



HAL
open science

Implications du récepteur aux produits avancés de glycation, RAGE, dans la physiopathologie de la rupture des membranes fœtales humaines

Hélène Choltus

► **To cite this version:**

Hélène Choltus. Implications du récepteur aux produits avancés de glycation, RAGE, dans la physiopathologie de la rupture des membranes fœtales humaines. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC068 . tel-03651909

HAL Id: tel-03651909

<https://theses.hal.science/tel-03651909>

Submitted on 26 Apr 2022

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, SANTE, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

THESE

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 13 Septembre 2021 par

Hélène CHOLTUS

**Implications du récepteur aux produits avancés de glycation, RAGE,
dans la physiopathologie de la rupture des membranes fœtales
humaines**

Rapporteurs :

Dr. Anne COUTURIER-TARRADE

Dr. Daniel VAIMAN

Membres :

Pr. Pascale GUEIRARD

Pr. Vincent SAPIN

Directeur de thèse : Pr. Vincent SAPIN

Equipe « Approches translationnelles des lésions épithéliales et de leur réparation »

Laboratoire Génétique, Reproduction et Développement (GRéD)

UMR/CNRS 6293, INSERM U1103, Université Clermont-Auvergne

Centre de Recherche Bioclinique - 28, Place Henri Dunant

63000 Clermont-Ferrand (France)

REMERCIEMENTS

☞ Aux rapporteurs et aux membres du jury,

Je remercie les Dr. Anne Coututier-Tarrade et Dr. Daniel Vaiman d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et la Pr. Pascale Gueirard d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse (mais aussi de m'avoir suivie lors de mes deux comités de thèse). Merci pour votre temps et votre considération.

☞ Aux membres de mes comités de thèse,

Je tiens également à remercier le Dr. Paul Olivier Rouzaire d'avoir accepté d'assister à mes deux comités de thèse. Vos remarques avec celles du Pr. Pascale Gueirard m'ont considérablement aidée dans mon travail de thèse.

☞ A Vincent et Loïc,

La majorité des gens supportent leurs chefs tant bien que mal. J'ai mis les pieds au sein de l'équipe R2D2 des années plus tôt, lors de mon stage de DUT et j'y suis restée ; on dirait donc que pour moi cela a plutôt été tant bien. « Le vrai patron est quelqu'un qui se mêle passionnément de votre travail, qui le fait avec vous, par vous » (il faut que je cite l'auteur de cette belle phrase que je viens juste de découvrir sur le site citations-leparisien, il s'agit de Jules Romains). Et ce proverbe s'applique mieux à ce que j'ai pu connaître avec vous. Depuis l'IUT, vous m'avez soutenue dans mon parcours alors que je vous avais dit à l'époque « Merci pour tout mais je ne reviendrai pas en thèse, faire un doctorat c'est beaucoup trop long ».

Vincent, tu as été un réel mentor pour moi, tu m'as prise sous ton aile, soutenue dans les moments les moins drôles de la thèse, tu m'as appris plein de choses (plus ou moins utiles... je pense aux sessions découverte de publicités et répliques de films, la culture c'est important), tu as toujours été présent pour la loutre Tchoupie malgré ton emploi du temps plus que noirci par l'encre. Je pourrai écrire des lignes et des lignes, je conclurai sur une phrase : Oh Capitaine ! Mon Capitaine ! Je n'oublierai pas ce voyage à bord du navire Sapin.

Loïc, tu as été comme un second chef, le premier de l'équipe à qui j'ai eu le plus affaire, et un personnage haut en couleurs dès les premiers instants ! Déstabilisant au début pour mon âme très très pure, on prend vite goût à ton humour, toujours prêt à détendre une ambiance et à relativiser. Et à côté de cette face d'éternel amuseur, tu as toujours été là pour moi aussi bien

au niveau sciences pour résoudre les mystères de la biologie et les effets de la carboglace qu'au niveau humain. Tu m'as même aidée à chercher des forfaits mobiles quand je suis partie à Oxford en stage.

Comme duo de chefs, vous en faites un sacré avec Vincent, un duo choc que je ne suis pas prête d'oublier. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté, j'ai grandi à vos côtés durant ces quelques années, pour le meilleur.

☞ A l'équipe,

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipe.

Corinne, la première que j'ai suivie à la paillasse dès l'IUT, tu m'as permis de développer de façon optimale dès cette époque un rythme et une organisation efficace, à prendre conscience de l'importance de la rigueur. Ces enseignements ne m'ont été que bénéfiques pour la suite. Je te remercie pour tes conseils et ton aide durant toutes ces années au sein de l'équipe.

Si vous cherchez une grande brune élancée toujours positive et toujours souriante, vous la trouverez avec Régine. Régine, merci pour ton optimisme, pour ces trajets Vichy-Clermont pour l'enseignement, pour tous ces dosages LDH, et toutes ses messe-basses de commères. Merci pour ton rire.

Julie, merci de m'avoir aidée pour tous ces dosages Multiplex et ELLA et j'en ai fait de nombreux ! Merci pour ta patience, ta compagnie toujours agréable lors des temps d'attente de ces dosages !

Marion, Christelle, Marilyne, thésardes m'ayant précédée, merci de votre accueil, merci Marion de m'avoir encadrée durant ta thèse lorsque j'étais stagiaire IUT, merci Christelle pour ton aide pour les manip et pour toutes ces crises de fou rire dues à tes mythiques boulettes, merci Marilyne pour tout ton soutien technique, tu m'as transmis énormément de ton expérience de thésarde, merci à vous trois pour votre gentillesse et votre présence qui m'ont permis de réaliser ma thèse sans trop de problèmes.

Merci à ce qu'on peut appeler la relève : Ruoyang, Fanny, Coraline à un moment, Julia. Rourou, avec toi j'ai rencontré un co-thésard très sympathique et serviable, toujours là pour un petit thé mais surtout un ami (un camarade), merci d'être ce que tu es au quotidien, une personne généreuse, extrêmement cultivée pleine de talents et totalement perchée. Fanny

d'entre Toulouse et Bordeaux, voisine de bureau, merci également pour ta présence et tes rires ainsi que pour tes interprétations mémorables de Garou. Coraline aux big eyes, partie au Québec pour ta thèse, merci pour ton goût irréprochable en powerpoints et ton énergie de warrior woman, j'espère te rendre visite sous peu ; merci les filles pour ces bons moments au bureau et pour ces verres en terrasse. Enfin, je pense à Juju BFF, arrivée de son laboratoire de géologie, convertie progressivement à la biologie cellulaire. Merci à toi pour ta bienveillance et ta douceur inégalables, pour ces discussions sur la recherche et l'avenir, tu es comme une grande sœur de la recherche, toujours supportive et positive, pleine de ressources, impressionnante par ton parcours, tu es comme un modèle pour moi. Tu as su trouver un équilibre de vie, j'espère que tu sauras toujours le maintenir, et j'espère réussir à trouver le mien aussi.

Randy, Shaam, Valentin, les internes du bureau d'à côté, en pleine découverte de la recherche, merci à vous pour votre joie de vivre et votre énergie, pour m'avoir fait découvrir l'excellente cuisine de l'internat et votre humour si fin. J'ai passé avec vous beaucoup de moments au labo et en dehors du labo, qui en plus d'être des moments de rires, m'ont permis de mieux croiser ces deux mondes si proches et pourtant si différents de la recherche et de la médecine, merci pour avoir enrichi ma vision des choses. Merci Randy de m'avoir initiée à la boxe.

Mathieu, Raiko, Karen, Geoffroy, merci pour votre présence également, votre sympathie et votre curiosité scientifique, merci Jules (également de la contre team poumon) pour ta compagnie lors de l'expérimentation animale, ton humour et les discussions qu'on a pu avoir. Merci à tous les anciens et nouveaux membres (je croise les doigts pour toi Audrey) de l'équipe que j'ai pu croisés, vous avez tous participé au plus que bon déroulement de cette thèse, je vous en suis très reconnaissante.

☞ A Denis et l'équipe sage-femmes

Merci également à Denis, Julie Gony, Valérie Gaillard, Elodie Gratedeix sans qui cette thèse aurait été tout simplement impossible. Merci pour votre temps et patience, pour les très nombreuses fois où je vous ai sollicités pour tous ces placentas que j'aurai utilisés (merci à toutes ces mères qui ne s'imaginent vraiment pas tout ce qu'on peut faire d'un placenta). Merci Denis de m'avoir permis de découvrir en réel comment se déroulait une césarienne, ce fut un moment impressionnant et riche en émotions ! Une m'a suffi ...

☞ A tous les membres du GReD,

Jean Paul et Angélique le duo de choc du 3^{ème}, Fanfan et Nadège du 4^{ème}, Natalie et Graziella du 5^{ème}, Eric, Caroline, Hélène, Maryse et Nadia, toujours souriants et serviables, vous m'avez rendu beaucoup de services, merci pour ça, merci à tous les membres du GReD pour votre aide.

☞ A Marine et Alicia,

Alicia la grimpeuse et Marine la peste N°2, stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, merci à vous deux, vous avez été supers : efficaces, dynamiques, sérieuses, curieuses et gentilles, avec vous je n'ai pas eu trop de problèmes à vous confier des manips et vous savez que déléguer n'est pas mon fort !

☞ A mes amis,

“Pour moi c'est ravir au monde le soleil que d'ôter de la vie l'amitié” (Cicéron). Tout d'abord, la best, Marianne, un immensissime merci d'être là depuis l'IUT où nous nous sommes rencontrées et où pourtant ma première pensée a été « cette fille ne sera jamais une amie ». Et pourtant on ne s'est pas lâché par la suite, en licence à faire des courses de caddie abandonné en soirée, deux half pint en master, partant en stage à Oxford, préparant plus tard notre mémoire et le concours de l'école doctorale ensemble, puis ces trois ans seulement séparées d'un étage, la suite va être étrange, j'espère qu'on se rejoindra en post-doc. Caractères de cochon pas faciles à vivre toutes les deux, tu es comme une deuxième sœur, comme les gens pensent souvent. Merci de tout ton soutien dans les mauvais et bons moments, et à toutes nos années d'amitié à venir petit Ragondin unique au monde !

Geoffrey et John, les copains de l'escalade, Quentin partenaire de bières, merci à vous pour ces moments de joie de vivre, ces débats sur tout et rien, ces conseils, votre écoute et votre gentillesse, merci de supporter la pestouille Helena (qui a quand même supporté en retour vos conversations super intéressantes d'individus mâles...), j'ai toujours regretté de ne pas avoir eu de grand frère, vous n'êtes pas parfaits mais vous faites un très bon substitut ! A l'amitié vache !

En parlant de vache, merci à Clarisse, qui me surpasse en humour cassant ! Merci pour ton amitié créée au labo lors de ton stage recherche avec Randy and co. On s'est découvert entre

papou girls, et je sais qu'on se verra encore (de temps en temps parce que c'est dur de t'avoir disponible...) car tu es une personne loyale, gentille, drôle et plutôt intéressante dirons nous. Merci pour ton amitié, ta passion pour les crêpes, les endives et la nature, tes mails de photos d'animaux (courage pour ta thèse, on arrive à la fin). Merci à Samu de me montrer que c'est possible de t'apprécier longtemps.

Merci à Lisa et Aurélia, loin des yeux pas loin du cœur, je vous connais chacune maintenant depuis plusieurs années et c'est toujours une joie de vous revoir après des mois. Lisa et ton incomparable arche de Noé, nos sessions mise à jour où la glace finit par fondre, on a évolué en parallèle, et j'espère bien que tu me rendras visite à la Réunion, c'est plus attractif que Clermont, j'en ai bien conscience. Aurélia et ton accent chantant du Sud, tu m'as fait découvrir l'Aveyron, le gateau à la broche et la saucisse, mais surtout une personne profondément gentille et rêveuse, une personne que je suis heureuse de compter dans ma vie.

Merci à toi Tim, tu es aussi un de mes meilleurs amis mais plus encore. On aura parcouru un peu de chemin avant de se rencontrer mais ça en valait la peine. Merci pour tout ce que tu me donnes au jour le jour, pour être la personne (je ne dirai pas la plus drôle, place étant déjà prise par El Camillo) la plus positive, optimiste et amoureuse de la vie que je connaisse, celle qui m'apaise par sa gentillesse et me fait croquer à pleine dents tous les instants possibles. Merci de me rendre heureuse, je vais prolonger le contrat.

☞ A ma famille,

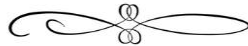
Merci à mes parents, depuis toujours vous êtes là à mes côtés, sans vous je ne serai jamais arrivée où j'en suis, vous m'avez toujours poussé à aller plus loin, à être plus curieuse et à apprendre constamment. Etre parents est et sera toujours un des défis les plus difficiles (en tout cas, ça en a l'air), merci pour votre constante présence, pour votre amour, je vous dois énormément et j'espère ne jamais trop vous décevoir. Merci à ma petite sœur Andrea. Réticente au début, cette colocation aura été une superbe idée, elle m'a permis de me rattraper sur toutes les affaires que tu as pu « m'emprunter » et de mieux te connaître. Tu as été top en séance de ralâge et de méditation sur la vie. Merci d'être ce que tu es, je suis très fière de toi, ne change pas (continue à me faire des gateaux quand tu me verras).

Si le monde entier est une mosaïque, vous êtes à l'origine de la mosaïque que j'ai pu devenir.

Merci de tout mon cœur.

Avant-propos

Un organe avec une durée de vie déterminée, objet de plusieurs rites, seul organe unissant deux individus et surtout un organe indispensable à la création de la vie, le placenta et ses membranes fœtales gardent encore plein de secrets à révéler. Autrefois vendue pour quelques pièces d'or à des avocats comme amulette, la poche des eaux n'est pas un simple sac qui abrite le bébé lors de ces neuf mois de grossesse. Si je ne m'étais jamais réellement posée la question avant d'intégrer l'équipe du Pr Vincent SAPIN, maintenant au bout de ces 3 ans de thèse, j'en suis convaincue. Plus généralement, je reste impressionnée par la subtilité de l'organisation biologique d'un être humain. Si notre occupation quotidienne à nous, chercheurs, est de constamment mettre en œuvre des techniques, des démarches expérimentales en vue d'expliquer un mécanisme cellulaire, moléculaire, à souhaiter le détailler le plus possible, nous sommes tous au fond conscients d'une chose : Il y aura toujours un détail qui nous échappera, toujours un acteur inconnu, un timing à préciser, une régulation mystérieuse. Mais c'est là que réside la beauté de notre métier, même si ce constat peut sembler angoissant, frustrant, il signifie surtout que nous aurons toujours matière à chercher, une énigme à résoudre.



RÉSUMÉ

La rupture prématurée des membranes fœtales (RPM) représente une complication obstétricale responsable d'un tiers des naissances prématurées. Cette pathologie semble de plus en plus découler de l'emballement précoce d'un processus impliqué dans la rupture physiologique à terme, l'inflammation stérile. Ce phénomène est basé sur la reconnaissance de molécules spécifiques, les alarmines (ou DAMPs), par une famille de récepteurs dénommés PRR pour « Pattern Recognition Receptors ». Cette interaction conduit à une réponse inflammatoire stérile participant à la fragilisation physiopathologique des MF. Cependant, il n'a toujours pas été décrit comment fonctionne exactement cette activation de l'inflammation au sein des MF, quel(s) PRR(s) est(sont) à l'origine de la transduction de ce signal, à moduler de façon à ce que la rupture physiologique n'ait pas lieu avant 37 semaines. Au cours de ma thèse, nous nous sommes focalisés sur un récepteur de la famille des PRR : RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts ; récepteur aux produits avancés de glycation).

Après avoir étudié l'ontogénèse de l'axe RAGE au sein des MF, notre premier objectif a été d'étudier l'activation de RAGE dans un contexte physiologique en exposant des explants d'amnios et de chorion à deux alarmines phares : HMGB1 et les AGEs. Nous avons alors mis en évidence un profil d'expression différentiel des acteurs de l'axe RAGE au sein des différentes zones des MF, notamment une surexpression de RAGE au sein de la zone de rupture. Par ailleurs, ce travail a révélé une réponse pro-inflammatoire en réponse à HMGB1 ou aux AGEs, au sein des deux feuillets des MF, qui est dépendante de RAGE. Par ailleurs, cette thèse s'est intéressée à l'activation de RAGE dans un contexte plus pathologique : le tabagisme maternel, facteur de risque très connu de la RPM. Nous avons pu démontrer *in vitro* l'implication de RAGE dans la réponse pro-inflammatoire induite par un condensé de fumée de cigarette au sein des cellules épithéliales de l'amnios.

Globalement, l'ensemble de ce travail soutient fortement le rôle de RAGE dans la fragilisation physiopathologique des MF. Ces données pourront potentiellement aider au développement futur de nouveaux outils de diagnostic et de thérapeutique pour lutter contre la RPM.

THESIS ABSTRACT

Preterm premature rupture of membranes is a pregnancy complication responsible for 30% of all preterm births. This pathology seems more and more to be the consequence of an early process runaway activation usually implicated in the physiologic rupture at term called sterile inflammation. This phenomenon is dependent on some specific molecules called "alarmins" or "Damage-Associated Molecular Patterns" (DAMPs) recognized by Pattern Recognition Receptors (PRRs) leading to a microbial-free inflammatory response. However, it remains unclear how exactly this activation works, and which receptor translates this sterile inflammatory signaling in fetal membranes (FM) to manage a successful physiological rupture not before 37 weeks. In this context, we focused our work on one actor of the sterile inflammation (member of PRR family), the Receptor for Advanced End-Glycation products (RAGE).

Following the realization of the RAGE axis members' ontogenesis into FM, our first objective was to evaluate the implication of RAGE axis in the arising of fetal membranes inflammation in a physiological context. Here, we revealed differential expression profile of RAGE axis actors in the different zones of the FM, especially an overexpression of RAGE inside the rupture zone. This work demonstrated also that alarmins HMGB1 and AGEs led to an inflammatory response in FM involving RAGE pathway. Then, we focused on the RAGE activation in a pathological context: the maternal tobacco smoking, a well-described risk factor of the pPROM. Our results have demonstrated the RAGE implications in the pro-inflammatory response in amniotic epithelial cells exposed to a Cigarette Smoke Condensate.

