003885. doi:10.1371/journal.ppat.1003885
645. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol* (2014) **11**:571–581. doi:10.1038/cmi.2014.46
646. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. *Tissue Engineering Part C: Methods* (2011) **17**:49–59. doi:10.1089/ten.tec.2010.0136
647. Teng Z, Yoshida T, Okabe M, Toda A, Higuchi O, Nogami M, Yoneda N, Zhou K, Kyo S, Kiyono T, et al. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation* (2013) **22**:267–278. doi:10.3727/096368912X655055
648. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2007) **1**:296–305. doi:10.1002/term.40
649. Blackburn DG, Osteen KG, Winfrey VP, Hoffman LH. Obplacental giant cells of the domestic rabbit: Development, morphology, and intermediate filament composition. *Journal of Morphology* (1989) **202**:185–203. doi:10.1002/jmor.1052020207
650. Badwaik NK, Rasweiler JJ, Muradali F. Co-expression of cytokeratins and vimentin by highly invasive trophoblast in the white-winged vampire bat, *Diaemus youngi*, and the black mastiff bat, *Molossus ater*, with observations on intermediate filament proteins in the decidua and intraplacental trophoblast. *J Reprod Fertil* (1998) **114**:307–325. doi:10.1530/jrf.0.1140307
651. de Souza PC, Katz SG. Coexpression of cytokeratin and vimentin in mice trophoblastic giant cells. *Tissue and Cell* (2001) **33**:40–45. doi:10.1054/tice.2000.0148
652. Scherholz PLA, de Souza PC, Spadacci-Morena DD, Katz SG. Vimentin is synthesized by mouse vascular trophoblast giant cells from embryonic day 7.5 onwards and is a characteristic factor of these cells. *Placenta* (2013) **34**:518–525. doi:10.1016/j.placenta.2013.04.003
653. Ratnayake WS, Apostolatos CA, Apostolatos AH, Schutte RJ, Huynh MA, Ostrov DA, Acevedo-Duncan M. Oncogenic PKC- ι activates Vimentin during epithelial-mesenchymal transition in melanoma; a study based on PKC- ι and PKC- ζ specific inhibitors. *Cell Adhesion & Migration* (2018) **12**:447–463. doi:10.1080/19336918.2018.1471323
654. Choi JE, Bae JS, Kang MJ, Chung MJ, Jang KY, Park HS, Moon WS. Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance. *Oncology Reports* (2017) **38**:1695–1705. doi:10.3892/or.2017.5790
655. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* (2015) **6**:15966–15983.
656. Kiemer AK, Takeuchi K, Quinlan MP. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene* (2001)