All this work strongly supports the role of RAGE in FM physiopathological weakening. These data could help to the future development of new strategies of diagnosis and therapeutics to fight against pPROM.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1** La cavité utérine chez la femme enceinte au cours du 9^{ème} mois de grossesse
- Figure 2** Formation des cavités amniotique et chorale
- Figure 3** Structure des membranes fœtales humaines à terme
- Figure 4** Homéostasie du liquide amniotique
- Figure 5** Propriétés antimicrobiennes des membranes fœtales
- Figure 6** Etapes majeures de la parturition
- Figure 7** Contrôle hormonal lors de la grossesse et la parturition humaine
- Figure 8** Activités de la progestérone favorisant la quiescence utérine
- Figure 9** Activités des œstrogènes lors de la parturition
- Figure 10** Implication de l'axe corticotrope lors de la parturition
- Figure 11** Action contractile de l'ocytocine en fin de grossesse
- Figure 12** Chronologie de la rupture des membranes fœtales à terme
- Figure 13** Différences histologiques entre les zones ZIM et ZAM
- Figure 14** Sénescence durant la grossesse
- Figure 15** Raccourcissement des télomères durant la grossesse
- Figure 16** Réponses inflammatoires microbienne *versus* stérile
- Figure 17** Transition épithélio-mésenchymateuse
- Figure 18** Décollement du placenta, une complication possible suite à une RPM
- Figure 19** Prolapsus du cordon ombilical
- Figure 20** Naissance prématurée, trois niveaux de prématurité
- Figure 21** Les trois voies de formation des AGEs
- Figure 22** Libération d'alarmines (DAMPs) durant une grossesse pathologique
- Figure 23** Organisation du gène codant RAGE
- Figure 24** Structure du récepteur membranaire RAGE
- Figure 25** RAGE et ses isoformes
- Figure 26** Diversité des ligands de RAGE
- Figure 27** Voies de signalisation et réponses cellulaires activées par RAGE
- Figure 28** Résolution de l'inflammation par RAGE
- Figure 29** Paramètres impactant sur l'affinité de RAGE pour ses ligands
- Figure 30** Illustration des composés toxiques contenus dans la cigarette

Figure 31	CSC et CSE, deux produits pour modéliser l'effet du tabagisme
Figure 32	Structure des chimiokines
Figure 33	La grande famille des chimiokines et de leurs récepteurs
Figure 34	Etapes majeures du recrutement leucocytaires
Figure 35	Expression de RANTES et de ses récepteurs au sein des feuillettes des MF
Figure 36	Comparaison de l'expression de RANTES dans les MF selon les différents types de diabète
Figure 37	Etude <i>in vitro</i> de l'effet d'une exposition des membranes fœtales aux AGEs
Figure 38	Pistes du projet Triade AGEs-RAGE-RANTES au sein des membranes fœtales
Tableau 1	Données cliniques de la cohorte de membranes fœtales à terme

LISTE DES ABREVIATIONS

(q)PCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction
AA	Acides Aminés
ACTH	Adreno CorticoTropic Hormone
ADAM-10	A disintegrin and metalloprotease 10
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNmt	AND mitochondrial
AEC	Amniotic Epithelial Cell = Cellules amniocytaires épithéliales
AGEs	Advanced Glycation End-products
AIM2	Absent In Melanoma 2 – like receptors
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BLT1	leukotriene B4 receptor 1
Caspase	CysteinyI-aspartate-cleaving- rotease
CBP	CREB-binding protein
CCL	CC motif chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Receptor
CD	Cluster de Différenciation
CEL	Nε-carboxy-ethyl-lysine
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CML	Nε-carboxyméthyl-lysine
CO	Monoxyde de carbone
COX	Cyclo-oxygénase
CREB	C-AMP Responses Element-binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone = corticolibérine
CSC	Cigarette Smoke Condensate
CSE	Cigarette Smoke Extract

Ct-RAGE	Forme tronquée en C terminal de RAGE
CYP	Cytochrome P450
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAP10	DNAX-Activating Proteine 10
DG	Diabète Gestationnel
DHEAS	Déhydro-épi-andro-sténédione sulfate
DN-RAGE	Dominant-Négatif de RAGE
DOCK7	Dedicator of cytokinesis protein 7
E1	Estrone
E2	Estradiol
E3	Œstriol
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO	Espèces Réactive de l'Oxygènes (= ROS)
esRAGE	Forme soluble de RAGE produite à partir d'un transcrit spécifique (Ct-RAGE) (endogenous secretory RAGE)
Fas	FS-7-associated surface antigen
fIRAGE	Full length RAGE
Fox	Forkhead box class O proteins
HMGB1	High Mobility Group Box 1 protein
HPA	Hypothalamo-pituitaire-adrénalien = corticotrope
HSP	Heat Shock Protein
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
Kd	Constante de dissociation = reflète l'affinité d'un ligand pour son récepteur
kDa	Kilo Dalton
LA	Liquide Amniotique
LDH	Lactate deshydrogénase
LPS	Liposaccharide

Mac-1	Macrophage-adhesion ligand-1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase = Protéine Kinase Activée par un Mitogène
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC	Matrice Extracellulaire
MF	Membranes Fœtales
MG-H1	methylglyoxal dérivés d'hydroimidazolones
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MMP	Matrix Métalloprotéase
MSU	Monosodium d'urate
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLR	NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) – like Receptor
NLRP	NLR, Pyrin Domain (PYD) containing protein (= PYPAF = NALP)
NO	Monoxyde d'azote
Nt-RAGE	Forme tronquée en N terminal de RAGE
OST	Oligosacharyl Transferase
OT/OTR	Récepteurs à l'ocytocine
pAEC	Primary Amniotic Epithelial Cell
PAMG-1	Placental alpha microglobulin-1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2α	Prostaglandine F2α
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pPROM	preterm Prelabor Rupture Of Membranes = Rupture avant travail et avant terme
PR	Progesterone Receptor
PROM	Prelabor Rupture Of Membranes = Rupture avant travail

PRR	Pattern-Recognition Receptor = récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
RAGE	Receptor of Advanced Glycation End products = Récepteur aux produits avancés de glycation
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted
Rap1	Ras related protein 1
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
RhoA	Ras homolog family member A
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RPM	Rupture Prématuration des Membranes fœtales
S100	Protéines fixant le calcium, solubles dans du sulfate d'ammonium Saturé à 100% à pH neutre = calnugralines
SA	Semaine d'aménorrhée
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype = Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
SERPINH1	Serine Protease Inhibitor Family H Member 1 = Membre 1 de la famille des Inhibiteurs de Protéase à Sérine
SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor = Inhibiteur de Protéases Sécrétées par des Leucocytes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sp1	Specificity protein 1
sRAGE	Forme soluble de RAGE clivée à partir de la forme totale membranaire
SRC	Steroid Receptor Coactivator
STAT	Signal Transducer and Activator of transcription
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TIRAP	TIR adaptator protein
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZAM	Zone de Morphologie Altérée
ZIM	Zone de Morphologie Intacte

TABLE DES MATIÈRES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	1
---------------------------------------	----------

CHAPITRE I : PARTURITION HUMAINE ET MEMBRANES FŒTALES	2
--	----------

I. LE PLACENTA ET SES MEMBRANES FŒTALES : GENERALITES.	2
---	----------

1) Genèse des membranes fœtales	3
a- Formation de la cavité amniotique	3
b- Formation de la cavité chorale	3
c- Accolement des feuillets	3
2) Structure des feuillets des membranes fœtales à terme	4
a- L'amnios	4
b- Le chorion.....	4
c- Cellules immunitaires présentes au sein des membranes fœtales	5
3) Propriétés et fonctions	6
a- Mais jusqu'ou peuvent-elles s'étirer ?	6
b- L'équilibre des fluides : homéostasie du liquide amniotique	6
c- Bouclier immunitaire au service de l'enfant-roi	7
d- Fin du contrat : participation à la parturition	8

II. QUELS ACTEURS POUR ORCHESTRER LA PARTURITION ?	9
---	----------

1) Les hormones s'emballent pour réveiller le myomètre et effacer le cervix	9
a- Progestérone	9
b- Œstrogènes	10
c- L'axe corticotrope ou HPA (hypothalamo-pituitaire-adrénelien).....	21
d- Ocytocine	12
e- Prostaglandines	12
f- Relaxine	13
2) La décidue s'enflamme	13
3) Les membranes fœtales cèdent.	15

CHAPITRE II : LA RUPTURE DES MEMBRANES FŒTALES OU L'IMPORTANCE DU BON TIMING	16
.....	16

I. QUAND LE TIMING EST PARFAIT : LA RUPTURE PHYSIOLOGIQUE DES MEMBRANES FŒTALES	16
--	-----------

1) Chronologie de la rupture	16
2) Mécanismes cellulaires et moléculaires de la rupture	17
a- Sécrétions hormonales	17
b- Stress oxydant	18
c- Apoptose	18

d-	Sénescence	19
e-	Inflammation	20
f-	Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	21
g-	Etirement.....	22
II. QUAND ETRE EN AVANCE EST DELETERE : LA RUPTURE PREMATUREE DES MEMBRANES FCETALES		23
1)	La rupture prématurée, pathologie des membranes fœtales : quels impacts ?	23
a-	Définition	23
b-	Impacts sur la mère	23
c-	Impacts sur le nouveau-né	24
2)	Prise en charge clinique.....	25
3)	Facteurs de risque	26
a-	Facteurs maternels	26
b-	Facteurs fœto-utéro-placentaires	27
c-	Facteurs médicaux.....	27
d-	Facteurs environnementaux.....	28
4)	Physiopathologie de la RPM	28
CHAPITRE III : INFLAMMATION STERILE ET ALARMINES		33
I. MAIS QUI SONT CES LANCEURS D'ALERTE AU SEIN DE NOTRE ORGANISME ?		33
1)	Notion de danger : historique	33
2)	Des alarmines à foison.....	34
a-	Origine : matrice extracellulaire (MEC)	34
b-	Origine : cytosol	34
c-	Origine : mitochondrie.....	35
d-	Origine : noyau	36
e-	Un cas un peu particulier : les produits de glycation avancée (AGEs).....	37
II. ALARMINES : OISEAUX DE MAUVAISE AUGURE EN OBSTETRIQUE ?		38
CHAPITRE IV : LE RÉCEPTEUR AUX PRODUITS DE GLYCATION AVANCÉS (RAGE) OU LE JANUS DES RÉCEPTEURS.		42
I. RAGE : A QUI AVONS-NOUS AFFAIRE ?		42
1)	Expression de RAGE et transcrits.....	42
2)	Structure protéique de RAGE	43
a-	Un domaine extracellulaire	43
b-	Un domaine transmembranaire	44
c-	Un domaine intracellulaire	44
3)	RAGE et ses isoformes	44
4)	Ligands de RAGE	45

5) Régulations de l'activité de RAGE.....	46
II. RAGE : UN LABYRINTHE DE VOIES DE SIGNALISATION ET REPONSES CELLULAIRES	47
1) Réponses cellulaires activées par RAGE	47
a- Migration cellulaire.....	48
b- Survie, prolifération et mort cellulaire	48
c- Inflammation	49
2) Fonctions biologiques de RAGE et pathologies	51
III. RAGE ET RUPTURE PREMATUREE DES MEMBRANES : QUELS ELEMENTS POUR SOUTENIR CETTE PISTE ?	52
OBJECTIFS DE THESE & RESULTATS	54
I. ONTOGENESE DE L'AXE RAGE AU SEIN DES MEMBRANES FOETALES ET ETUDE DE SON ACTIVATION DANS UN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE (PUBLICATION N°1)	55
II. ACTIVATION DE RAGE DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE : TABAGISME MATERNEL (PUBLICATION N°2).....	69
III. PHENOMENES INFLAMMATOIRES ET RUPTURE DES MEMBRANES FCETALES (PUBLICATION N°3).....	90
IV. TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES : UN ACTEUR EN AVAL DE RAGE, LA CHIMIOKINE RANTES (CCL5).....	2295
1) Quelques notions sur les chimiokines, ces molécules qui attirent.....	115
a- Une grande famille	115
b- Chimiokines et guidage cellulaire	116
c- Physiopathologie des chimiokines.....	117
2) RANTES et parturition.....	117
3) Objectif du projet	118
4) Résultats préliminaires & perspectives	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
I. ONTOGENESE DES ACTEURS DE L'AXE RAGE, INFLAMMATION RAGE-DEPENDANTE AU SEIN DES MEMBRANES FCETALES HUMAINES, ZAM UNE ZONE SURACTIVE ?.....	123
II.TABAGISME MATERNEL ET RAGE : COMMENT LES MF SE FRAGILISENT PREMATUREMENT.	126
III. AUTRES LIMITES TECHNIQUES, INTERETS THERAPEUTIQUES ET PERSPECTIVES A LONG TERME DE L'ETUDE	128
ANNEXES	131
PARTICIPATION AUX CONGRES	132
PARTICIPATIONS A DES PUBLICATIONS EN TANT QUE CO-AUTEUR.....	133
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139

Synthèse bibliographique

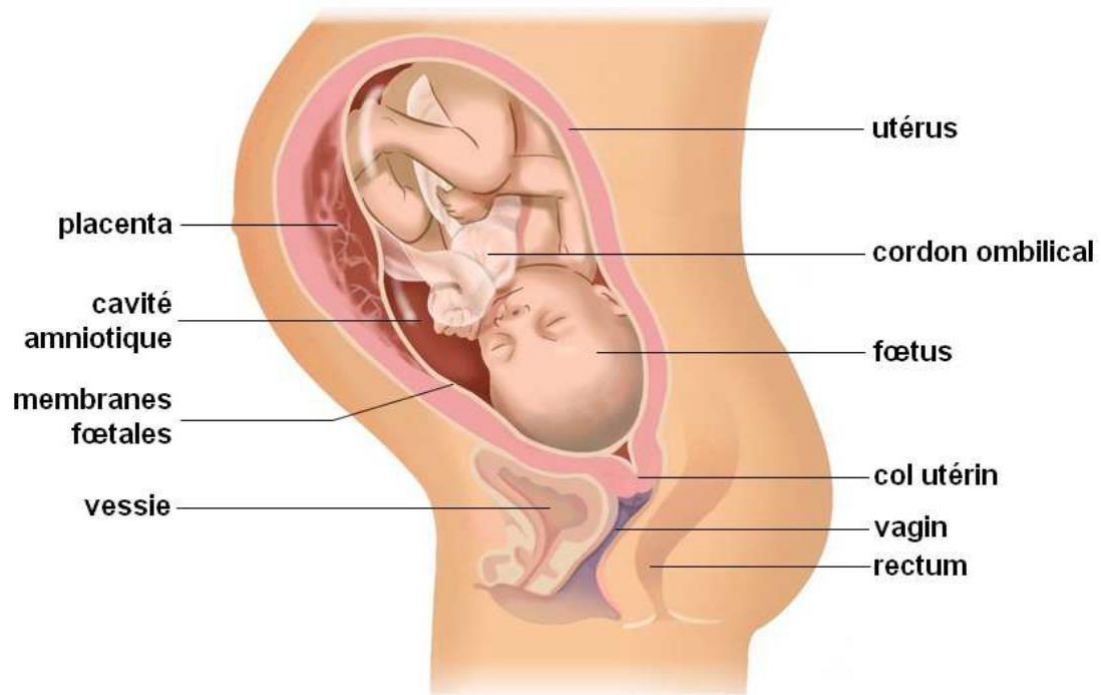


Figure 1 : La cavité utérine chez la femme enceinte au cours du 9^{ème} mois de grossesse

Le placenta est ancré à la partie supérieure de l'utérus tandis que les membranes fœtales sont rattachées au placenta, recouvrant la cavité amniotique dans laquelle se trouve le fœtus. (Adapté de <https://www.babyspace.fr>)

CHAPITRE I : PARTURITION HUMAINE ET MEMBRANES FŒTALES

Lors des neuf mois de grossesse, le corps humain est le siège d'une multitude de bouleversements anatomiques et physiologiques. Afin d'assurer la croissance du fœtus, de lui garantir un développement optimal, tout en permettant l'adaptation de la mère à cet état gravidique, plusieurs modifications ont lieu. Parmi les paramètres impactés, il est essentiel de citer ici (de manière non exhaustive), le métabolisme (augmentation globale, résistance à l'insuline, augmentation du cholestérol, ...), les systèmes cardio-vasculaire et respiratoire (augmentation du travail cardiaque, du débit sanguin pulmonaire, ...) mais aussi rénal, hépatique et digestif. A la base de ces changements, les hormones jouent un rôle majeur, notamment les œstrogènes et la progestérone sécrétées par les ovaires et le placenta, l'ocytocine et la prolactine sécrétées par l'hypophyse, ou encore le cortisol par les surrénales. Enfin (en lien avec ce travail), a lieu la création d'un organe transitoire mais essentiel au bon déroulement de la grossesse : le placenta et ses membranes fœtales.

I. Le placenta et ses membranes fœtales : généralités.

Primordiaux pour la grossesse, le placenta et ses membranes fœtales sont des tissus transitoires d'origine extra-embryonnaire qui seront expulsés lors de la délivrance. A terme, le placenta constitue un disque d'environ 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur pesant aux alentours de 500 g. Il est ancré à la partie supérieure de l'utérus tandis que les membranes fœtales, plus connues sous le nom de « poche des eaux », sont attachées au placenta et recouvrent la paroi interne de la cavité amniotique qui contient le fœtus et le liquide amniotique (LA) (**Figure 1**). D'une surface d'environ 1500 cm² et d'une épaisseur située entre 200 et 300 µm à terme, elles interagissent par leur surface avec le placenta (à 30%) et avec la décidue maternelle (à 70%). Ensemble, placenta et membranes fœtales vont assurer les interactions materno-fœtales, constituant une réelle interface entre la mère et son enfant tout au long de la grossesse. Avant de discuter des différents rôles des membranes fœtales, commençons par quelques rappels sur la formation de ces tissus (Standring, 2016; Poirier *et al*, 1993; Larsen *et al*, 2017; Benirschke *et al*, 2006).

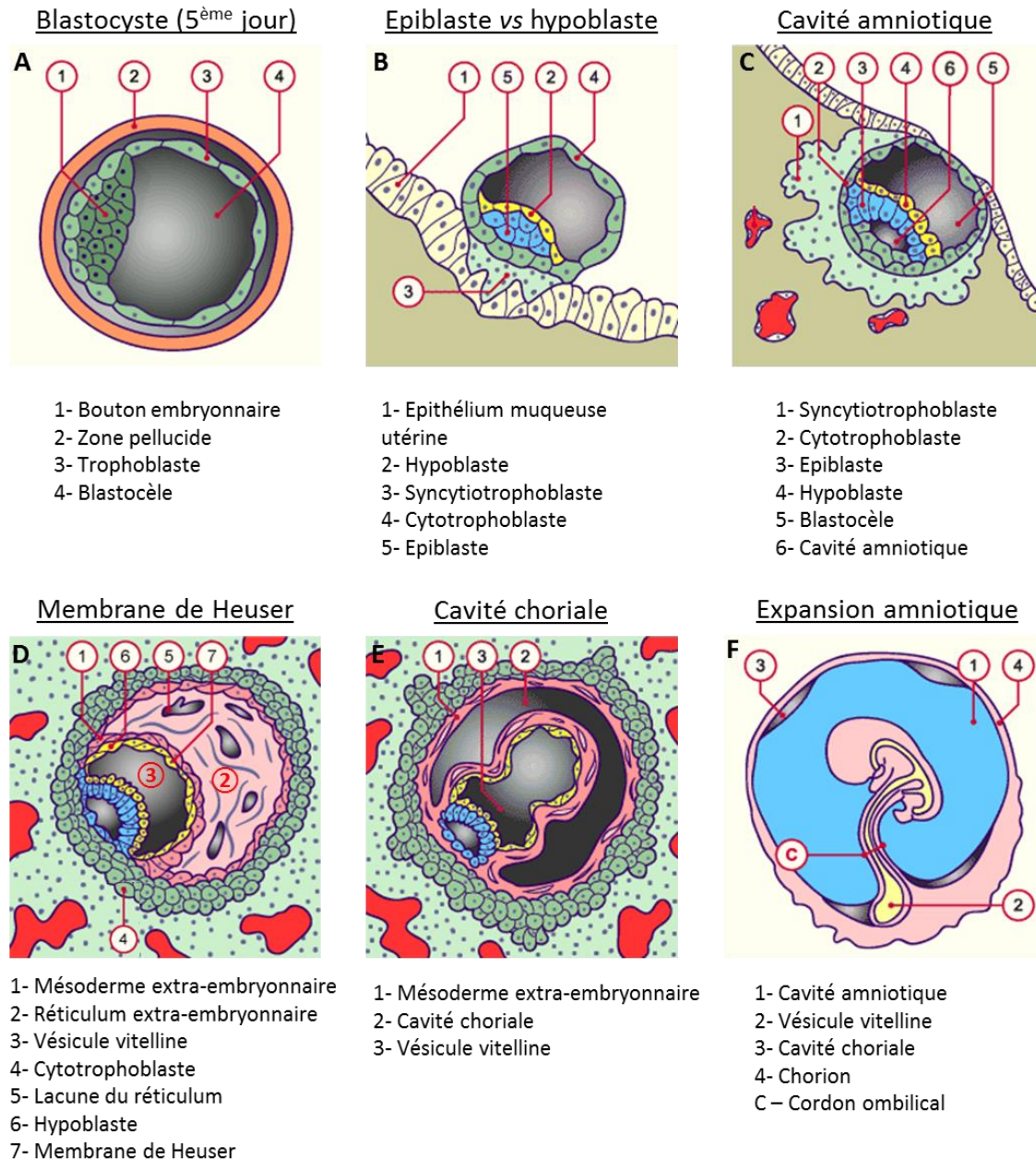


Figure 2 : Formation des cavités amniotique et choriale

(A) Au stade blastocyste (5^{ème} jour), l'œuf est composé d'un bouton embryonnaire et d'une cavité limitée par le trophoblaste, le blastocèle.

(B) Au 8^{ème} jour, l'embryon est composé de deux feuillets accolés, l'épiblaste et l'hypoblaste.

(C) Dans l'épaisseur de l'épiblaste, s'accumule du liquide creusant la cavité amniotique. Des cellules épiblastiques se différencient en amnioblastes qui vont progressivement recouvrir l'ensemble de la cavité amniotique.

(D) Entre la vésicule vitelline et le cytotrophoblaste apparaît la membrane de Heuser.

(E) Le réticulum extra-embryonnaire, produit par la membrane de Heuser et le cytotrophoblaste, s'accumule entre la vésicule vitelline et le cytotrophoblaste. Ce tissu conjonctif donne progressivement la cavité choriale.

(F) L'accroissement du volume de liquide amniotique mène à l'expansion de la cavité amniotique qui repousse l'amnios contre le chorion (Adapté de www.embryology.ch)

1) Genèse des membranes fœtales

Les membranes fœtales sont constituées de deux feuillets histologiquement distincts : l'amnios (couche interne) et le chorion (couche externe). Leur formation s'initie de manière concomitante lors de la quatrième semaine d'aménorrhée (SA), c'est-à-dire au cours de la deuxième semaine du développement embryonnaire. Au stade blastocyste (5^{ème} jour du développement), l'œuf est composé du bouton embryonnaire (qui donnera l'embryon) et d'une cavité limitée par le trophoblaste (le blastocèle) (**Figure 2A**). Au 8^{ème} jour, l'embryon est un disque didermique composé de deux feuillets accolés : épiblaste et hypoblaste (**Figure 2B**) (Pasquier & Doret, 2008; Carlson, 2018).

a- Formation de la cavité amniotique

Au sein de l'épiblaste, s'accumule du liquide creusant la cavité amniotique. Des cellules épiblastiques se différencient en amnioblastes qui tapissent progressivement l'ensemble de la cavité amniotique (**Figure 2C**). Au cours de la 6^{ème} SA, le volume de LA augmente considérablement, repoussant les parois de l'amnios qui englobe alors complètement l'embryon, ne respectant que le cordon ombilical.

b- Formation de la cavité chorale

De l'autre côté, l'hypoblaste prolifère et forme la vésicule vitelline qui recouvre la cavité limitée par le cytotrophoblaste. Il y a alors formation d'une membrane basale, nommée membrane de Heuser, entre la vésicule vitelline et le cytotrophoblaste. Ces structures vont produire le réticulum extra-embryonnaire, tissu conjonctif lâche et acellulaire. Ce tissu conjonctif est progressivement circonscrit par les cellules mésoblastiques, puis des lacunes se forment en son sein donnant lieu à l'apparition de la cavité chorale, liée à la plaque chorale qui est composée de mésoderme extra-embryonnaire et de trophoblastes (**Figure 2D-E**).

c- Accolement des feuillets

A la fin du 1^{er} trimestre, la croissance conséquente de la cavité amniotique provoque sa mise en contact avec la cavité chorale, qui disparaît, permettant l'accolement des deux feuillets (**Figure 2F**). Leur fusion est complète lors de la 14^{ème} SA. Enfin, le chorion s'accrole également

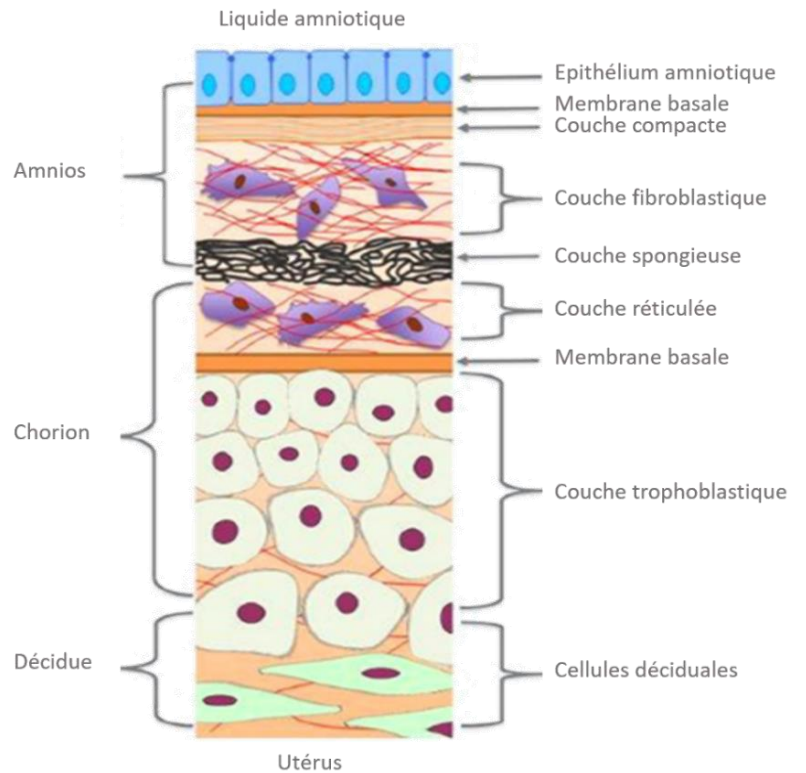
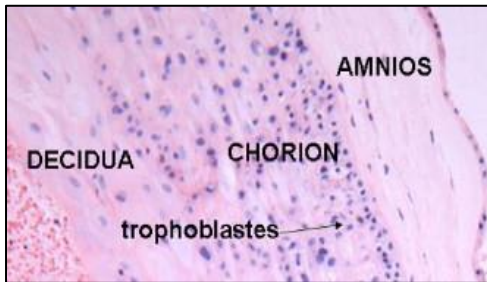


Figure 3 : Structure des membranes fœtales humaines à terme

Les membranes fœtales comprennent deux feuillets : l'amnios et le chorion ; eux-mêmes composés de plusieurs couches. Ainsi, la couche la plus superficielle, l'épithélium amniotique, est en contact direct avec le liquide. Quant à la couche la plus profonde, composée de trophoblastes chorioniques, elle interagit avec la décidue maternelle. La coupe de membranes apposée est une coloration à l'éosine-hématoxyline (x200) (Pasquier & Doret, 2008; Menon & Richardson, 2017a).

à la décidue maternelle, les trophoblastes chorioniques envahissant la décidue pariétale sous-jacente.

2) Structure des feuillets des membranes fœtales à terme

a- L'amnios

L'amnios est un tissu translucide situé du côté fœtal, en contact direct avec le LA. D'une épaisseur d'environ 100µm, il est composé de cinq couches, qui sont de la cavité amniotique vers le chorion (**Figure 3**) (Bourne, 1960; Parry & Strauss, 1998):

- ❖ *L'épithélium amniotique* : correspondant à une monocouche de cellules épithéliales cuboïdes, pourvues de microvillosités apicales, donnant un aspect en brosse au contact du LA. Ces cellules sont riches en canaux transmembranaires ce qui permet une communication optimisée avec le milieu extracellulaire.
- ❖ *La membrane basale amniotique* : composée de fibres de collagènes de type III, IV, V et de glycoprotéines (laminines, fibronectine).
- ❖ *La couche compacte* : également dépourvue de cellules, elle contient des collagènes (types I et III) qui font d'elle le squelette fibreux principal de l'amnios et lui assure sa forte résistance à l'étirement au cours de la grossesse.
- ❖ *La couche fibroblastique* : il s'agit de la couche la plus épaisse de l'amnios, composée de fibroblastes encastrés dans une matrice extracellulaire formée de collagènes et de molécules non-collagéniques.
- ❖ *La couche intermédiaire ou spongieuse* : en contact avec le chorion, cette couche est aujourd'hui d'avantage considérée comme une zone intermédiaire amnio-chorionique. Contenant quelques fibroblastes, elle constitue un maillage de collagènes et de protéoglycanes qui lui confèrent une forte hydratation. Cette propriété biophysique permet à l'amnios de glisser sur le chorion sous-jacent.

b- Le chorion

Accolé à la décidue maternelle, le chorion est un tissu plus opaque environ quatre fois plus épais que son voisin (400µm) mais pourtant moins résistant aux forces de tension. Il est, quant à lui composé de trois couches, décrites comme suit, du versant fœtal vers le versant maternel :

- ❖ *La couche réticulaire* : est la couche la plus épaisse du chorion, elle est riche en collagènes et protéoglycanes et contient quelques fibroblastes.
- ❖ *La membrane basale choriale* : adhère fermement à la couche précédente et constitue un support pour la couche sous-jacente de par sa composition en collagènes de type IV, laminines et fibronectine.
- ❖ *La couche trophoblastique* : strate cellulaire comprenant 2 à 10 couches de cellules trophoblastiques, apparentées aux trophoblastes placentaires.

Les membranes fœtales sont des tissus qui ne sont ni innervés ni vascularisés. Ainsi, l'oxygène et les nutriments leur sont apportés par diffusion depuis le LA et la choriodécidue pour l'amnios, tandis que le chorion est uniquement nourri et oxygéné grâce aux vaisseaux sanguins de la décidue maternelle.

c- Cellules immunitaires présentes au sein des membranes fœtales

Les cellules immunitaires ne représentent qu'une proportion mineure des cellules totales des membranes fœtales, mais elles ne sont pas à négliger. Récemment, les travaux de Sarah O. Jacobs ont apporté une caractérisation plus précise des populations de cellules immunitaires présentes au sein des membranes fœtales. Cette étude met notamment l'accent sur les neutrophiles, les leucocytes augmentant dans ces tissus lors du travail, mais aussi sur les cellules NK, représentant 25 à 34% des leucocytes des membranes fœtales (Jacobs *et al*, 2020).

Par ailleurs, il a été retrouvé des macrophages d'origine fœtale, nommées cellules de Hofbauer, au sein des couches fibroblastique et spongieuse de l'amnios. Elles seraient ici impliquées dans l'élimination du méconium, contenu intestinal du fœtus déversé dans le LA. Elles ont été également décrites dans les couches réticulaire et trophoblastique du chorion. Au niveau de la plaque choriale, elles joueraient non seulement un rôle dans la morphogénèse et l'angiogénèse placentaire, mais aussi dans la réponse immune, l'homéostasie et le transport ionique à travers la barrière materno-fœtale (Reyes *et al*, 2017).

3) Propriétés et fonctions

Les membranes fœtales constituent ainsi une interface tissulaire complexe entre la mère et le fœtus, comparables à un réservoir biologique ajustable à l'intérieur duquel le futur nouveau-né peut se développer, croître, bouger : commencer à exister.

a- Mais jusqu'où peuvent-elles s'étirer ?

Elles font front à l'augmentation du volume du LA (environ 800 ml à terme), à la croissance considérable du bébé parfois agité (un coup de pied d'un fœtus de cinq mois peut déplacer les membranes fœtales de 7 mm), aux tensions de l'utérus semi-rigide grandissant lui aussi et pourtant elles résistent jusqu'à la fin de leur contrat : l'accouchement. Mais quelles propriétés leur confèrent cette impressionnante résistance ? La réponse se trouve dans la composition des matrices extracellulaires de ces tissus. En effet, dès 1977, Lavery et Miller ont établi la nature viscoélastique de ces tissus en réponse à une déformation (Lavery & Miller, 1977). Plus précisément, la forte teneur en collagènes, notamment celle de la couche compacte de l'amnios en collagène de type I permet aux tissus de s'allonger, de s'affiner, dans une certaine limite intrinsèque bien évidemment. L'amnios a d'ailleurs été décrit comme plus résistant aux forces de tension que le chorion grâce à l'existence de ponts de collagènes (types IV et V) qui relient la membrane basale aux couches plus profondes de l'amnios, et à la présence de molécules d'eau emprisonnées dans la couche spongieuse qui permettent une meilleure absorption des chocs physiques (Oyen *et al*, 2006; Verbruggen *et al*, 2017). Cependant, même si ces propriétés biophysiques des membranes fœtales sont essentielles à la sauvegarde du fœtus, elles ne garantissent évidemment pas une protection systématique contre tous les traumatismes extérieurs (chutes, accidents, coups, ...), qui sont à l'origine de complications pour 6 à 7% des grossesses, conduisant potentiellement à des atteintes placentaires, utérines, à des avortements spontanés, ou des naissances prématurées (travail pré terme, rupture prématurée des membranes fœtales) (Connolly *et al*, 1997; Pearce & Martin, 2016).

b- L'équilibre des fluides : homéostasie du liquide amniotique

C'est à partir du 8^{ème} jour post-fécondation, que commence la sécrétion de ce fluide potentiellement par les amnioblastes, mais cela n'a pas encore été clairement démontré.

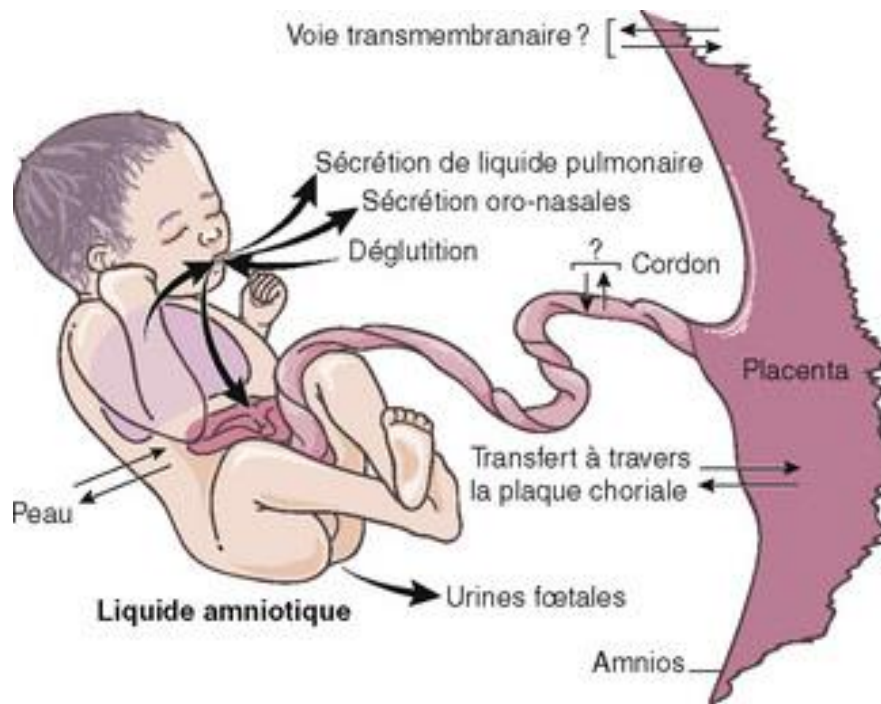


Figure 4 : Homéostasie du liquide amniotique

Plusieurs acteurs collaborent à la formation et à l'élimination du liquide amniotique. Les deux principales sources sont la diurèse fœtale et les sécrétions pulmonaires, tandis que les deux principales voies de réabsorption sont la déglutition fœtale et la voie intra-membranaire (peau du fœtus et amnios recouvrant le cordon et la plaque choriale). Une autre voie de réabsorption est la voie trans-membranaire). (<https://clemedicine.com/2-regulation-du-liquide-amniotique/>)

Parallèlement, les sécrétions utérines s'associent à la composition du LA (Burton *et al*, 2002). Puis lors de la seconde moitié de la grossesse, il est principalement composé des sécrétions pulmonaires (200-300 ml/jour à terme) et de l'urine (600ml/jour à terme) fœtales tandis que les deux principales voies de réabsorption sont la déglutition fœtale et la voie intra-membranaire. Cette dernière consiste à l'absorption des solutés par la peau du fœtus et par l'amnios recouvrant le cordon ombilical et la plaque chorale. Ces deux voies concernent chacune 200 à 500 ml échangés par jour à terme (Brace, 1997) (**Figure 4**). Cependant bien qu'encore peu décrite, il existe une voie transmembranaire échangeant environ 10 ml par jour. En effet, les membranes fœtales sont des tissus perméables à l'eau et à d'autres molécules (glycérol, urée) et présentent notamment des protéines transmembranaires, les aquaporines, impliquées dans cette régulation du volume (Prat *et al*, 2012; Kobayashi & Yasui, 2010; Wang *et al*, 2001). Par ailleurs, une transcytose vacuolaire (mécanisme de transport des molécules d'un pôle à l'autre d'une cellule via des vacuoles) participe à cette diffusion, ce mécanisme serait régulé par le facteur de croissance VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), comme démontré sur modèle ovin (Cheung *et al*, 2010; Bogic *et al*, 2001).

Ainsi, une régulation fine du LA (volume, composition, renouvellement) durant la grossesse est essentielle au bon développement du fœtus. Une dysrégulation pourra donner lieu à des pathologies obstétricales graves telles que l'oligohydramnios (quantité trop faible de LA) ou le polyhydramnios (quantité trop importante). En effet, un oligohydramnios augmente le risque de fausse couche, de détresse fœtale ou encore de retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Khatun *et al*, 2017). Quant au polyhydramnios, il peut être associé à des cas de rupture prématurée des membranes fœtales, de travail prématuré ou d'hémorragie post-partum (Hamza *et al*, 2013).

c- Bouclier immunitaire au service de l'enfant-roi

Au cours de la grossesse, des bactéries, virus, champignons peuvent pénétrer la cavité amniotique empruntant diverses voies (hématogène, placentaire, vaginale) et causer une infection intra-amniotique, menaçant l'intégrité du fœtus (Nadeau *et al*, 2016; Stirling *et al*, 2016; Vinturache *et al*, 2016). Ainsi, il se trouve que pour limiter ces risques, les membranes fœtales, non seulement représentent une barrière physique (certes imparfaite), mais elles



Figure 5 : Propriétés antimicrobiennes des membranes fœtales

Les membranes amniotiques assurent un rôle de défense immunitaire lors de la grossesse. En effet, elles sont à l'origine de la sécrétion de plusieurs composés antimicrobiens. Ainsi, comme illustré ci-dessus, le simple fait de déposer des explants de membranes sur une culture bactérienne (ici de *Bacillus cereus*) provoque la formation de zone d'inhibition de croissance bactérienne (Zare-Bidaki *et al*, 2017).

assurent aussi la maintenance d'un environnement stérile en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. En effet, le chorion comme l'amnios ont été décrits pour avoir des capacités antibactériennes en inhibant la croissance de différentes familles de souches bactériennes (Colibacilles, Lactobacilles, Staphylocoques, Streptocoques, ...) (**Figure 5**) (Kjaergaard *et al*, 2001; Zare-Bidaki *et al*, 2017). De nombreux travaux ont pu expliquer cette précieuse faculté par la présence de molécules antimicrobiennes et anti-inflammatoires telles que la lactoferrine ou l'acide hyaluronique, ce dernier permettant l'adhésion de lymphocytes au sein du stroma amniotique (Kanyshkova *et al*, 2001; Higa *et al*, 2005). Par ailleurs, il a également été décrit la production de molécules antivirales et antibactériennes comme les β -défensines 1, 2, 3 mais aussi l'identification d'élafine, autre peptide antimicrobien, au sein de l'épithélium amniotique ou des trophoblastes chorioniques. Il est bon de noter ici que l'expression des transcrits codant ces deux types de molécules est stimulée par des signaux pro-inflammatoires comme, par exemple, l'interleukine 1 bêta / IL1 β (Buhimschi *et al*, 2004; King *et al*, 2007; Szukiewicz *et al*, 2016). Dans la même logique, il a été démontré que des cellules épithéliales amniotiques traitées avec des cytokines telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β ou le Facteur de Nécrose Tumorale α (TNF α) conduisaient à une augmentation de la transcription de l'Inhibiteur de Protéases Sécrétées par les Leucocytes (SLPI), molécule impliquée dans la protection des tissus épithéliaux en cas d'inflammation (Zhang *et al*, 2001).