657. Zhang X-H, Liang X, Liang X-H, Wang T-S, Qi Q-R, Deng W-B, Sha A-G, Yang Z-M. The Mesenchymal–Epithelial Transition During In Vitro Decidualization. *Reprod Sci* (2013) **20**:354–360. doi:10.1177/1933719112472738
658. Abdelaziz DH, Gavrilin MA, Akhter A, Caution K, Kotrange S, Khweek AA, Abdulrahman BA, Grandhi J, Hassan ZA, Marsh C, et al. Apoptosis-associated Speck-like Protein (ASC) Controls Legionella pneumophila Infection in Human Monocytes. *J Biol Chem* (2011) **286**:3203–3208. doi:10.1074/jbc.M110.197681
659. Li H, Zhou X, Zhang J. Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammasome activation in human gingival epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* (2014) **34**:1039–1044. doi:10.3892/ijmm.2014.1865
660. Wang D, Zhang M, Wang T, Cai M, Qian F, Sun Y, Wang Y. Green tea polyphenols prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Food Funct* (2019) **10**:3898–3908. doi:10.1039/C9FO00572B
661. Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Is a Regulator of Procaspace-1 Activation. *The Journal of Immunology* (2003) **171**:6154–6163. doi:10.4049/jimmunol.171.11.6154
662. Li P, Chen D, Huang Y. Fisetin administration improves LPS-induced acute otitis media in mouse in vivo. *International Journal of Molecular Medicine* (2018) **42**:237–247. doi:10.3892/ijmm.2018.3585
663. Chen H, Jiang Z. The essential adaptors of innate immune signaling. *Protein Cell* (2013) **4**:27–39. doi:10.1007/s13238-012-2063-0
664. Ahmad R, Kochumon S, Jasem S, Behbehani K. FSL-1 induces MMP-9 production through TLR-2 and NF-kappaB /AP-1 signaling pathways in monocytic THP-1 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* (2014) **34**:929–942. doi:10.1159/000366310
665. Nilsen NJ, Vladimer GI, Stenvik J, Orning MPA, Zeid-Kilani MV, Bugge M, Bergstroem B, Conlon J, Husebye H, Hise AG, et al. A Role for the Adaptor Proteins TRAM and TRIF in Toll-like Receptor 2 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* (2015) **290**:3209–3222. doi:10.1074/jbc.M114.593426
666. Liu W, Liu X, Li Y, Zhao J, Liu Z, Hu Z, Wang Y, Yao Y, Miller A, Su B, et al. LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during Salmonella Typhimurium infection. *The Journal of experimental medicine* (2017) **214**: doi:10.1084/jem.20170014
667. Compan V, Martín-Sánchez F, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Verkhratsky A, Brough D, Pelegrín P. Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling. *J Immunol* (2015) **194**:1261–1273. doi:10.4049/jimmunol.1301676
668. Kerur N, Veetil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B. IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe* (2011) **9**:363–375. doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
669. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011) **469**:221–225. doi:10.1038/nature09663
670. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The Adaptor MAVS Promotes NLRP3 Mitochondrial Localization and Inflammasome Activation. *Cell* (2013) **153**:348–361. doi:10.1016/j.cell.2013.02.054
671. Elliott EI, Miller AN, Banoth B, Iyer SS, Stotland A, Weiss JP, Gottlieb RA, Sutterwala FS, Cassel SL. Mitochondrial assembly of the NLRP3 inflammasome complex is initiated at priming. *J Immunol* (2018) **200**:3047–3052. doi:10.4049/jimmunol.1701723
672. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, et al. Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity* (2013) **39**:311–323. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.001

673. Park S, Juliana C, Hong S, Datta P, Hwang I, Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Alnemri ES. The Mitochondrial Antiviral Protein MAVS Associates with NLRP3 and Regulates Its Inflammasome Activity. *The Journal of Immunology* (2013) **191**:4358–4366. doi:10.4049/jimmunol.1301170
674. Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *PNAS* (2013) **110**:17963–17968. doi:10.1073/pnas.1312571110
675. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Ozkurede U, Kim Y-G, Chakrabarti A, Gale M, Silverman RH, Colonna M, Akira S, et al. Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K⁺ Efflux. *The Journal of Immunology* (2014) **193**:4214–4222. doi:10.4049/jimmunol.1400582
676. Rayamajhi M, Zhang Y, Miao E. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* (2013) **1040**:85–90. doi:10.1007/978-1-62703-523-1_7
677. Goddard PJ, Sanchez-Garrido J, Slater SL, Kalyan M, Ruano-Gallego D, Marchès O, Fernández LÁ, Frankel G, Shenoy AR. Enteropathogenic *Escherichia coli* Stimulates Effector-Driven Rapid Caspase-4 Activation in Human Macrophages. *Cell Reports* (2019) **27**:1008-1017.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.100
678. Schneider KS, Groß CJ, Dreier RF, Saller BS, Mishra R, Gorka O, Heilig R, Meunier E, Dick MS, Čiković T, et al. The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity. *Cell Reports* (2017) **21**:3846–3859. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.018
679. Mulvihill E, Sborgi L, Mari SA, Pfreundschuh M, Hiller S, Müller DJ. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *The EMBO Journal* (2018) **37**: doi:10.15252/embj.201798321
680. Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, Ciferri C, Dixit VM, Dueber EC. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *PNAS* (2016) **113**:7858–7863. doi:10.1073/pnas.1607769113
681. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, Schroder K. The Neutrophil NLR4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports* (2014) **8**:570–582. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.028
682. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, Robertson AAB, Cooper MA, Graf T, Hornung V. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* (2016) **44**:833–846. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.012
683. Wolf AJ, Reyes CN, Liang W, Becker C, Shimada K, Wheeler ML, Cho HC, Popescu NI, Coggeshall KM, Arditi M, et al. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* (2016) **166**:624–636. doi:10.1016/j.cell.2016.05.076
684. Zanon I, Tan Y, Di Gioia M, Springstead JR, Kagan JC. By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity* (2017) **47**:697-709.e3. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.010
685. Morwood CJ, Lappas M. The Citrus Flavone Nobiletin Reduces Pro-Inflammatory and Pro-Labour Mediators in Fetal Membranes and Myometrium: Implications for Preterm Birth. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0108390
686. Eskin M, Hajishengallis G, Kinane D. Differential Activation of Human Gingival Epithelial Cells and Monocytes by *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae. *Infection and immunity* (2007) **75**:892–8. doi:10.1128/IAI.01604-06
687. Le H, Kim J. Stable Toll-Like Receptor 10 Knockdown in THP-1 Cells Reduces TLR-Ligand-Induced Proinflammatory Cytokine Expression. *International Journal of Molecular Sciences* (2016) **17**:859. doi:10.3390/ijms17060859
688. Wilhelmsen K, Mesa K, Prakash A, Xu F, Hellman J. Activation of Endothelial TLR2 by Bacterial Lipoprotein Upregulates Proteins Specific for the Neutrophil Response. *Innate immunity* (2011) **18**:602–16. doi:10.1177/1753425911429336