Enfin, l'utilisation généralisée notamment du feuillet amniotique en médecine régénérative, allant de la chirurgie ophtalmique lors d'altérations cornéennes, à la chirurgie dentaire pour traiter des déchaussements, en passant par la dermatologie pour le soin des brûlures ou l'ulcère du pied diabétique, illustre parfaitement la force des propriétés antimicrobiennes des membranes fœtales (Bhide & Tenenbaum, 2020; Krysik *et al*, 2020; Su *et al*, 2020; Muraine *et al*, 2006).

d- Fin du contrat : participation à la parturition

Après ces neuf mois à temps plein, le moment survient pour les membranes fœtales d'accomplir leur ultime tâche : rompre. En effet, la rupture de la poche des eaux à terme (soit après 37 SA) constitue un élément majeur de l'accouchement. Cette rupture est le fruit d'une préparation progressive complexe faisant intervenir de nombreux processus moléculaires et

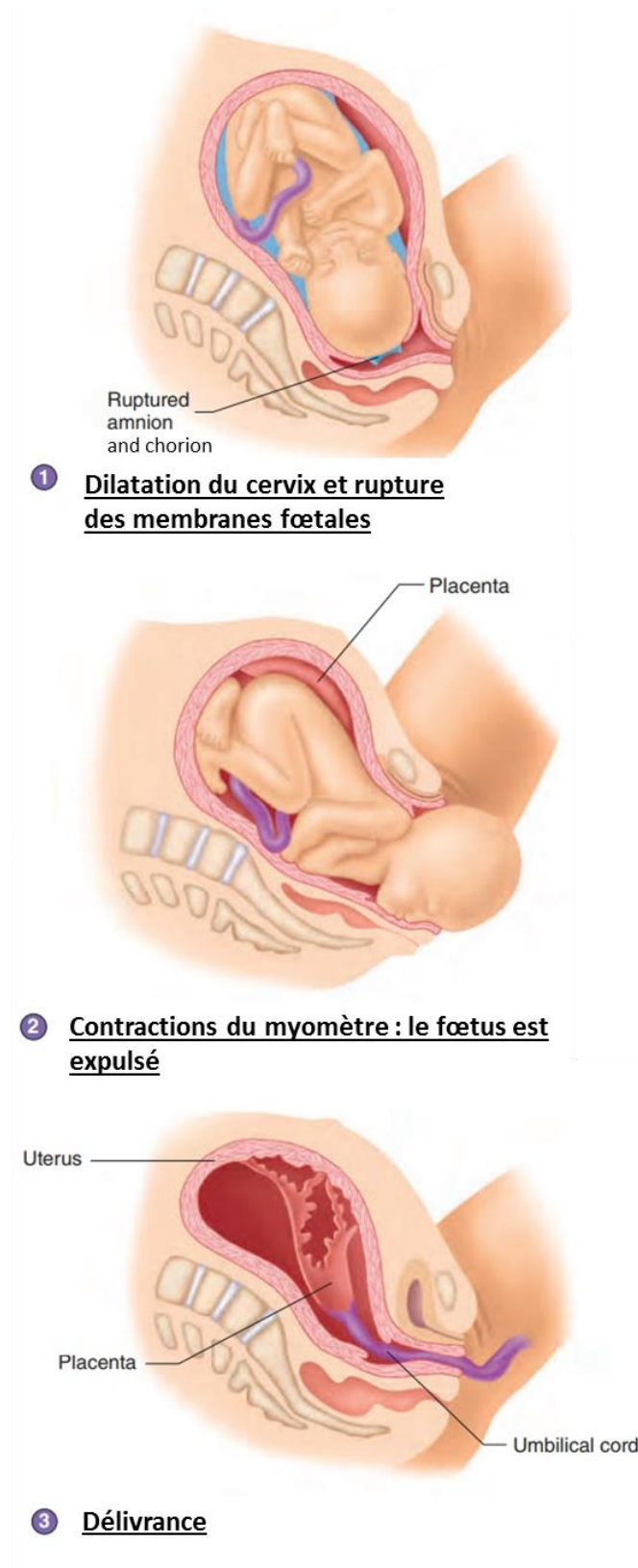


Figure 6 : Etapes majeures de la parturition

La parturition humaine comprend trois phases majeures incluant la maturation du cervix (dilatation et effacement) associée à la rupture des membranes fœtales, les contractions du myomètre et la délivrance (expulsion du placenta). (Adapté de http://www.brainkart.com/article/Parturition_22007)

cellulaires visant à fragiliser les MF qui seront plus spécifiquement décrits dans le chapitre suivant. Car avant de décrire plus précisément ce phénomène, il ne faut pas oublier qu'il n'est pas le seul à s'inscrire dans la préparation de cet événement encore plus considérable qu'est la parturition. Elle aussi, est un parfait exemple de synergie de plusieurs signaux biologiques provenant de plusieurs acteurs qui vont sonner l'heure de ce dénouement tant attendu, la naissance de l'enfant.

II. Quels acteurs pour orchestrer la parturition ?

Au bout de 37 SA, lorsque le fœtus est physiologiquement préparé à devenir un nouveau-né, arrive le temps de la naissance. La parturition humaine comprend trois phases incluant la **maturation du col** (dilatation et effacement), les **contractions du myomètre** et la **délivrance** (expulsion du placenta) (**Figure 6**). Ainsi, des modifications physiologiques, moléculaires, anatomiques et cellulaires surviennent à la fois chez la mère et le fœtus.

1) Les hormones s'emballent pour réveiller le myomètre et effacer le cervix

Durant la grossesse, il existe une balance dynamique entre les forces utéro-toniques et les forces à l'origine de la quiescence utérine *e.g* les forces qui maintiennent le cervix fermé s'opposant à celles qui vont permettre sa dilatation. Ainsi, le myomètre demeure quiescent et le col de l'utérus scellé tout au long de la grossesse, pour à terme (entre 37 et 42 SA) que l'un se réveille et entre en travail et que l'autre finisse par s'effacer et laisser la voie. Il va donc survenir la répétition régulière de contractions utérines avec une fréquence et une intensité croissante qui vont permettre l'expulsion du fœtus hors de son logement à travers cette porte du cervix désormais ouverte. Brièvement, il faut savoir que la contractilité du myomètre est contrôlée par des potentiels d'action attribués à l'activation de canaux ioniques notamment calciques (Sanborn, 2000). La phase de quiescence se déroule sous le joug de la progestérone, en forte expression. Mais à l'approche du terme, une chute de l'activité de la progestérone s'observe, et les œstrogènes prennent le relais, augmentant l'expression des récepteurs utérins à l'ocytocine. Les signaux hormonaux jouant dans cette balance sont à la fois maternels mais aussi fœtaux (Kota *et al*, 2013; Weiss, 2000).

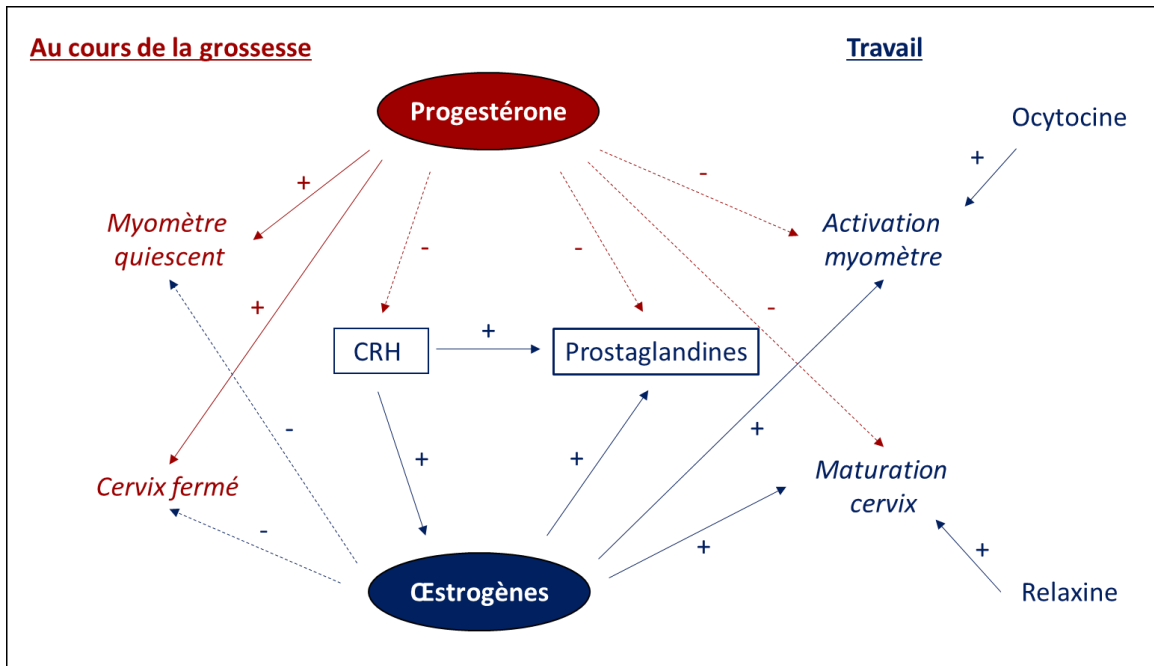


Figure 7 : Contrôle hormonal lors de la grossesse et la parturition humaine.

Durant la grossesse, il y a mise en place d'une balance dynamique entre les effets de la progestérone, favorisant la quiescence utérine, contre ceux exercés par les œstrogènes, activant la contractilité utérine. (Kota *et al*, 2013)

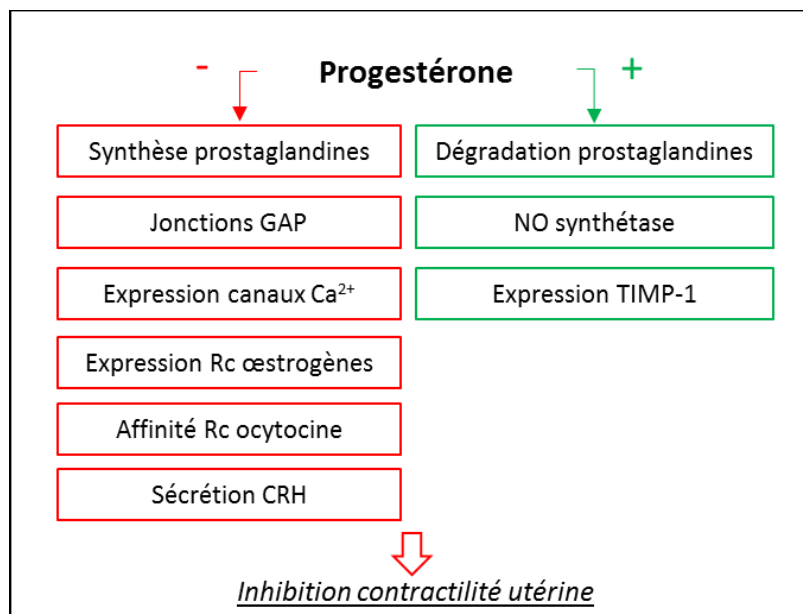


Figure 8 : Activités de la progestérone favorisant la quiescence utérine.

La progestérone est une des hormones principales intervenant dans la grossesse. Globalement, elle inhibe les acteurs favorisant la contractilité utérine (prostaglandines, œstrogènes, oxytocine, CRH, jonctions GAP et canaux calciques). L'induction de l'expression de la NO synthétase contribue également au maintien de la quiescence utérine. D'autre part, elle préserve le cervix de la collagénolyse en stimulant l'expression d'inhibiteurs des métalloprotéases (TIMP-1) (Adapté de (Vannuccini *et al*, 2016)).

a- Progestérone

Tout d'abord d'où provient la progestérone durant la grossesse ? Il est connu que la source première correspond au corps jaune jusqu'à la 7-9^{ème} semaine de gestation pour donner le relais au placenta. Et s'il y a bien un duel hormonal lors de la grossesse pour imposer sa loi sur le territoire du myomètre, il s'agit de cette balance dynamique entre la progestérone et les œstrogènes (**Figure 7**).

Mais par quelles voies la progestérone a-t-elle maintenu le myomètre relativement endormi ? (**Figure 8**). Tout d'abord il a été décrit *in vitro* que cette hormone inhibe la formation des jonctions gap, (à l'inverse des œstrogènes), mais stimule l'expression utérine de la NO synthétase, enzyme impliquée dans la quiescence utérine. Par ailleurs, la progestérone diminue non seulement l'expression des canaux calciques et des récepteurs à l'ocytocine, mais aussi la production des prostaglandines (Vannuccini *et al*, 2016; Kota *et al*, 2013).

Concernant maintenant la maturation cervicale, elle est freinée par la progestérone qui stimule l'expression cervicale d'inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP-1) afin de préserver le cervix de la dégradation des collagènes (Leppert, 1992).

Mais pourquoi la balance progestérone/œstrogènes s'inverse-t-elle à terme ? On pourra ici citer deux explications de façon non exhaustive. D'une part, un acteur se range aux côtés des œstrogènes : les membranes fœtales. Ces dernières vont en effet connaître une hausse de l'activité d'une enzyme impliquée dans la stéroïdogénèse : la 17 β /20 α -hydroxystéroïde déshydrogénase. Cette enzyme permet la formation du 17 β -œstradiol (œstrogénique connu pour être le plus puissant) et celle du 20 α -dihydroprogestérone (le plus faible progestatif), menant ainsi à une altération du ratio de l'activité progestérone/œstrogènes.

Quant à la diminution de l'expression des récepteurs utérins à la progestérone (PR), plusieurs mécanismes ont été proposés, il s'agirait notamment d'un switch d'isoforme produite (augmentation du ratio PR-A/PR-B) (Mesiano *et al*, 2002, 2011) et d'une baisse des niveaux de co-facteurs nécessaires à l'activité des PR (chute d'expression de l'AMPc-CBP, SRC2 et 3) (Condon *et al*, 2003).

b- Œstrogènes

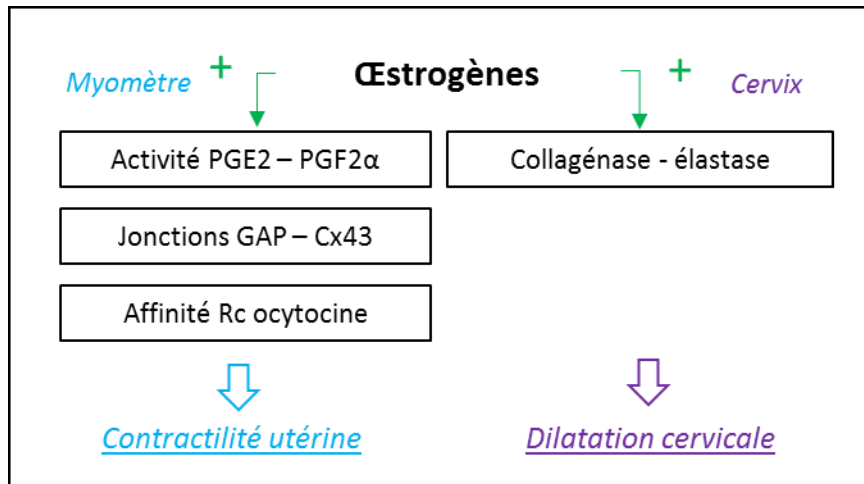


Figure 9 : Activités des œstrogènes lors de la parturition.

Les œstrogènes agissent d'une part sur le myomètre en stimulant la production des prostaglandines PGE2 et PGF2α et de leurs récepteurs, mais aussi celle des récepteurs à l'ocytocine. De plus, ils permettent la synthèse de connexines (connexine 43) et jonctions gap permettant la transmission du signal contractile au sein du myomètre. Au niveau du cervix, ils sont à l'origine d'un réarrangement de la matrice extracellulaire provoquant une dilation du col. (Vannuccini *et al*, 2016)

La grossesse peut se définir comme un état hyper-œstrogénique, avec une augmentation croissante d'œstrogènes circulants suivant l'âge gestationnel (Goodwin, 1999; Weiss, 2000). Le placenta constitue l'usine principale de production de ces hormones. Cependant, il lui manque un acteur majeur dans la chaîne de production, l'enzyme CYP17, permettant la fabrication de l'œstradiol à partir de la matière première nécessaire, la progestérone. Le placenta compense donc en produisant une autre forme d'œstrogènes, la forme majeure circulante au cours de la grossesse, l'œstriol, en aromatisant le DHEAS (déhydro-épi-androsténédione sulfate) préalablement hydroxylé par le foie. En effet, contrairement aux périodes où la femme n'est pas enceinte, l'ovaire est une source mineure d'œstrogènes durant la grossesse.

Ainsi, les œstrogènes agissent sur le myomètre en stimulant d'une part la production des prostaglandines PGE2 et PGF2 α et l'expression de leurs récepteurs, mais aussi celle des récepteurs à l'ocytocine. D'autre part, ils induisent l'expression d'enzymes impliquées dans la contraction musculaire (calmoduline, myosine kinase) et augmentent la synthèse de connexines (connexine 43) et jonctions gap permettant la transmission du signal contractile au sein du myomètre. L'ensemble de ces modifications conduit à la formation de contractions utérines coordonnées. Par ailleurs, les œstrogènes agissent sur le cervix en induisant l'expression de collagénases et élastases qui vont conduire au réarrangement des collagènes et élastine et *in fine* à la dilatation du col utérin (**Figure 9**) (Andersson *et al*, 2008; Chibbar *et al*, 1995; Mesiano *et al*, 2002).

c- L'axe corticotrope ou HPA (hypothalamo-pituitaire-adrénalien)

Une des voies endocrines commune à probablement tous les vivipares est l'axe corticotrope, dit aussi HPA (Challis JRG *et al*, 2000). Cette cascade conduit à l'activation et à la stimulation du myomètre par l'augmentation de la production d'agonistes utéro-toniques tels que l'ocytocine et prostaglandines. En fait, la corticolibérine ou CRH (Corticotropin Releasing Hormone), peptide sécrété par l'hypothalamus, est également exprimé par le placenta, les trophoblastes chorioniques, l'amnios et la décidue (le placenta est d'ailleurs la source majeure de CRH dès le 2^{ème} trimestre de la grossesse). La CRH va stimuler l'hypophyse qui va à son tour produire une hormone, l'ACTH (Adreno CorticoTropic Hormone) excitant quant à elle les glandes surrénales qui vont dès l'heure libérer du cortisol. Ainsi cette activation maternelle et

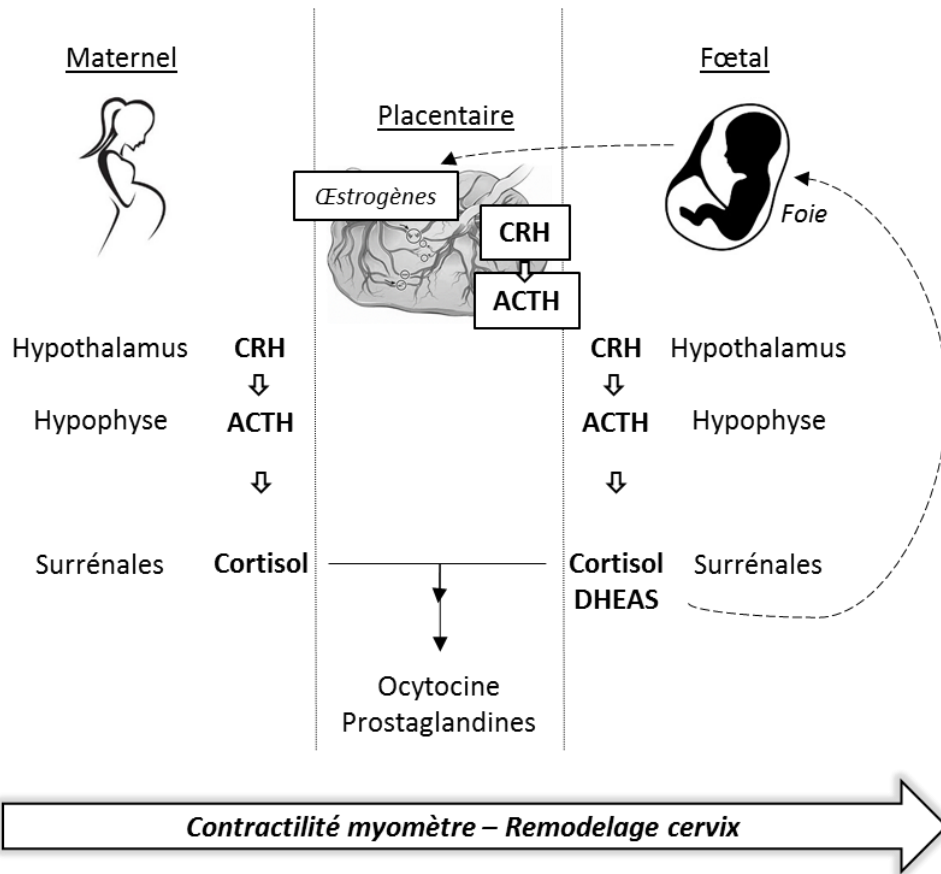


Figure 10 : Implication de l'axe corticotrope lors de la parturition

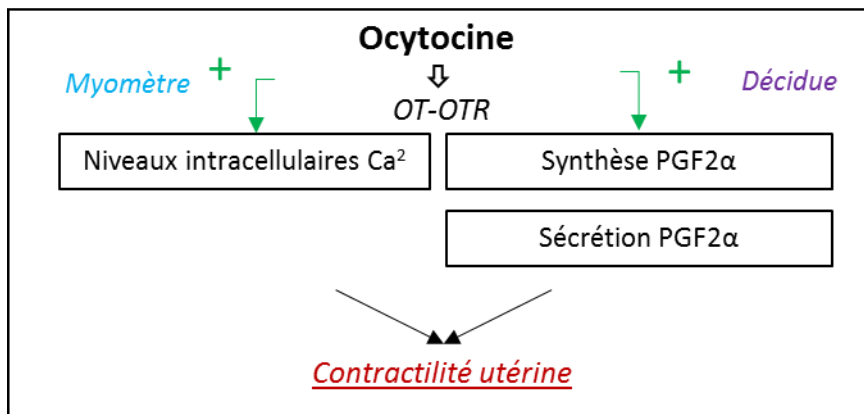


Figure 11 : Action contractile de l'ocytocine en fin de grossesse

foétale de l'axe HPA conduit à une augmentation progressive des taux circulants de cortisol à partir de la moitié de la gestation. Premièrement, un des effets de l'ACTH est d'activer au sein des surrénales fœtales, la sécrétion du DHEAS, un précurseur d'œstrogènes, converti ensuite par le foie du fœtus en 16-hydroxy DHEAS qui va alors migrer vers le placenta où il sera métabolisé en estradiol (E2), estrone (E1) et œstriol (E3). Par ailleurs, l'importance de l'axe HPA est accentuée par l'action du cortisol sur la maturation pulmonaire du fœtus dont il aura besoin pour la vie extra-utérine. De plus, le cortisol va promouvoir l'expression de nombreux gènes placentaires incluant ceux codant pour l'ocytocine et les prostaglandines (notamment PGE2). La production des prostaglandines est également stimulée au sein des membranes fœtales et de la décidue maternelle, prostaglandines qui effectuent un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de CRH dans ces mêmes tissus. De plus, la CRH est aussi stimulée par des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, cet axe endocrinien conduit à la vasodilatation utérine, fœtale et placentaire et à la contraction des muscles lisses (**Figure 10**).

d- Ocytocine

L'ocytocine est un neuropeptide synthétisé par l'hypothalamus et joue un rôle primordial dans la parturition humaine en lien direct avec ses récepteurs (OT et OTR) (Blanks & Thornton, 2003). Historiquement, elle avait été décrite comme le facteur initiateur de la parturition, puisqu'une simple administration clinique d'ocytocine déclenche le travail. De nos jours, il est désormais connu que le processus de parturition est plus complexe. Toutefois, il a été en effet décrit, lors du travail spontané, un pic de libération d'ocytocine par la neurohypophyse, accompagné d'une hausse d'expression de ses récepteurs et de leur affinité au sein du myomètre (Blanks *et al*, 2003). Par ailleurs, il existe également une production locale d'ocytocine qui n'est pas moindre. Les tissus gestationnels, qu'il s'agisse des membranes fœtales ou de la décidue, expriment des ARN messagers codant pour l'ocytocine, dont la transcription est d'ailleurs stimulée par les œstrogènes lors du travail (Chibbar *et al*, 1993, 1995).

Les effets pro-contractiles de l'ocytocine sont doubles, ainsi dans le myomètre elle va agir directement sur la contractilité en augmentant la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} , et dans la décidue, elle va stimuler la synthèse de prostaglandines (PGF2 α notamment), conduisant indirectement là encore à l'activation du myomètre (Fuchs *et al*, 1982, 1991). La

prostaglandine $\text{PGF}_2\alpha$ induit en retour l'expression des récepteurs à l'ocytocine et la formation de jonctions gap (Husslein, 1984) (**Figure 11**).

a- Prostaglandines

Il faut savoir que le précurseur majeur des prostaglandines est l'acide arachidonique, et que ce composé est lui-même formé à partir de glycérophospholipides, recelés en fortes quantités au sein des membranes fœtales (phosphatidylinositol et phosphatidyléthanolamine). Ces quantités augmentent plus l'âge gestationnel avance, conséquence des taux croissants d'œstrogènes. Grossièrement, la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines E_2 , $\text{F}_2\alpha$, PG_{12} , PGD_2 fait intervenir en premier lieu des cyclo-oxygénases (COX), puis en second lieu des synthèses spécifiques (Challis *et al*, 2002).

Les prostaglandines jouent un rôle central dans la parturition en participant à la fois au réveil du myomètre mais également sur l'effacement du col. En effet, les concentrations de PGE_2 et $\text{PGF}_2\alpha$ augmentent dans le LA avant le travail, mais aussi au sein de l'utérus et des membranes fœtales (Romero *et al*, 1996; Phillips *et al*, 2014). Des études ont mis en évidence qu'administrer cliniquement des prostaglandines provoque des contractions utérines tandis que des inhibiteurs de prostaglandines induisent un délai de l'entrée en travail (Mitchell *et al*, 1995). D'un autre côté, l'administration vaginale de PGE_2 est utilisée cliniquement pour induire la dilatation cervicale (Hirsch *et al*, 2017; McLaughlin & Devoe, 2017).

b- Relaxine

La relaxine, hormone peptidique de petite taille (6kDa), présente de nombreuses propriétés impliquées dans le système reproducteur notamment dans l'effacement du cervix. La relaxine circulante est produite au sein des ovaires par le corps jaune. Cependant, il est à noter que des travaux ont démontré le rôle non essentiel de cette relaxine circulante dans la dilatation cervicale (Eddie *et al*, 1990). De plus, cette hormone peptidique est également générée par le placenta et la décidue, exerçant alors une action plus localisée, de par la production de collagénases (MMP1, 2) et l'inhibition de TIMP1, un inhibiteur de métalloprotéases (Palejwala *et al*, 2001).

2) La décidue s'enflamme.

Directement sous-jacente au chorion, se trouve la décidue maternelle, tissu dérivé de l'endomètre. Chez la femme, le début de vie de la décidue prend lieu lors de la pré-

décidualisation périvasculaire juste avant l'implantation de l'embryon (Muter *et al*, 2015). La décidue représente le tissu maternel le plus proche de l'ensemble foëto-placentaire et dispose d'un accès direct au sang maternel. Cet organe est composé de cellules stromales (fibroblastes et mésenchymales), et est fortement infiltré par des cellules immunitaires maternelles, dont la concentration varie au cours de la grossesse (Vacca *et al*, 2015; Vince *et al*, 1990). Parmi ces cellules, et de manière non exhaustive, ont tout d'abord été retrouvées les cellules NK (Natural Killer), à l'origine de la production de cytokines jouant un rôle critique dans le remodelage vasculaire de l'interface mère-foetus (Zhang *et al*, 2011). Mais aussi, des neutrophiles en abondance, constamment disponibles en cas d'infection locale, telle qu'une infection intra-amniotique. Les mastocytes présents, quant à eux, stimulent l'angiogénèse de par la production de facteurs de croissance comme le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) (Gomez-Lopez *et al*, 2018; Amsalem *et al*, 2014). Enfin, parmi les phagocytes mononucléaires, les macrophages constituent le type majeur des cellules immunitaires présentes au sein de la décidue notamment en début de grossesse. Ils exercent plusieurs rôles, requis pour le remodelage tissulaire et le maintien d'une homéostasie en participant à la clairance des débris cellulaires et des cellules apoptotiques, et ils sont bien évidemment impliqués dans la régulation de la réponse immune (Faas & De Vos, 2018). Des cellules dendritiques et lymphocytes T sont également retrouvés dans cet organe, qui peut sans aucun doute être qualifié d'immunitaire.

Ainsi, la décidue constitue un médiateur des signaux inflammatoires « activateurs » de la parturition en contrôlant le type et la fonction de ses cellules immunitaires résidentes (Norwitz *et al*, 2015). En effet, les cellules stromales de la décidue exercent une action immuno-modulatrice en sécrétant des facteurs impliqués dans la vasodilatation (kynurénine) et le chimiotactisme (CCL5, CCL1, CXCL5, MCP1) et en supportant la différenciation et le trafic des cellules immunitaires (Vacca *et al*, 2015; Engert *et al*, 2007). A terme, les leucocytes de la décidue exposent de cette manière un phénotype inflammatoire boosté, incluant une forte expression de molécules pro-inflammatoires (IL6, TNF α , IL1, IL4) (Galazka *et al*, 2009; Castillo-Castrejon *et al*, 2014). Enfin, l'étirement provoqué par la croissance du foetus induit l'expression déciduale de la métalloprotéase 1, et des chimiokines IL8 et GRO- α (Zhao *et al*, 2013).

En fait, progressivement, les signaux inflammatoires vont conduire à la sénescence des cellules déciduales. Il s'agit d'un processus physiologique de vieillissement cellulaire se

traduisant tout d'abord par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les cellules endommagées acquièrent alors un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP). Cette signature spécifique de la sénescence correspond à la sécrétion de facteurs capables de recruter les cellules immunitaires et de modifier la matrice extracellulaire ce qui permet *in fine* le repeuplement du tissu par des cellules progénitrices (Hernandez-Segura *et al*, 2018; McHugh & Gil, 2018a). Il existe deux types de sénescence : (i) répllicative, qui résulte de la capacité de prolifération limitée d'une cellule, dépendant de la réduction de la longueur des télomères au fur et à mesure des cycles cellulaires ; (ii) induite par un stress en réponse à divers facteurs (de Magalhães & Passos, 2018).

Des travaux ont prouvé que cette sénescence déciduale provoquait une augmentation de la production des prostaglandines qui, comme décrit précédemment, participent au réveil du myomètre et à l'effacement du col utérin (Hirota *et al*, 2010). Par ailleurs, ce processus de sénescence et d'inflammation déciduales conduit à une répression de l'expression des récepteurs à la progestérone, ce qui pourrait contribuer localement au déclin du règne gestationnel de la progestérone et donc là encore à la fin de la quiescence utérine (Guzeloglu-Kayisli *et al*, 2015). Enfin, il a été décrit que la sénescence était associée à la sécrétion de métalloprotéases, ce qui participe à n'en pas douter à la fragilisation des membranes fœtales et donc à leur rupture à terme (Ulug *et al*, 2001).

3) Les membranes fœtales cèdent.

La rupture des deux feuillets des membranes fœtales accompagnée par la perte « des eaux » (eg. LA), constitue à terme et comme évoqué précédemment un des événements majeurs permettant la naissance de l'enfant. La préparation de cette étape cruciale est détaillée ci-dessous.

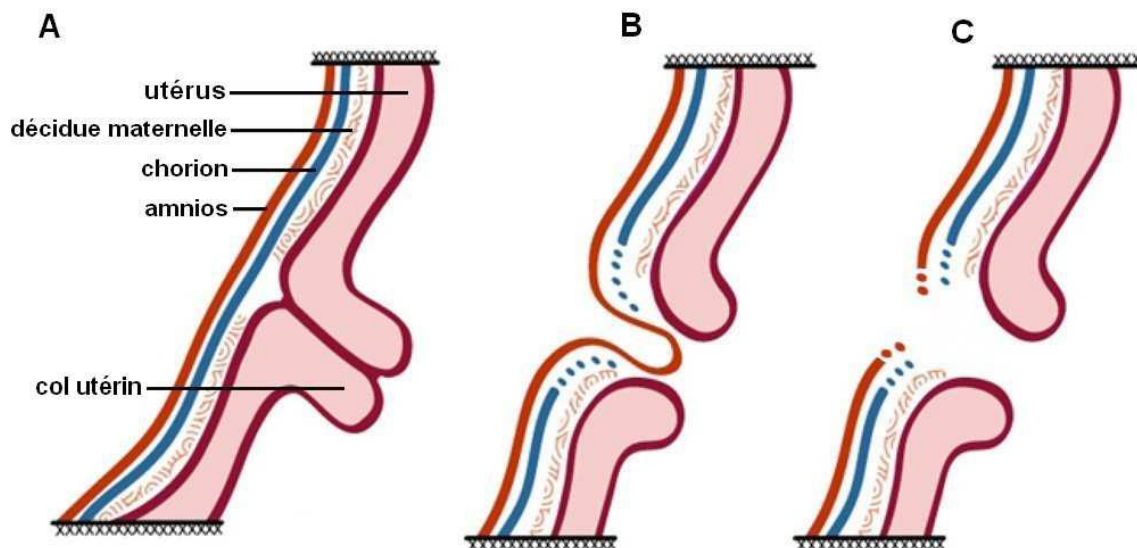


Figure 12 : Chronologie de la rupture des membranes fœtales à terme

La rupture des membranes fœtales comprend plusieurs étapes successives. Lors de la grossesse, les deux feuillets sont accolés et le col utérin fermé (A). Plus tard, elles se distendent, engendrant une séparation de l'amnios et du chorion. Le chorion, moins résistant, rompt en premier (B), tandis que l'amnios fait hernie dans la brèche du chorion avant de rompre à son tour (C). (Adaptée de (Méhats *et al*, 2011)

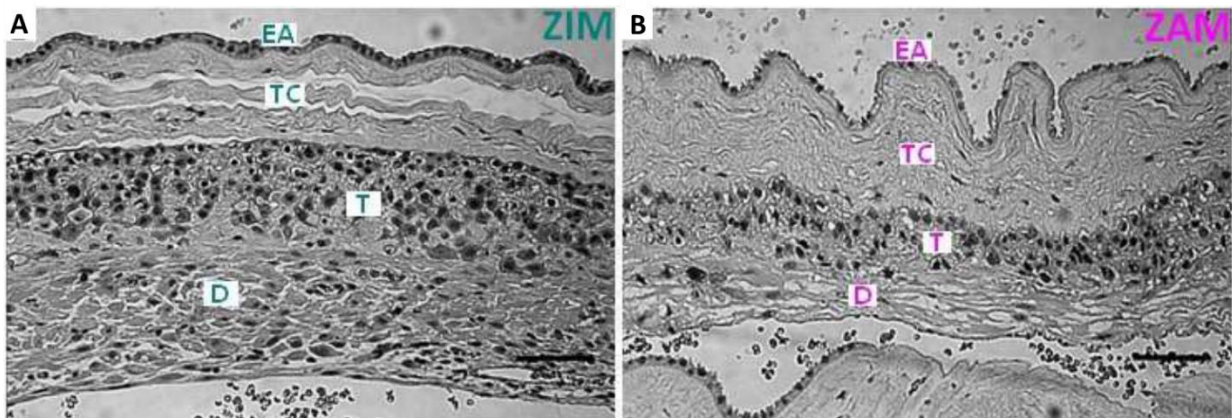


Figure 13 : Différences histologiques entre les zones ZIM et ZAM

Ces coupes histologiques de la Zone Intacte des Membranes (ZIM) (A) et de la Zone Altérée des Membranes (ZAM) (B) montrent, au sein de ZAM, un épithélium amniotique (EA) plus fin et formant des invaginations. Les couches sous-jacentes de tissu conjonctif (TC), de trophoblastes (T) sont également plus épaisses dans la zone ZIM. On peut également noter un amincissement de la décidue (D) dans ZAM. (Coloration hématoxyline-éosine, échelle =100µm) (McLaren *et al*, 1999).

CHAPITRE II : LA RUPTURE DES MEMBRANES FŒTALES OU L'IMPORTANCE D'ÊTRE SYNCHRONISÉ

I. Quand la synchronicité est parfaite : la rupture physiologique des membranes fœtales

1) Chronologie de la rupture

La rupture des membranes fœtales, amnios et chorion, survient la plupart du temps au début du travail à terme. Cependant, il a été observé que chez 8 à 10% des femmes accouchant à terme, la rupture pouvait avoir lieu spontanément avant même le commencement du travail, prouvant ainsi que la rupture des membranes fœtales n'est pas la simple conséquence des contractions utérines.

La rupture des membranes peut être décomposée en plusieurs étapes successives ; tout d'abord elles vont se distendre, puis l'amnios et le chorion se dissocient au niveau de la couche spongieuse. Le chorion, moins résistant, rompt en premier, entraînant une évagination de l'amnios dans la brèche formée, finissant par céder à son tour (**Figure 12**) (Arikat *et al*, 2006; Méhats *et al*, 2011).

Point important, cette rupture prend place logiquement au niveau des tissus en regard du col utérin or des travaux ont démontré des différences structurelles de cette zone, en fin de grossesse, comparée au reste des membranes fœtales. En effet, il a été démontré l'existence d'une « zone de morphologie altérée » (ZAM) située le long de la ligne de rupture sur des échantillons récupérés à terme suite à des naissances par voie basse, à opposer aux tissus en dehors de cet espace, la « zone de morphologie intacte » (ZIM). Histologiquement parlant, la ZAM présente une structure plus fine que la ZIM, dû à une couche trophoblastique amincie, mais aussi à une décidue plus fine voir disparue. L'épithélium amniotique est lui aussi moins épais, et présente des invaginations dans les couches sous-jacentes de tissu conjonctif, lui-même désorganisé alors qu'il est plus dense et compact au sein de la ZIM (**Figure 13**) (Malak & Bell, 1994; McLaren *et al*, 1999; El Khwad *et al*, 2005). Mieux, cette ZAM s'est révélée être déjà formée avant le travail, suggérant qu'elle n'est pas générée par l'action des contractions

utérines mais que sa fragilisation est initiée en amont du travail. Mais quels sont ces mécanismes à l'origine de la création de cette ZAM, véritable porte d'entrée sur la vie ?

2) Mécanismes cellulaires et moléculaires de la rupture

Globalement, deux facteurs sont impliqués dans l'étiologie de la rupture des membranes fœtales à terme. Premièrement, diverses modifications cellulaires et biochimiques mises en place au sein de ces tissus gestationnels, se concordent de façon programmée, fragilisant les membranes. D'autre part, la croissance continue du fœtus provoque un étirement progressif des tissus qui s'amincissent au fur et à mesure. A terme, au bout de ce processus complexe, les membranes, affaiblies, ne peuvent que céder aux contractions utérines.

a- Sécrétions hormonales

Comme évoqué plus précisément en amont, les hormones jouent un rôle crucial dans la parturition et donc dans le phénomène de fragilisation progressive des membranes fœtales. Par exemple, la relaxine libérée par le placenta et la décidue maternelle a été décrite pour stimuler d'une part l'activité collagénase (induction de l'expression de métalloprotéases) et la sécrétion de plasminogène au sein de l'amnios et du chorion *in vitro* (Koay *et al*, 1983). D'autre part, la relaxine stimule la libération d'interleukines pro-inflammatoires (IL6, IL8) par les cytotrophoblastes chorioniques et il a été démontré *in vivo* chez le singe qu'une infusion intra-amniotique de relaxine conduisait à une sécrétion de ces cytokines (Bryant-Greenwood *et al*, 2007, 2009). Ainsi, au global, par cette dégradation de la matrice extracellulaire, la relaxine diminue la résistance des membranes fœtales aux tensions comme démontré biomécaniquement dans les travaux de Petersen (Petersen *et al*, 1994).

Un autre participant s'impose dans ce processus de fragilisation, la CRH, elle aussi abordée précédemment. Cette hormone exprimée dans les tissus fœto-maternels, et dont les niveaux augmentent à terme, induit également l'expression de la gélatinase MMP9 au sein du chorion (Li & Challis, 2005).