689. Morgan ME, Koelink PJ, Zheng B, den Brok MHMGM, van de Kant HJ, Verspaget HW, Folkerts G, Adema GJ, Kraneveld AD. Toll-like receptor 6 stimulation promotes T-helper 1 and 17 responses in gastrointestinal-associated lymphoid tissue and modulates murine experimental colitis. *Mucosal Immunology* (2014) **7**:1266–1277. doi:10.1038/mi.2014.16
690. Fujita M, Into T, Yasuda M, Okusawa T, Hamahira S, Kuroki Y, Eto A, Nisizawa T, Morita M, Shibata K. Involvement of Leucine Residues at Positions 107, 112, and 115 in a Leucine-Rich Repeat Motif of Human Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of Diacylated Lipoproteins and Lipopeptides and *Staphylococcus aureus* Peptidoglycans. *The Journal of Immunology* (2003) **171**:3675–3683. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3675
691. Haque MS, Hasebe A, Iyori M, Kiura K, Ohtani M, Shibata K. How is the diacylated lipopeptide FSL-1 processed after recognition by TLR2 ? (135.1). *The Journal of Immunology* (2009) **182**:135.1-135.1.
692. Shamsul HM, Hasebe A, Iyori M, Ohtani M, Kiura K, Zhang D, Totsuka Y, Shibata K- ichiro. The Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand FSL-1 is internalized via the clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2. *Immunology* (2010) **130**:262–272. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03232.x
693. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* (2005) **433**:523–527. doi:10.1038/nature03253
694. Grisold AJ, Hoenigl M, Leitner E, Jakse K, Feierl G, Raggam RB, Marth E. Submasseteric Abscess Caused by *Mycoplasma salivarium* Infection. *J Clin Microbiol* (2008) **46**:3860–3862. doi:10.1128/JCM.00807-08
695. Shibata K, Hasebe A, Sasaki T, Watanabe T. *Mycoplasma salivarium* induces interleukin-6 and interleukin-8 in human gingival fibroblasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1997) **19**:275–283. doi:10.1111/j.1574-695X.1997.tb01097.x
696. Mizuki H, Kawamura T, Nagasawa D. In situ immunohistochemical detection of intracellular *Mycoplasma salivarium* in the epithelial cells of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* (2015) **44**:134–144. doi:10.1111/jop.12215
697. Henrich B, Rumming M, Sczyrba A, Velleuer E, Dietrich R, Gerlach W, Gombert M, Rahn S, Stoye J, Borkhardt A, et al. *Mycoplasma salivarium* as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma. *PLoS ONE* (2014) **9**:e92297. doi:10.1371/journal.pone.0092297
698. Hidalgo-Chicharro A, Abad-Torreblanca R, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. 32-week premature rupture of membranes caused by oropharyngeal microbiota. *JMM Case Rep* (2017) **4**: doi:10.1099/jmmcr.0.005121
699. Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. Localization of *P. gingivalis* in Preterm Delivery Placenta. *J Dent Res* (2009) **88**:575–578. doi:10.1177/0022034509338032
700. Montenegro DA, Borda LF, Neuta Y, Gómez LA, Castillo DM, Loyo D, Lafaurie GI. Oral and urogenital intra-amniotic infection in women with preterm delivery: A case-control study. *J Investig Clin Dent* (2019) **10**:e12396. doi:10.1111/jicd.12396
701. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* (1996) **67**:1103–1113. doi:10.1902/jop.1996.67.10s.1103
702. León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, Martínez M, Gamonal J. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol* (2007) **78**:1249–1255. doi:10.1902/jop.2007.060368
703. Hasegawa-Nakamura K, Tateishi F, Nakamura T, Nakajima Y, Kawamata K, Douchi T, Hatae M, Noguchi K. The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* (2011) **46**:497–504. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01366.x
704. Tateishi F, Hasegawa-Nakamura K, Nakamura T, Oogai Y, Komatsuzawa H, Kawamata K, Douchi T, Hatae M, Noguchi K. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of

- high-risk pregnant women. *J Clin Periodontol* (2012) **39**:417–424. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01855.x
705. Chaparro A, Blanlot C, Ramírez V, Sanz A, Quintero A, Inostroza C, Bittner M, Navarro M, Illanes SE. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: a case-control study. *J Periodont Res* (2013) **48**:802–809. doi:10.1111/jre.12074
706. Ovalle A, Gamonal J, Martínez MA, Silva N, Kakarieka E, Fuentes A, Chaparro A, Gajardo M, León R, Ahumada A, et al. [Relationship between periodontal diseases and ascending bacterial infection with preterm delivery]. *Rev Med Chil* (2009) **137**:504–514. doi:/S0034-98872009000400008
707. Hirano E, Sugita N, Kikuchi A, Shimada Y, Sasahara J, Iwanaga R, Tanaka K, Yoshie H. The association of Aggregatibacter actinomycetemcomitans with preeclampsia in a subset of Japanese pregnant women. *J Clin Periodontol* (2012) **39**:229–238. doi:10.1111/j.1600-051x.2011.01845.x
708. Ao M, Miyauchi M, Furusho H, Inubushi T, Kitagawa M, Nagasaki A, Sakamoto S, Kozai K, Takata T. Dental Infection of Porphyromonas gingivalis Induces Preterm Birth in Mice. *PLOS ONE* (2015) **10**:e0137249. doi:10.1371/journal.pone.0137249
709. Stockham S, Stamford JE, Roberts CT, Fitzsimmons TR, Marchant C, Bartold PM, Zilm PS. Abnormal Pregnancy Outcomes in Mice Using an Induced Periodontitis Model and the Haematogenous Migration of Fusobacterium nucleatum Sub-Species to the Murine Placenta. *PLOS ONE* (2015) **10**:e0120050. doi:10.1371/journal.pone.0120050

ANNEXES

PARTICIPATIONS AUX CONGRES

Ce travail de thèse a été présenté à la communauté scientifique au cours des congrès internationaux ou locaux suivants :

7 et 8 septembre 2017 (deuxième année de Thèse) :

Congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire (GFP)

A Grenoble (France)

Présentation d'un poster

11 et 12 mars 2019 (troisième année de Thèse) :

Congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire (GFP)