Pour finir, il est connu qu'en fin de gestation, l'épithélium amniotique est une source de production de prostaglandine E2 (Moore *et al*, 1988). Or ce médiateur inflammatoire est bien décrit pour participer également à l'affaiblissement des membranes fœtales en induisant une réponse inflammatoire stérile qui sera traitée plus tard mais aussi en impactant sur les jonctions serrées amniotiques (Kobayashi *et al*, 2010). Enfin, là encore, des études ont démontré les propriétés collagénolytiques de la PGE2 qui joue sur l'expression des

métalloprotéases et de leurs inhibiteurs (TIMPs) et sur la formation *de novo* de collagène et de protéoglycanes (DiBattista *et al*, 1995; Tjugum & Norström, 1985).

b- Stress oxydant

Le stress oxydant est causé par l'augmentation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (mais également de l'azote), dérivant en radicaux libres qui ne sont pas suffisamment dégradés par les systèmes antioxydants. Ces radicaux libres représentent une menace cellulaire. En effet ils oxydent les lipides, les protéines et les acides nucléiques des cellules conduisant au final à la mort cellulaire. Or, durant la grossesse, une augmentation progressive d'ERO a lieu dans la cavité utérine, pour être culminant à terme. Cette amplification est due notamment la demande métabolique croissante du fœtus s'opposant à un apport maternel de substrats inchangé (Agarwal *et al*, 2005; Menon, 2019). Ainsi, ces ERO contenus dans le LA vont directement agir sur les membranes fœtales environnantes et participer à leur fragilisation notamment au niveau de la ZAM qui possèdent une activité d'enzymes antioxydantes moindre comparée à la ZIM. Ainsi la ZAM, moins défendue, est plus sensible aux effets des ERO comme démontré par une étude ayant observé qu'elle libérait plus de 8-isoprostane, un marqueur de peroxydation des lipides (Chai *et al*, 2012).

c- Apoptose

Plusieurs études se sont penchées sur l'implication de l'apoptose dans la formation de la ZAM, cette zone supra-cervicale qui présente une désorganisation tissulaire et une résistance plus qu'amointrie. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, nécessaire à l'homéostasie tissulaire. Ainsi, il a été démontré par plusieurs équipes la mise en place d'apoptose au sein des membranes fœtales à terme. Par exemple Runic *et al*. ont en effet révélé la présence de corps apoptotiques, de chromatine condensée autour du noyau cellulaire et l'expression d'un médiateur spécifique de cette mort cellulaire, le récepteur Fas (FS-7 associated surface antigen, CD95) (Runic *et al*, 1998) au sein de celles-ci. Par ailleurs, l'index apoptotique au sein du chorion a été décrit comme plus important à terme, soutenant ainsi l'hypothèse d'une augmentation de mort par apoptose au cours de la gestation. Mais surtout, il a été clairement prouvé que l'apoptose était accentuée au niveau de la zone de rupture. En effet, Reti *et al* ou encore Chai *et al* ont démontré la surexpression de marqueurs pro-apoptotiques (caspases 3 et 9, Fas, FasL, Bax, Smac) et la sous-expression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique, résultats soutenus par les travaux de El Khwad qui ont identifié une plus forte quantité des formes

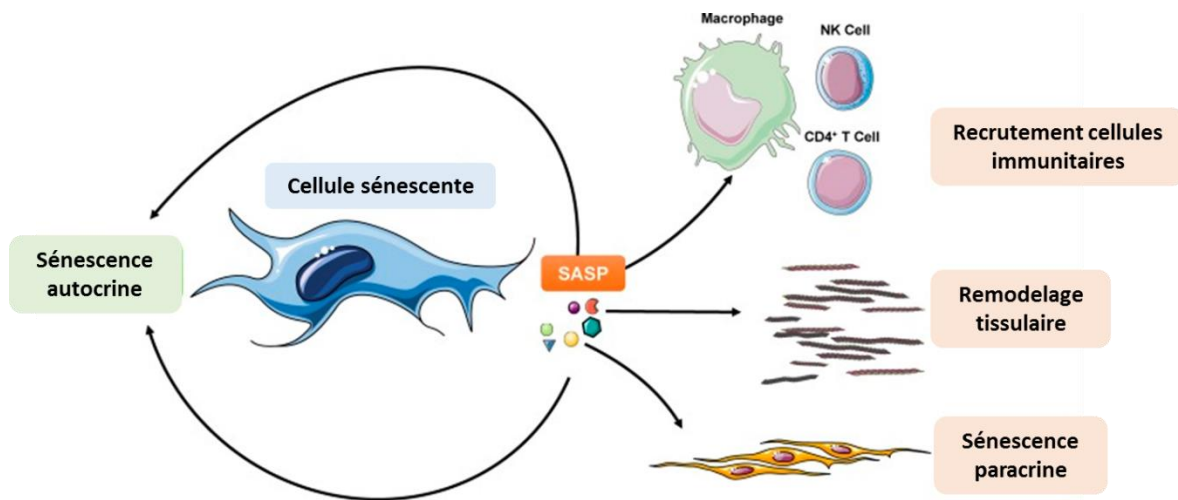


Figure 14 : Sénescence durant la grossesse

Lorsqu'une cellule acquiert un Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP), plusieurs conséquences surviennent. Ces molécules sécrétées induisent un recrutement de cellules immunitaires afin de procéder à la phagocytose des cellules sénescents. Elles permettent aussi un remodelage tissulaire de par la sécrétion de métalloprotéases ou de facteurs comme le VEGF qui stimule l'angiogenèse. Cette sénescence est renforcée de façon autocrine mais aussi paracrine par la sécrétion de TGF β (Adaptée de McHugh & Gil, 2018).

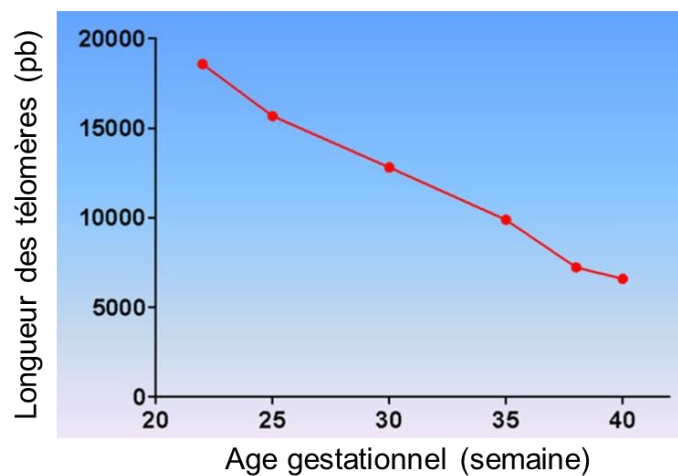


Figure 15 : Raccourcissement des télomères durant la grossesse

L'analyse des télomères des leucocytes fœtaux a révélé une diminution progressive de leur longueur au cours de la grossesse chez l'humain. Cette réduction est un indicateur de la sénescence prenant place dans les membranes fœtales (Menon *et al*, 2016b).

clivées de PARP-1 (ce clivage annihilant sa capacité à réparer l'ADN) au niveau de ZAM là encore (Chai *et al*, 2013; El Khwad *et al*, 2005; Reti *et al*, 2007). Appuyant encore le rôle primordial de l'apoptose dans la fragilisation de ZAM, l'équipe de Lappas a mis en évidence au sein de cette région, une plus forte expression des facteurs de transcription FoxO1 acétylé, FoxO3 et 4, facteurs impliqués dans le phénomène d'apoptose (Lappas *et al*, 2010, 2009; Kokkinos, 2009). Enfin, plusieurs travaux démontrent que les marqueurs de l'apoptose sont plus fortement exprimés à terme, et notamment après le travail, au sein de l'amnios et du chorion (Kumagai *et al*, 2001; Harirah *et al*, 2012).

L'ensemble de ces données confortent l'existence d'un programme de fragilisation des membranes initié avant la parturition, avec l'apoptose comme composante parmi d'autres.

d- Sénescence

Déjà évoquée au sujet du rôle de la décidue dans la parturition, la sénescence est également présente au sein des membranes fœtales. Des études ont effectivement démontré que le travail à terme est associé à une expression des marqueurs impliqués dans ce phénotype SASP, caractéristique de cette mort cellulaire. Ces molécules SASP permettent de recruter les cellules immunitaires qui phagocyteront les cellules sénescents. La sécrétion de métalloprotéases et de facteurs tels que le VEGF active quant à elle un remodelage tissulaire à travers la dégradation de la matrice extracellulaire et une angiogenèse accrue. Par ailleurs, un renforcement de la sénescence se fait de façon autocrine mais aussi paracrine par la sécrétion de TGF β (**Figure 14**) (McHugh & Gil, 2018a). Non seulement, la présence de β -galactosidase (enzyme spécifiquement activée en cas de sénescence) a été observée mais il a été démontré que la longueur des télomères des cellules des membranes diminue avec l'âge gestationnel, soulignant l'éphémérité programmée de cet organe (**Figure 15**) (Menon *et al*, 2012; Colatto *et al*, 2020). Parmi les facteurs impliqués dans la diminution des télomères, prend place le stress oxydant. Celui-ci en effet augmente dans la cavité intra-utérine au cours de la gestation, or les répétitions en guanine contenues en 3' des télomères sont particulièrement sensibles au stress oxydant, conduisant à des lésions ADN (Stewart *et al*, 2003). D'ailleurs, les télomères sont moins courts dans l'amnios que dans le chorion à terme, laissant entendre que le chorion aurait une durée de vie plus courte, en accord avec la chronologie de la rupture (Jones *et al*, 2017). Ainsi produits par les tissus environnants, une plus forte concentration de marqueurs de la sénescence (cytokines et chimiokines pro-inflammatoires) a été mesurée dans le LA prélevé après travail, comparé à avant travail

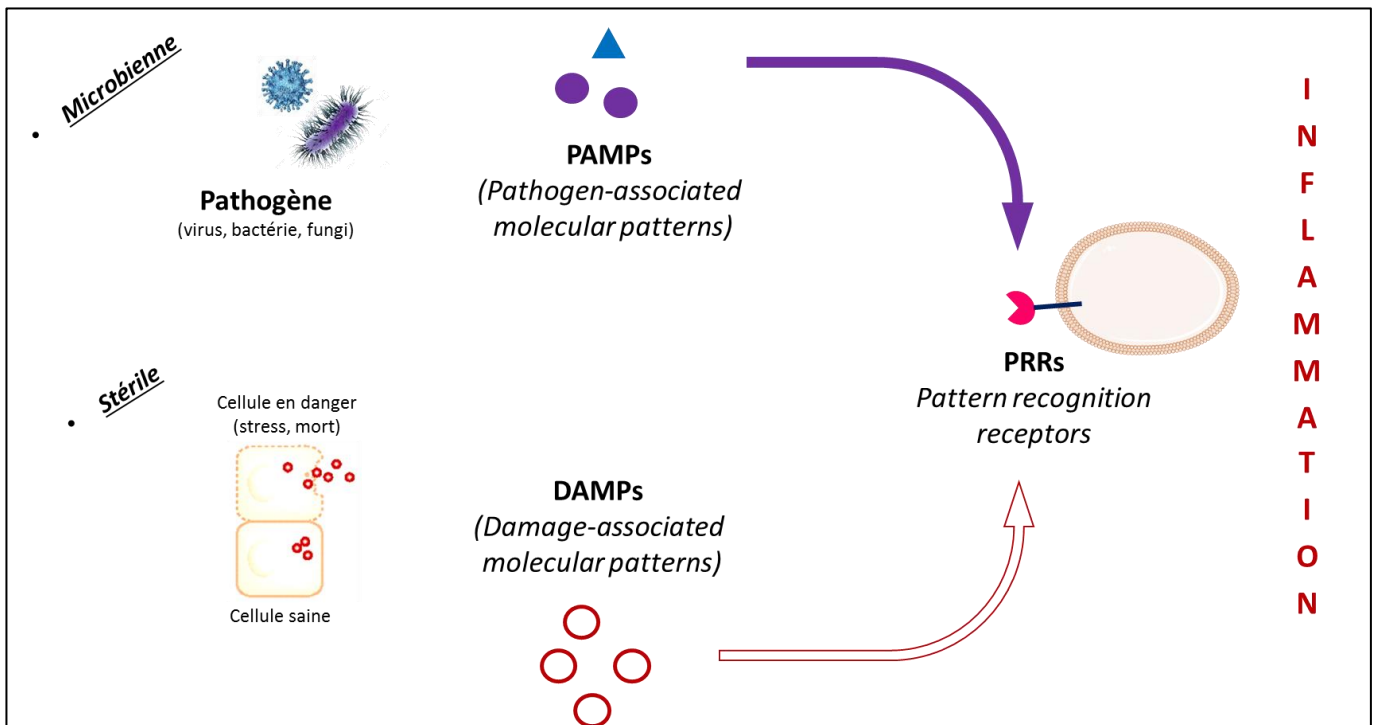


Figure 16 : Réponses inflammatoires microbienne versus stérile

Il existe deux grands types d'inflammation. Tout d'abord, une inflammation peut être qualifiée de microbienne (ou septique) lorsqu'il y a une infection par un pathogène. Dans ce cas, des molécules dérivées du pathogène, nommées PAMPs, sont reconnues par plusieurs cellules à l'aide d'une famille de récepteurs, les PRR. Cette reconnaissance induit une réponse inflammatoire (recrutement des cellules immunitaires, sécrétion de molécules pro-inflammatoires, ...). Cependant, cette réponse peut également avoir lieu en l'absence de pathogène, elle est dite stérile. En effet, lorsque des cellules sont en danger (stress, mort), elles relarguent des DAMPs, aussi nommés alarmines, puisqu'elles activent également les PRR, et provoquent en aval une réponse inflammatoire.

(Behnia *et al*, 2015; Menon *et al*, 2016a). Enfin, il a été observé davantage de facteurs associés à la sénescence (β -galactosidase) après travail à terme dans la zone supra-cervicale des membranes fœtales comparé au reste des membranes fœtales, évoquant la encore une sénescence accrue au niveau de la ZAM comparativement à la ZIM (Menon *et al*, 2016b).

e- Inflammation

Nous l'avons vu, l'inflammation présente un rôle central dans la préparation de la parturition. Son amplification au sein des membranes fœtales avec le travail à terme ouvre la voie à l'étude de son implication dans la rupture des membranes fœtales. Le processus d'inflammation représente une réaction de défense de l'organisme qui fait suite à la reconnaissance d'un signal de danger. Si l'origine de ce signal est pathogénique (PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern), l'inflammation est dite septique, à l'inverse si la molécule est endogène (DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern), l'inflammation est qualifiée de stérile. Quel que soit le signal reconnu, la réaction inflammatoire sera similaire comprenant le recrutement de cellules immunitaires afin d'éliminer la source de l'inflammation (**Figure 16**). Les membranes fœtales sénescents libèrent des signaux inflammatoires endogènes originellement intracellulaires, les DAMPs, également nommés alarmines, qui seront décrites plus précisément par la suite. Pour l'instant, il faut savoir que la présence de plusieurs types de DAMPs (HMGB1, HSP70...) a été reportée au sein des tissus gestationnels durant le travail, responsable de l'activation de diverses voies pro-inflammatoires comme par exemple la voie p38 MAPK (Bredeson *et al*, 2014).

Plusieurs études ont pu mettre en évidence des phénomènes inflammatoires plus importants au niveau de la zone ZAM. Ainsi, il a été découvert qu'à terme, les trophoblastes chorioniques changeaient de phénotype, provoquant une activation des cellules NK maternelles et un déclin de l'immuno-tolérance des macrophages installée au cours de la grossesse (Marcellin *et al*, 2017). Par ailleurs, le transcriptome réalisé par le groupe de Nhan-Chang a révélé une expression différentielle de plusieurs gènes entre la ZAM et la ZIM chorionique dont des gènes impliqués dans l'inflammation (Nhan-Chang *et al*, 2010).

Plus globalement, la littérature relate que les concentrations de plusieurs cytokines (IL1 β , IL6, TNF α) augmentent au sein du LA à l'approche du travail à terme (Cox *et al*, 1997; Maymon *et al*, 1999). Ces cytokines pro-inflammatoires provoquent en aval une baisse de l'expression

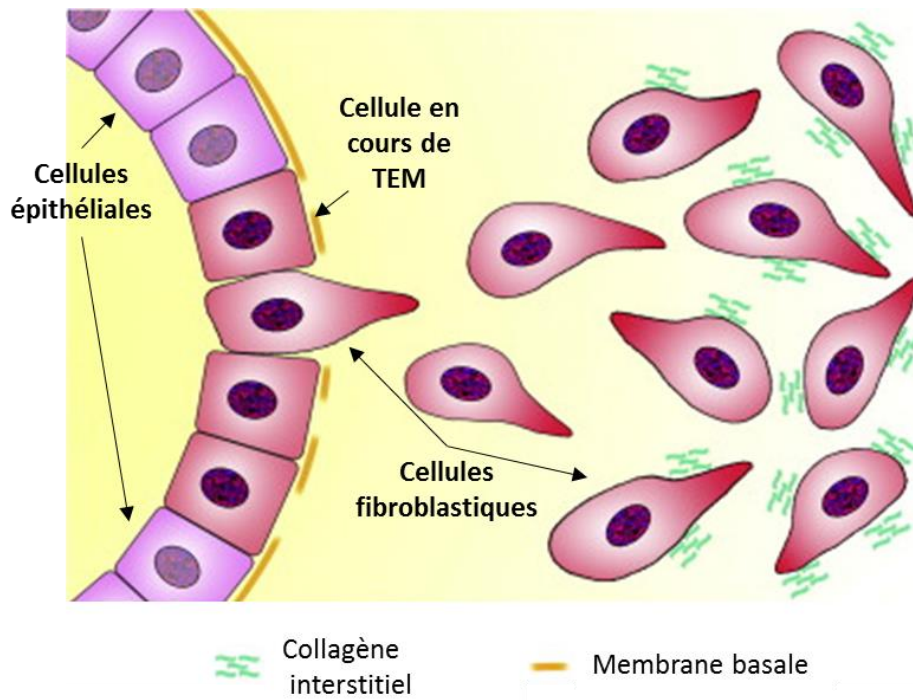


Figure 17 : Transition épithélio-mésenchymateuse

Ce schéma illustre les changements cellulaires ayant lieu lors de la TEM. Sur la gauche, des cellules épithéliales sont quiescentes, elles sont cohésives et accolées à une membrane basale intègre. Suite à des stimuli nocifs, certaines cellules épithéliales peuvent activer des voies moléculaires les engageant vers une TEM, conduisant à dégradation de la membrane basale, à une perte de cohésion, à un changement de forme cellulaire pour enfin aboutir à un détachement de la cellule de l'épithélium, qui devient alors fibroblastique. (Adapté de (Guarino *et al*, 2009))

protéique de TIMP-3 mais une hausse des gélatinases MMP-2 et 9 dans les cellules de l'amnios, participant ainsi à la dégradation de la MEC et donc à la fragilisation des MF. Par ailleurs, cette boucle d'inflammation est maintenue et amplifiée de par un rétrocontrôle positif des cytokines sur la production d'autres cytokines. En effet, IL1 β et TNF α stimulent la production de plusieurs chimiokines (IL8, CXCL1, CCL2) recrutant des leucocytes au sein de l'amnios et du chorion (Ito *et al*, 1994; Trautman *et al*, 1992; Lim *et al*, 2017).

En plus de s'amplifier elle-même et d'induire la dégradation de la MEC, l'inflammation est également étroitement liée aux phénomènes d'apoptose et de sénescence. Ainsi tandis que la sécrétion de TNF α induit de l'apoptose au sein des MF (Menon *et al*, 2002), les DAMPs entretiennent à la fois l'inflammation et la sénescence. Ils se propagent dans l'ensemble des tissus adjacents encapsulés dans de petites vésicules extracellulaires, nommées les exosomes. Il a d'ailleurs été démontré qu'une augmentation progressive du nombre d'exosomes contenant des acteurs pro-inflammatoires avait lieu au cours de la gestation murine (Sheller-Miller *et al*, 2019).