A Paris (France)

Communication orale

12 et 16 mars 2019 (troisième année de Thèse) :

Congrès de la Society For Reproductive Investigation (SRI)

A Paris (France)

Présentation d'un poster

23 et 24 mai 2019 (troisième année de Thèse) :

Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de Vie, Santé, Agronomie et Environnement (JED SVSAE)

A Clermont-Ferrand (France)

Communication orale

PARTICIPATIONS A DES

PUBLICATIONS

Au cours de ces trois années de thèse, j'ai eu l'occasion d'accompagner au niveau technique différents membres de l'équipe du Pr. Vincent SAPIN dans leurs travaux de recherche, ce qui m'a permis d'être co-auteur des publications suivantes :

ARTICLE 1 :

Titre de l'article : RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice.

Auteurs : Blondonnet R, Audard J, Belville C, Clairefond G, Lutz J, Bouvier D, Roszyk L, Gross C, **Lavergne M**, Fournet M, Blanchon L, Vachias C, Damon-Soubeyrand C, Sapin V, Constantin JM, Jabaudon M.

Journal : Scientific Reports

Date de publication : 03/08/2017

DOI : 10.1038/s41598-017-07638-2

Résumé : The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is involved in inflammatory response during acute respiratory distress syndrome (ARDS). Growing body of evidence support strategies of RAGE inhibition in experimental lung injury, but its modalities and effects remain underinvestigated. Anesthetised C57BL/6JRj mice were divided in four groups; three of them underwent orotracheal instillation of acid and were treated with anti-RAGE monoclonal antibody (mAb) or recombinant soluble RAGE (sRAGE), acting as a decoy receptor. The fourth group served as a control. Lung injury was assessed by the analysis of blood gases, alveolar permeability, histology, AFC, and cytokines. Lung expression and distribution epithelial channels ENaC, Na,K-ATPase, and aquaporin (AQP)-5 were assessed. Treatment with either anti-RAGE mAb or sRAGE improved lung injury, arterial oxygenation and decreased alveolar inflammation in acid-injured animals. Anti-RAGE therapies were associated with restored AFC and increased lung expression of AQP-5 in alveolar cell. Blocking RAGE had potential therapeutic effects in a translational mouse model of ARDS, possibly through a decrease in alveolar type 1 epithelial cell injury as shown by restored AFC and lung AQP-5 expression. Further mechanistic studies are warranted to describe intracellular pathways that may control such effects of RAGE on lung epithelial injury and repair.

ARTICLE 2 :

Titre de l'article : Inhibition of the Receptor for Advanced Glycation End-Products in Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomised Laboratory Trial in Piglets.

Auteurs : Audard J, Godet T, Blondonnet R, Joffredo J, Paquette B, Belville C, **Lavergne M**, Gross C, Pasteur J, Bouvier D, Blanchon L, Sapin V, Pereira B, Constantin JM, Jabaudon M.

Journal : Scientific Reports

Date de publication : 25/06/2019

DOI : 10.1038/s41598-019-45798-5

Résumé : The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) modulates the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS). RAGE inhibition attenuated lung injury and restored alveolar fluid clearance (AFC) in a mouse model of ARDS. However, clinical translation will require assessment of this strategy in larger animals. Forty-eight anaesthetised Landrace piglets were randomised into a control group and three treatment groups. Animals allocated to treatment groups underwent orotracheal instillation of hydrochloric acid (i) alone; (ii) in combination with intravenous administration of a RAGE antagonist peptide (RAP), or (iii) recombinant soluble (s)RAGE. The primary outcome was net AFC at 4 h. Arterial oxygenation was assessed hourly and alveolar-capillary permeability, alveolar inflammation and lung histology were assessed at 4 h. Treatment with either RAP or sRAGE improved net AFC (median [interquartile range], 21.2 [18.8-21.7] and 19.5 [17.1-21.5] %/h, respectively, versus 12.6 [3.2-18.8] %/h in injured, untreated controls), oxygenation and decreased alveolar inflammation and histological evidence of tissue injury after ARDS. These findings suggest that RAGE inhibition restored AFC and attenuated lung injury in a piglet model of acid-induced ARDS.

ARTICLE 3 (en preparation) :

Titre de l'article : Advanced glycation end products and receptor (RAGE) promote wound healing of human corneal epithelial cells

Auteurs : Gross C, Belville C, **Lavergne M**, Jabaudon M, Blondonnet R, Constantin JM, Chiambarreta F, Blanchon L, Sapin V.

Journal de soumission : Investigative Ophthalmology & Visual Science

Date de soumission : septembre 2019

Résumé : Purpose: We used a human corneal epithelial cell (HCE) line to determine the involvement of the advanced glycation end products (AGEs) / receptor for AGEs (RAGE) couple in corneal epithelium wound healing.

Methods: After wounding, HCE cells were exposed to two major RAGE ligands (HMGB1 and AGEs), and wound healing was evaluated using the in vitro scratch assay. Following wound healing, the HCE cells were used to study the influence of the RAGE ligands on HCE proliferation, invasion, and migration. Activation of the NF- κ B signaling pathway by the AGEs/RAGE couple was tested using a luciferase reporter assay. Functional transcriptional regulation by this pathway was confirmed by quantification of expression of the connexin 43 target gene. For each experiment, specific RAGE involvement was confirmed by siRNA treatments.

Results: AGEs treatment at a dose of 100 µg/mL significantly improved the wound healing process in a RAGE-dependent manner by promoting cell migration, whereas HMGB1 had no effect. No significant influence of the AGEs/RAGE couple was observed on cell proliferation and invasion. However, this treatment induced an early activation of the NF-κB pathway and positively regulated the expression of the target gene, connexin 43, at both the mRNA and protein levels.

Conclusion: Our results demonstrate that the RAGE pathway is activated by AGEs treatment and is involved in the promotion of corneal epithelial wound healing. This positive action is observed only during the early stages of wound healing, as illustrated by the quick activation of the NF-κB pathway and induction of connexin 43 expression.

ARTICLE 4 (en preparation) :

Titre de l'article : Keratoconus and Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): news findings in inflammatory pathway

Auteurs : Navel V, Malecaze J, Blanchon L, **Lavergne M**, Choltus H, Bruet S, Dutheil F, Malecaze F, Fournie P, Belville C, Chiambaretta F, Sapin V.

Résumé : Purpose: We aimed to analyse the implication of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in keratoconus (KC). We described a genomic and proteomic analyse of RAGE-pathway in corneal tissues and tears of KC and healthy patient.

Method: In a multicentric prospective case-control study, corneas, corneal epitheliums and tears of KC and healthy subjects were recruited thanks to corneal grafting, exenteration, corneal collagen cross-linking, photorefractive keratectomy (PKR) and micropipettes in usual consultation, respectfully. Quantitative reverse transcription (RT-qPCR), Western-Blotting and Immunohistochemistry were performed to analyse RAGE isoforms expression in corneal tissues and tears.

Results: A total of 108 patients were followed up successfully for 13 months, 57 KC (1 cornea, 25 corneal epithelium and 31 tears) and 51 healthy subjects (1 cornea, 25 corneal epithelium and 25 tears). RAGE, HMGB1 and S100 family ligands were quantified by RT-qPCR and we identified statistically higher expression of RAGE and HMGB1 in normal group than KC group, $P = 0.03$ and 0.04 respectively. Western Blotting showed statistically higher fl-RAGE expression in KC corneal epithelium than control, $P < 0.001$; and lower s-RAGE expression in KC tears than control, $P = 0.04$. Immunofluorescence Assay of RAGE stained positive in normal and KC epithelium.

Conclusion: We described the first study concerning RAGE-pathway in corneal tissues and tears samples of KC and controls. RT-qPCR, Western Blotting and Immunofluorescence Assay results suggested that activation RAGE-pathway was up-regulated in KC compared to healthy subjects, suggesting inflammatory process in KC pathophysiology.