L'inflammation constitue donc une composante importante du processus de fragilisation des membranes fœtales ce qui a conduit à l'étude de l'utilisation de nombreuses interleukines comme potentiels biomarqueurs de la rupture prématurée des membranes (Raba *et al*, 2021; Seliger *et al*, 2021; Li *et al*, 2020).

f- Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Des travaux récents ont étudié l'implication de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la fragilisation des membranes fœtales. Ce mécanisme, notamment retrouvé dans le phénomène de métastase, est caractérisé par la perte des marques épithéliales (E-cadhérine, cytokératine) au profit de marqueurs mésenchymateux (fibronectine, vimentine, N-cadhérine), conduisant à un détachement des cellules (**Figure 17**). La TEM est également associée à une désorganisation du cytosquelette, une perturbation des jonctions intercellulaires, et une dégradation de la matrice extracellulaire constituant *in fine* des modifications cellulaires qui pourraient participer à la fragilisation des membranes fœtales (Guarino *et al*, 2009; Janzen *et al*, 2017). En effet, Janzen *et al*. ont mis en évidence un lien entre le travail et la TEM amniotique : le ratio des cellules mésenchymateuses sur les cellules épithéliales est multiplié par six dans des échantillons prélevés après travail. Parallèlement,

cette étude récente a démontré *in vitro* qu'une induction de la TEM provoquait une plus faible résistance de l'amnios aux forces de pression. Enfin, plusieurs articles ont généralement fait état d'une association positive entre taux de métalloprotéases et TEM dans différents tissus (Zhang *et al*, 2018; Duong & Erickson, 2004; Radisky & Radisky, 2010), or, nous l'avons vu précédemment, la production de certaines MMPs augmente à terme au sein des membranes fœtales. Ainsi, l'ensemble de ces données semble offrir une place de choix à la TEM sur le vaste tableau des mécanismes moléculaires à l'origine de l'affaiblissement de l'amnios et du chorion à terme.

g- Étirement

Pour terminer, l'étirement progressif des membranes fœtales dû à la croissance de l'enfant constitue également un facteur (logique) de l'amincissement de ces tissus. Moléculairement, il a été démontré que l'étirement physique d'explants de membranes provoquait non seulement une induction de l'expression des MMPs 1 et 9 et de l'interleukine 8 mais aussi une hausse de l'activité collagénase (Maradny *et al*, 1996; Maehara *et al*, 1996; Uchide *et al*, 2000). Par ailleurs, l'étirement des membranes amniotiques a aussi été démontré comme inducteur de l'expression de COX-2 et de la sécrétion de prostaglandine PGE2, deux acteurs connus du travail et décrit précédemment (Chowdhury *et al*, 2014). Ainsi, l'étirement stimule des changements biochimiques au sein des membranes fœtales contribuant à leur fragilisation.

Car « Tout est poison, rien n'est poison. La dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison » (Paracelse), ces mécanismes biochimiques, cellulaires et physiques coordonnés et impliqués dans la rupture physiologique des membranes ne doivent pas s'emballer au risque de fragiliser précocement les membranes qui ne pourront tenir jusqu'au terme.

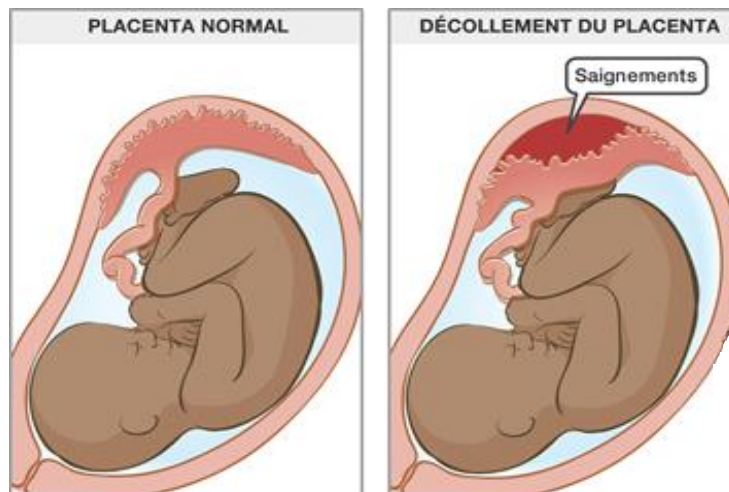


Figure 18 : Décollement du placenta, une complication possible suite à une RPM

En temps normal, le placenta est accolé à la paroi utérine, cependant en cas de RPM, le volume utérin diminue rapidement et peut provoquer un décollement placentaire, associé à des saignements.

(<https://www.aboutkidshealth.ca/fr/article?contentid=354&language=french>)

II. Quand être en avance est délétère : la rupture prématurée des membranes fœtales

1) La rupture prématurée, pathologie des membranes fœtales : quels impacts ?

a- Définition

En obstétrique, la rupture prématurée des membranes fœtales (RPM) est définie comme étant une rupture des membranes avant le début du travail. Elle peut avoir lieu à tout âge gestationnel. On parle, dans la littérature, soit de « Rupture des Membranes fœtales Avant travail» (PROM : Prelabor Rupture Of Membranes), soit de « Rupture des Membranes fœtales Avant travail et avant terme» (pPROM : preterm Prelabor Rupture Of Membranes).

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 débute 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. Les pPROM concernent, quant à elles, 2 à 4% des grossesses singletons et 7 à 20% des grossesses gémellaires. Par exemple, en France, elle touche près de 25 000 à 30 000 patientes par an (Blanchon *et al*, 2013). Après cette RPM avant terme (soit avant 37SA), la durée de latence avant les naissances varie, 57% des mères accouchant dans la semaine alors que 22% peuvent accoucher dans le mois. Ces dernières sont responsables d'environ un tiers des naissances prématurées et de 20% de la mortalité périnatale, associées à des taux élevés de mortalité et morbidité maternelles, en faisant dès lors un problème majeur de santé publique (Caughey *et al*, 2008; Mercer, 2003; Moutquin, 2003; Menon & Richardson, 2017b).

b- Impacts sur la mère

Du côté maternel, la rupture prématurée des membranes fœtales est associée à un risque de décollement placentaire (hématome rétroplacentaire) c'est-à-dire un détachement du placenta de l'utérus avant la naissance du bébé, ceci pouvant entraîner une hémorragie extériorisée ou parfois non-extériorisée (**Figure 18**) (Holmgren & Olofsson, 1997; Ananth *et al*, 2004).

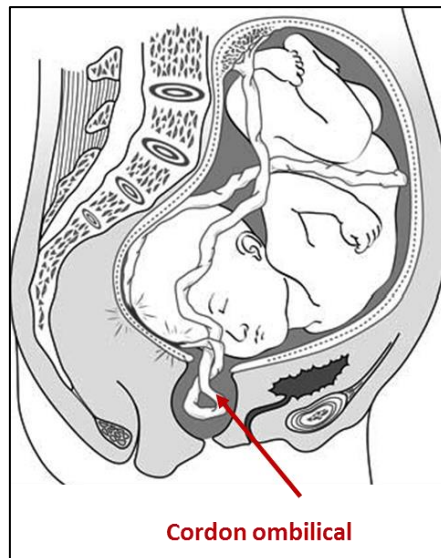


Figure 19 : Prolapsus du cordon ombilical

L'oligohydramnios provoqué par la RPM peut engendrer un prolapsus du cordon ombilical, c'est-à-dire une descente de celui-ci avant le fœtus, dont le poids va exercer une compression sur le cordon et bloquer les apports de sang.

(<https://medicalguidelines.msf.org/viewport/ONC/latest/5-4-procidence-du-cordon-51416995.html>)

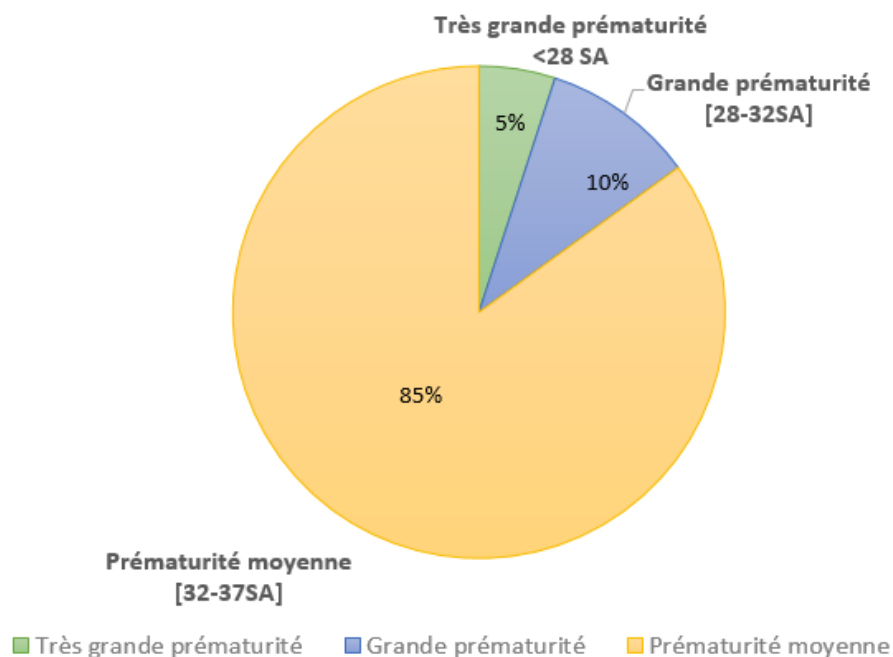


Figure 20 : Naissance prématurée, trois niveaux de prématurité

Un enfant est considéré prématuré s'il naît avant 37 SA, soit 8 mois et demi de grossesse. Il faut distinguer trois niveaux de prématurité qui feront que les conséquences pour le fœtus seront plus ou moins considérables : très grande, grande et moyenne prématurité.

De plus, chez les femmes ayant subi une pPROM, une inflammation de l'endomètre peut avoir lieu après la naissance de l'enfant, cette complication fréquente correspond à l'endométrite post-partum (Furman et al, 2000).

Mais le risque majoritaire de la RPM pour la mère est la chorioamniotite correspondant en une inflammation du placenta et des membranes fœtales. Cette pathologie peut être causée par l'ascension de germes génitaux ou par contamination suite à des actes médicaux invasifs (toucher vaginal, monitoring interne de la fréquence cardiaque du fœtus...) (Newton et al, 1989; Seo et al, 1992; Newton, 2005). 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. Plus la période de latence est longue, plus le risque de développer une chorioamniotite est élevé. En effet, il a été démontré que le risque d'infection maternelle (endométrite et/ou chorioamniotite), faisant suite à une RPM, diminue si la période de latence est réduite par l'induction du travail (Middleton et al, 2017). Cependant, la période de latence est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel auquel la RPM a eu lieu (Dale et al, 1989). Le but est de retarder au maximum la naissance en cas de rupture avant terme, mais en surveillant que le risque infectieux ne devienne pas trop important. Il faut noter que la chorioamniotite peut aussi être la cause de RPM dont l'explication sera détaillée dans la suite du manuscrit.

c- Impacts sur le nouveau-né

La rupture prématurée des membranes entraîne une diminution du volume de LA (oligohydramnios) qui risque de provoquer le prolapsus du cordon ombilical (**Figure 19**) (Usta et al, 1999). Or si celui-ci est comprimé, il ne peut plus assurer l'irrigation du fœtus en oxygène notamment, déclenchant ainsi des souffrances fœtales aux graves conséquences, allant des troubles neurologiques au décès par asphyxie (Murphy & MacKenzie, 1995; Sayed Ahmed & Hamdy, 2018).

Par ailleurs, la RPM est associée à un risque d'infection néonatale et comme pour la mère, ce risque est plus important si la période de latence est longue (Ocviyanti & Wahono, 2018; Middleton et al, 2017).

Mais surtout, la naissance prématurée demeure la complication majeure de la pPROM. Il faut distinguer trois niveaux de prématurité : la prématurité moyenne (naissance entre la 32^{ème} et 37^{ème} SA), la grande prématurité (naissance entre la 28^{ème} et 32^{ème} SA) et la très grande prématurité (naissance avant 28 SA) (**Figure 20**) (Torchin & Ancel, 2016). Ainsi, les conséquences sur le nouveau-né et le futur enfant varient 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 (entérocolite nécrosante), mais également les organes sensoriels (rétinopathie du prématuré, myopie, hypermétropie, surdité), et le système nerveux-moteur (paralysie cérébrale, épilepsie, troubles cognitifs, dyspraxie, déficit de l'attention) (Platt, 2014).

2) *Prise en charge clinique de la rupture prématurée des membranes*

Tout d'abord, le diagnostic est évident dans 80% des cas par l'observation d'un écoulement continu, liquide, clair et abondant survenant de manière soudaine en dehors du travail. Cependant, des tests complémentaires permettent de confirmer l'origine de cet écoulement au sein du cul de sac vaginal : alcalinisation du pH du à la présence de LA (Amnicator[®]) ou recherche du facteur de croissance de l'insuline IGFBP1 (Actim[®] PROM) ou de la protéine PAMG-1 (AmniSure[®]), composés fortement présents dans le LA.

Une fois confirmée, la prise en charge de la rupture prématurée des membranes dépend notamment de l'âge gestationnel auquel elle survient. Ainsi en cas de rupture précoce (avant 24 SA), l'objectif majeur est de lutter contre la prématurité en cherchant à différer la naissance si les bien-être maternel et fœtal le permettent. En absence de travail, le traitement initial comportera une hospitalisation avec mise au repos, accompagnée d'une antibiothérapie de courte durée et d'une corticothérapie (permettant notamment de diminuer le risque de détresse respiratoire et décès néonatal).

A l'inverse, si la RPM a lieu au-delà de 37 SA, il n'est pas nécessaire d'adopter cette intention d'expectative. Après 34 SA, le risque infectieux est supérieur au risque de morbidité liée à la prématurité. En général, 80-90% des mères entrent en travail dans les 24h, et en l'absence de travail spontané, la préférence se fera envers un déclenchement sans délai en raison d'une réduction du risque de chorioamniotite (Naef *et al*, 1998; Blanchon *et al*, 2013).

3) Facteurs de risque

a- Facteurs maternels

Tout d'abord, l'histoire obstétricale de la mère peut être associée aux risques de RPM. En effet, des antécédents de rupture ou d'accouchement prématurés sont souvent à l'origine d'un risque accru de survenue d'une RPM (Getahun *et al*, 2010; Torchin & Ancel, 2016). Par ailleurs, aucun lien significatif n'a été démontré avec un historique d'avortements spontanés, en revanche, des études ont rapporté une augmentation des RPM chez les femmes ayant eu plusieurs avortements induits (Linn *et al*, 1983; Guinn *et al*, 1995). Par ailleurs, il a été établi récemment que les grossesses chez les adolescentes (13-19 ans) présentaient plus de risque de RPM (Marković *et al*, 2020).

D'autre part, des facteurs comportementaux tels que le tabagisme ou l'usage de drogues durant la grossesse apparaissent être en lien avec le risque de RPM (England *et al*, 2013; Myles *et al*, 1998; Nabet *et al*, 2007; Neerhof *et al*, 1989). La consommation de tabac représente un risque majeur, en effet environ 15-20% des femmes sont fumeuses durant leur grossesse, ce qui serait responsable de 15% des RPM globales, sans parler d'une augmentation de 150% des risques de mortalité périnatale (Andres & Day, 2000).

Des équipes ont également étudié l'impact de l'aspect nutritionnel maternel sur l'étiologie de la RPM. Ainsi, un indice de masse corporelle (IMC : poids/taille²) trop faible ou trop important, des carences en vitamine C, zinc ou cuivre joueraient un rôle dans la survenue de la RPM (Santos *et al*, 2019; Parry & Strauss, 1998; Scholl *et al*, 1993). En effet, des concentrations plasmatiques et amniotiques réduites en vitamine C ont été observées chez les femmes ayant eu une RPM (Hadley *et al*, 1990). De plus, il a été démontré que le fait de supplémenter la femme enceinte en cette vitamine réduisait l'incidence de cette pathologie (Casanueva *et al*, 2005). Mais même si la vitamine C est connue pour sa participation au maintien du collagène (Moore, 2013; Levine & Violet, 2017; Vadillo Ortega *et al*, 1995), ou le zinc et le cuivre pour leur action bactériostatique (Vargas-Reus *et al*, 2012; Cheknev *et al*, 2015), il n'est pas encore clairement établi que ces déficits sont en lien direct avec la fragilisation précoce des membranes ou qu'ils soient des marqueurs d'autres anomalies, elles, à l'origine de la RPM. Enfin, l'ethnicité a été reportée également comme jouant sur le risque de développer une RPM. Il a ainsi été démontré que la population afro-américaine présente un taux de RPM plus élevé que les mères caucasiennes (Shen *et al*, 2008). Cette observation s'explique par

l'existence de polymorphismes au sein de gènes impliqués dans l'immunité innée et la défense anti-microbienne (Modi *et al*, 2018, 2017) ou encore la synthèse de collagène (MMP 1-8-9, SERPINH1) (Wang *et al*, 2006; Ferrand *et al*, 2002; Wang *et al*, 2004; Fujimoto *et al*, 2002).

b- Facteurs fœto-utéro-placentaires

Pour commencer, des études ont permis de mettre en évidence l'impact d'une grossesse multiple sur le sort des membranes fœtales de par i) la sur-distension utérine et ii) la quantité multiple d'ADN libre au sein du LA engendrant une plus forte inflammation intra-amniotique, portant le risque à environ 7,4% contre 3,7 % en grossesse simple (Kibel *et al*, 2017; Mercer *et al*, 1993).

De façon non exhaustive, il est ensuite bien connu qu'une entrée en travail prématurée (par les contractions), un polyhydramnios (par la distension excessive) peuvent fragiliser les membranes et donc augmenter le risque de RPM (Silverman & Wojtowycz, 1998; Lallar *et al*, 2015).

En outre, il est surtout nécessaire de noter la chorioamniotite comme une cause majeure de RPM (Naeye & Peters, 1980). Cette inflammation du placenta et des membranes est le plus fréquemment due à l'ascension de pathogènes vaginaux tels que les mycoplasmes, (chorioamniotite infectieuse) bien qu'elle puisse aussi être diagnostiquée en absence d'agents microbiens (chorioamniotite non infectieuse) (Romero *et al*, 2014a).

c- Facteurs médicaux

La rupture prématurée iatrogène est une complication majeure des procédures chirurgicales invasives. Ainsi, l'amniocentèse ou la fœtoscopie, qui consistent en l'insertion d'un instrument chirurgical durant la grossesse à travers la poche des eaux, créent une brèche et entraînent un risque plus ou moins élevé en fonction du diamètre de l'instrument utilisé et le nombre de sites d'insertion (Beck *et al*, 2012; Chang *et al*, 2006; Borgida *et al*, 2000).

D'autre part, le cerclage cervical est lui aussi rapporté comme facteur de risque de pPROM (Chen *et al*, 2019). Cette technique, visant à fermer le col utérin en cas d'incompétence cervicale, peut faciliter l'apparition d'une infection (Charles & Edwards, 1981).

d- Facteurs environnementaux

Afin d'achever ce catalogue de ces nombreuses causes de la RPM, nous allons discuter de facteurs environnementaux puisqu'ils sont dans « l'air » du temps.

De plus en plus d'études démontrent que l'exposition à des métaux lourds (plomb, vanadium, chrome) ou encore à des gaz (oxyde d'azote, monoxyde de carbone, oxyde de soufre) ou même aux particules fines peut être à l'origine de désastreuses conséquences sur la grossesse, y compris la rupture prématurée des membranes. Cette exposition conduit généralement à des taux plus élevés de ces métabolites au sein du plasma, urines ou même tissus placentaires qui pourraient agir négativement (par imprégnation placentaire ou des membranes fœtales) sur le maintien d'une grossesse harmonieuse. (Vigeh *et al*, 2010; Baghurst *et al*, 1991; Wallace *et al*, 2016; Sorkun *et al*, 2007; Jin *et al*, 2018b; Huang *et al*, 2017; Pereira *et al*, 2014).

Globalement, nous avons pu relever la diversité et la profusion des facteurs impliqués dans la pathogénèse de la rupture prématurée des membranes fœtales. Toutefois, il est essentiel de prendre en compte que la majorité de ces études épidémiologiques sont souvent réalisées au sein d'une cohorte localisée dans une ville ou un pays sur des périodes variables. Maintenant que les causes de cette pathologie des membranes ont été décrites, cela n'explique pas comment ces facteurs agissent sur les mécanismes moléculaires et cellulaires pouvant engendrer une fragilisation précoce de nos chers tissus éphémères.

4) Physiopathologie de la RPM

La rupture des membranes est le résultat d'une chaîne complexe et multifactorielle conduisant à une fragilisation progressive de ces tissus. La rupture prématurée résulte de cette même chaîne mais de façon exacerbée et/ou accélérée. Les membranes fœtales vont suivre la même route sinueuse dans tous les cas, passant par les étapes « Inflammation », « Stress oxydant » et « Sénescence », mais tandis que celles des mères chanceuses prennent le temps de vivre sur la voie des véhicules lents, celles des mères subissant une RPM brûlent les limitations de vitesse arrivant beaucoup trop en avance à la destination finale : leur dépérissement.

Pour commencer, le stress oxydant est une cause de RPM. Une grossesse sans complication est caractérisée par une balance équilibrée entre antioxydants et espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO proviennent de deux sources majeures : i) la chaîne respiratoire mitochondriale et ii) le relargage des cellules immunitaires lors de la phagocytose. Or lorsque les demandes énergétiques de l'unité fœto-placentaire sont hautes, de par des déficiences nutritionnelles, des problèmes micro-vasculaires, une adaptation fonctionnelle du placenta a lieu conduisant à une augmentation de son activité mitochondriale et *in fine* du stress oxydatif (Myatt, 2010). De plus, certains facteurs de risques comportementaux associés à la RPM tels que le tabagisme, l'usage de drogues ou des carences alimentaires génèrent des ERO (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, ...) (Dietrich et al, 2003; Menon et al, 2011). Ainsi, le stress oxydant mis en place physiologiquement est retrouvé augmenté en cas de RPM (Menon et al, 2014; Dutta et al, 2016). Des études ont souligné une élévation de la concentration d'un marqueur de peroxydation des lipides, le F2-isoprostane, au sein du LA en cas de RPM, ceci corroboré par d'autres travaux qui ont identifié une capacité anti-oxydante diminuée dans le sang du cordon ombilical en cas de RPM (Longini et al, 2007; Musilova et al, 2016). Autre exemple, la 3-nitrotyrosine, marqueur d'oxydation des protéines, est également davantage produite dans les membranes fœtales en cas de pPROM (Dutta et al, 2016; Menon & Richardson, 2017b). Toutefois, il n'a pas été démontré, jusqu'alors, de corrélation entre stress oxydant et invasion microbienne intra-amniotique ou chorioamniotite histologique (Kacerovsky et al, 2015b; Martin et al, 2017).

Il est intéressant de noter qu'une des premières cibles des ERO est le collagène, ce composant si essentiel à la résistance des tissus. En effet le superoxyde, une ERO majeure, induit *in vitro* le clivage des fibres de collagène en 4-hydroxyproline (Monboisse et al, 1983). A l'inverse, toujours *in vitro*, des composés anti-oxydants comme la N-acetyl-cystéine inhibent l'activité d'enzymes collagénolytiques (MMP9) au sein des membranes fœtales (Lappas et al, 2003). Or nous savons désormais que la dégradation de la matrice extracellulaire est un élément clé de la fragilisation des membranes fœtales conduisant à leur rupture, normalement à terme. Ce processus est notamment modulé par le ratio des MMPs/TIMPs, et effectivement plusieurs travaux se sont penchés sur leur rôle dans la physiopathologie de la RPM. Il a ainsi été révélé, au sein du LA, des taux d'activation plus forts des MMPs 2 et 9 chez les femmes ayant subi une RPM (Fortunato et al, 1999) tandis que MMP3 est augmentée en

cas d'infection intra-amniotique (Park et al, 2003). Notons que la sécrétion de MMP9 est également induite dans des trophoblastes chorioniques par du LPS (Li et al, 2007). Cette dégradation de la MEC est d'autant plus prononcée chez les individus exprimant des polymorphismes des MMPs, facteur de risque associé à la RPM (Wang et al, 2004, 2008). Même observation en cas d'infection microbienne, de plus forts taux de métalloprotéases sont retrouvés au sein du LA (Maymon et al, 2000b, 2000a, 2001).

Autre conséquence du stress oxydant : la sénescence. Les dommages oxydatifs sont très vastes, touchant les protéines, les lipides, les acides nucléiques et donc ayant des conséquences considérables. Le stress oxydant provoque l'activation de voies de signalisation comme la voie p38 MAPK, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et donc à de la sénescence. Une augmentation des marqueurs (perte de lamine B1, présence de SA- β -galactosidase, phosphorylation p38 MAPK) de cette mort cellulaire a été rapportée dans les membranes fœtales en cas de pPROM (Dutta et al, 2016; Behnia et al, 2015). Les travaux de Menon ont d'ailleurs établi *in vitro* que l'exposition à un extrait de fumée de cigarette induisait en aval du stress oxydant la sénescence des cellules amniotiques (Menon et al, 2013). Dans cette même optique, des études se sont demandées si la taille des télomères des tissus gestationnels pouvait être un signe de sénescence prématurée (Ferrari et al, 2016; Polettini et al, 2015; Marrs et al, 2018). Néanmoins, même si la taille des télomères des leucocytes fœtaux (sang du cordon ombilical) et du placenta est réduite en cas de pPROM comparé à des membranes fœtales issues de naissances prématurées avec membranes intactes, les données actuelles n'ont pas démontré de différence significative entre pPROM et naissance à terme (Menon et al, 2012). A ce jour, le lien entre réduction des télomères, suggérant un vieillissement intrinsèque précoce, avec la pPROM reste à éclaircir.

Autre mort cellulaire impliquée dans la pathogénèse de la RPM : l'apoptose. Il a été démontré l'induction des gènes pro-apoptotiques p53 et bax et la sous-expression de leur rival anti-apoptotique bcl-2 au sein de l'amnios et du chorion (cellules amniotiques épithéliales, chorioniques, fibroblastes) en cas de pPROM (Sağol et al, 2002; Fortunato et al, 2000). Des événements de fragmentation d'ADN plus importants ont été également décelés dans les membranes fœtales provenant de pPROM, ce qui pourrait d'ailleurs être causé par du stress oxydant (Behnia et al, 2016; Vadillo Ortega et al, 1998; Canzoneri et al, 2013). D'autre part,

les patientes ayant une chorioamniotite, facteur fréquemment associé à la RPM, montrent une plus forte prévalence de l'apoptose au niveau du chorion (Murtha et al, 2002; George et al, 2008). Récemment, Richardson *et al.* ont découvert la présence de micro-fractures dans les membranes fœtales, c'est-à-dire des altérations structurales, héritage d'un remodelage tissulaire durant la grossesse. Ainsi, en cas de pPROM, le nombre de ces micro-fractures se trouve augmenté et l'exposition des tissus *in vitro* à du stress oxydatif (fumée de cigarette) conduit à une hausse de leur nombre (Richardson et al, 2017). Cette étude suggère que ces régions sont associées à la dégradation du collagène, et que persistantes, elles pourraient servir de canaux pour le LA ou une infiltration de cellules inflammatoires, qui résulterait en une perméabilité diminuée et des tissus fragilisés.

Enfin, des phénomènes d'inflammation peuvent être impliqués dans la fragilisation précoce des membranes fœtales. Stérile ou microbienne, l'inflammation des membranes fœtales, la chorioamniotite, est souvent suggérée comme présente lors de la pathogénèse de la pPROM, notamment quand elle survient tôt dans la grossesse. De nombreux marqueurs de l'inflammation (interleukines 1 β , 6, 8, 12, 16, 18, TNF α ...) ont été retrouvés augmentés en cas de pPROM autant dans le placenta, que dans le sérum maternel, le LA, les sécrétions vaginales ou dans les membranes fœtales en fonction des études (Weiyuan & Li, 1998; El-Shazly et al, 2004; Dorfeuille et al, 2016; Menon et al, 2001; Shobokshi & Shaarawy, 2002; Zhang et al, 2000; Athayde et al, 2000). Ainsi, il a été établi qu'en dessous de 2,6 ng/ml de IL6 dans le LA, il y avait absence d'inflammation intra-amniotique (Romero et al, 2015; Galaz et al, 2020). Ces taux plus importants de cytokines pro-inflammatoires ont été corrélés à un recrutement plus important de leucocytes (neutrophiles, monocytes, macrophages) et de lymphocytes T au sein du LA en cas de pPROM mise en parallèle avec culture bactérienne positive (Galaz et al, 2020; Gomez-Lopez et al, 2019). A l'inverse, des taux plus élevés de cytokines anti-inflammatoires (IL1RA) sont associés à une latence plus longue (>7 jours) avant l'accouchement chez les femmes avec pPROM (Ronconi et al, 2019). S'il est bien connu qu'une stimulation infectieuse provoque une réponse inflammatoire, notamment au niveau du chorion, cible première des pathogènes vaginaux, d'autres équipes ont commencé à étudier l'inflammation stérile dans le cadre de la pPROM (Zaga et al, 2004; Zaga-Clavellina et al, 2007). En effet, son rôle n'est pas négligeable puisqu'une étude a démontré que 58% des patientes ayant une inflammation intra-amniotique stérile sont atteintes de chorioamniotite histologique (infiltration de

polynucléaires au niveau des membranes fœtales) (Romero et al, 2014b). Il a été retrouvé des concentrations plus élevées d'alarmines telle que HMGB1, S100 β , HSP70 au sein du LA, du sang maternel ou même encore dans les tissus gestationnels (placenta, membranes fœtales) en cas de pPROM (Baumbusch et al, 2016, 1; Yan et al, 2018, 1; Chaiworapongsa et al, 2008; Friel et al, 2007). Ces quantités augmentées de DAMPs, menant à une stimulation inflammatoire stérile, pourraient être la conséquence de stress oxydatif ou de sénescence (Menon et al, 2016a).

Pour conclure, ce chapitre permet de comprendre la complexité du phénomène de rupture des membranes, qu'elle ait lieu à terme ou non. Cette composante multi-factorielle implique l'existence de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Même si certaines des voies de signalisation cellulaires impliquées ont déjà été décrites et étudiées, le tableau reste lacunaire et ouvre donc la voie à de nombreuses études complémentaires. Dans le cadre de ce domaine d'étude, mon travail de thèse s'est basé sur la volonté d'éclaircir un des mécanismes pouvant participer à la fragilisation physiologique et pathologique des membranes fœtales : l'inflammation stérile. Avant d'attaquer sur la voie de signalisation précise étudiée durant ces trois années, une description plus précise de l'inflammation stérile est nécessaire.

CHAPITRE III : INFLAMMATION STERILE ET ALARMINES

I. Mais qui sont ces lanceurs d'alerte au sein de notre organisme ?

1) Notion de danger : historique

Durant des décennies, les immunologistes ont basé leurs théories et leurs travaux sur la croyance fondamentale que le système immunitaire distinguait le soi et le non-soi et que si ce système était parfait, tout non-soi était reconnu comme une menace et attaqué alors que le soi de chacun était laissé « en paix ». Des avancées ont permis de dessiner en 1994 un autre modèle que ce soi *versus* non-soi : le modèle du danger, développé par Polly Matzinger, chercheuse iconique au parcours riche en rebondissements (Matzinger, 1994). Assistée de sa fidèle chienne lévrier afghan, elle définit la notion révolutionnaire de « danger », reposant sur l'idée que la force du système immunitaire n'est pas le besoin de reconnaître le non-soi mais de reconnaître le danger qui peut conduire à un stress ou à une destruction potentielle. L'activation des cellules dendritiques, étape en amont de l'initiation de la réponse immunitaire, peut ainsi être induite par des signaux endogènes de danger, relargués en cas de stress et dommages cellulaires ou de mort cellulaire anormale, comme elle peut l'être par des signaux exogènes provenant de pathogènes. Il est alors essentiel suite à cette description de distinguer ici les DAMPs, provenant des dommages cellulaires, des PAMPs présents sur les organismes pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS) et peptidoglycanes bactériens, mannanes fongiques ou acides nucléiques viraux.

Les DAMPs présentent plusieurs caractéristiques : i) ils sont rapidement libérés suite à une mort cellulaire non programmée mais pas en cas d'apoptose par exemple, et ce par le réticulum endoplasmique ; ii) les cellules immunitaires peuvent aussi en produire sans pour autant subir une mort cellulaire ; iii) ils promeuvent une réponse immunitaire une fois reconnus par des PRRs, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern-Recognition Receptor) (Bianchi, 2007; Matzinger, 2002). Cinq classes de PRRs ont été actuellement décrites : i) les récepteurs de surface ou endosomaux Toll-like Receptors (TLRs), ii) les cytoplasmiques NOD-like Receptors (NLRs) et inflamasome, iii) les intracellulaires RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) like receptors, iv) les transmembranaires C-type lectin receptors et enfin v) les AIM2 (absent in melanoma 2) – like receptors) (Chen & Nuñez, 2010).

Quant aux DAMPs, aussi nommés alarmines, ils présentent une diversité considérable, avec des compartiments cellulaires d'origine distincts (Schaefer, 2014).

2) Des alarmines à foison

a- Origine : matrice extracellulaire (MEC)

De plus en plus d'études démontrent qu'une série de molécules normalement séquestrées dans la matrice extracellulaire peuvent être relarguées en cas de dommages tissulaires et agir en tant que DAMPs sous leur nouvelle forme soluble (Frey et al, 2013; Hsieh et al, 2014). D'ailleurs, pour mettre un terme à l'inflammation consécutive, une synthèse *de novo* de composés de la MEC va être mise en place (Zeng-Brouwers *et al*, 2014; R *et al*, 2011; Moreth *et al*, 2010). Les **protéoglycanes** sont un de ces (MEC)-DAMPs les plus caractérisés. Ils sont relargués de la MEC à travers l'action d'enzymes protéolytiques comme les MMPs (2, 3, 13) ou le granzyme B. Leur structure riche en chaînes variées de glycosaminoglycanes leur permet d'interagir avec certains PRRs tels que TLR2 et 4 pour la décorine et le biglycane. Par exemple, la fixation de ce dernier avec TLR2/4 résulte en la synthèse et la maturation de l'IL1 β via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase 1 (Babelova *et al*, 2009; Nastase *et al*, 2012; Schaefer *et al*, 2005). De ce fait, il est courant que les DAMPs soient des biomarqueurs pour diverses pathologies inflammatoires, ici les biglycanes, et ont en effet été décrits comme des marqueurs plasmatiques d'inflammation rénale chronique (Hsieh *et al*, 2014). Quant au versicane, protéoglycane associé aux parois des vaisseaux, il est reconnu par l'hétérodimère TLR2/6 et son adaptateur CD14, stimulant la métastase de carcinomes (Kim *et al*, 2009).

b- Origine : cytosol

Dans cette catégorie, les principaux représentants sont l'**acide urique**, les protéines **S100** ou encore les protéines **HSP** (Heat Shock Protein).

L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines par l'enzyme xantine oxydoreductase. A l'inverse de la plupart des alarmines, l'acide urique est soluble à l'intérieur de la cellule, mais une fois extracellulaire, il précipite en formant des microcristaux de monosodium d'urate (MSU). Facteur étiologique de la goutte, les cristaux de MSU sont reconnus par NLRP3

et conduisent à la maturation des cellules dendritiques, à la maturation de l'IL1 β et de l'IL18 entretenant un syndrome auto-inflammatoire (Martinon *et al*, 2006).

La famille des protéines S100 (calgranulines) est composée d'une vingtaine de membres impliqués dans diverses fonctions dont l'homéostasie du calcium, la prolifération, la migration et la différenciation. Certaines dont S100A8, S100A9, S100A12 peuvent agir comme alarmines une fois libérées dans le domaine extracellulaire. Plusieurs récepteurs ont été rapportés dans la reconnaissance des S100 : TLR4, RAGE, CD147 ; menant à une réponse pro-apoptotique et inflammatoire via les voies de signalisation ERK, NF κ B ou AP-1 (Padron *et al*, 2020). Sécrétées aux sites d'inflammation par les phagocytes, elles augmentent la perméabilité vasculaire et ont un effet pro-thrombique (Bianchi, 2007).

Enfin, les HSP sont une famille de protéines chaperonnes aidant au repliement correct des protéines. Par exemple, HSP70, à côté de ses fonctions classiques de chaperonne, protège également l'ADN et exerce des fonctions cryoprotectrices et anti-inflammatoires lorsqu'elle est intracellulaire. Par contre, une fois libérée, elle agit comme DAMP. Les HSP peuvent en effet être sécrétées activement dans des exosomes ou passivement en cas de nécrose et interagir avec des récepteurs comme les TLR2/4 activant NF κ B *via* le recrutement de MyD88 (Shen *et al*, 2017). Les HSP sont impliquées dans la pathogénèse de plusieurs maladies rénales, de néphropathie diabétique ou encore de troubles neurodégénératifs comme Alzheimer ou Parkinson (Leak, 2014; Chebotareva *et al*, 2017).

c- Origine : mitochondrie

Lorsque de la mort cellulaire survient, l'organe majeur à l'origine de relargage de divers DAMPs est la mitochondrie. Parmi ces alarmines libérées, il a notamment été rapporté l'**ADN mitochondrial** (ADNmt), l'**ATP** (adénosine tri-phosphate) ou le **cytochrome C**. La mitochondrie elle-même libérée en cas de nécrose peut être reconnue par les macrophages et induire la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α) (Maeda & Fadeel, 2014).

Brièvement, l'ADNmt est reconnu par TLR9 et conduit à l'induction des voies de signalisation p38 MAPK et NF κ B et permet l'activation des neutrophiles et macrophages (Zhang *et al*, 2010; Krysko *et al*, 2011).

L'ATP, quant à lui, procure en temps normal l'énergie nécessaire pour tout processus moléculaire. Il se lie aux récepteurs purinergiques P2X et P2Y, impliqués dans de nombreuses

réponses cellulaires : vasoconstriction, inflammation, activation endothéliale. Cette liaison peut provoquer l'attraction des macrophages grâce à l'activation de l'inflammasome NLRP3, ce qui en modèle murin, a été démontré comme pouvant causer une inflammation pulmonaire évoluant en fibrose (Vénéreau *et al*, 2015; Riteau *et al*, 2010). Enfin, des études ont également décrit l'ATP comme un biomarqueur potentiel de syndrome inflammatoire intestinal (Boyapati *et al*, 2018).

d- Origine : noyau

La translocation de diverses molécules nucléaires telles que **HMGB1**, les **histones** ou l'**ADN**, conduit elle aussi à la métamorphose en DAMPs durant des phénomènes d'inflammation ou de mort cellulaire (Pisetsky, 2014).

HMGB1 (ou amphotérine), alarmine modèle présente dans la plupart des cellules, est une protéine non-histone qui se lie au nucléosome et participe à la condensation et à la réparation de l'ADN. Elle est d'ailleurs considérée comme la protéine non-histone de liaison à l'ADN la plus abondante. En cas de mort cellulaire non programmée ou de sécrétion active par certaines cellules, cette protéine est acétylée et libérée dans le milieu extracellulaire où elle va interagir avec différents PRRs : différents TLRs dont TLR2/4 ou RAGE. Toutefois même si l'apoptose ne donne pas lieu à la sécrétion d'HMGB1, des données récentes ont noté que la phagocytose de ces cellules apoptotiques provoquait la sécrétion d'HMGB1 par les macrophages concernés (Qin *et al*, 2006; Bianchi, 2007). HMGB1 possède une activité de chimiotactisme envers les monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques ou même entérocytes et cellules endothéliales. Elle exerce également des activités pro-angiogéniques, immunostimulatrices, parfois prolifératives parfois apoptotiques en fonction de son statut d'oxydoréduction (Scaffidi *et al*, 2002; Kazama *et al*, 2008). Grâce à ses actions diverses, HMGB1 représente une cible thérapeutique d'envergure dans de nombreuses pathologies immunitaires, neurodégénératives, métaboliques ou cancers (Andersson *et al*, 2018; Kang *et al*, 2014).

Les histones, elles aussi protéines nucléaires impliquées dans la formation de la chromatine, peuvent agir en tant qu'alarmines. Elles sont notamment reconnues par TLR9 enclenchant entre autres l'activation de l'inflammasome NLRP3 ou de la voie inflammatoire NFκB

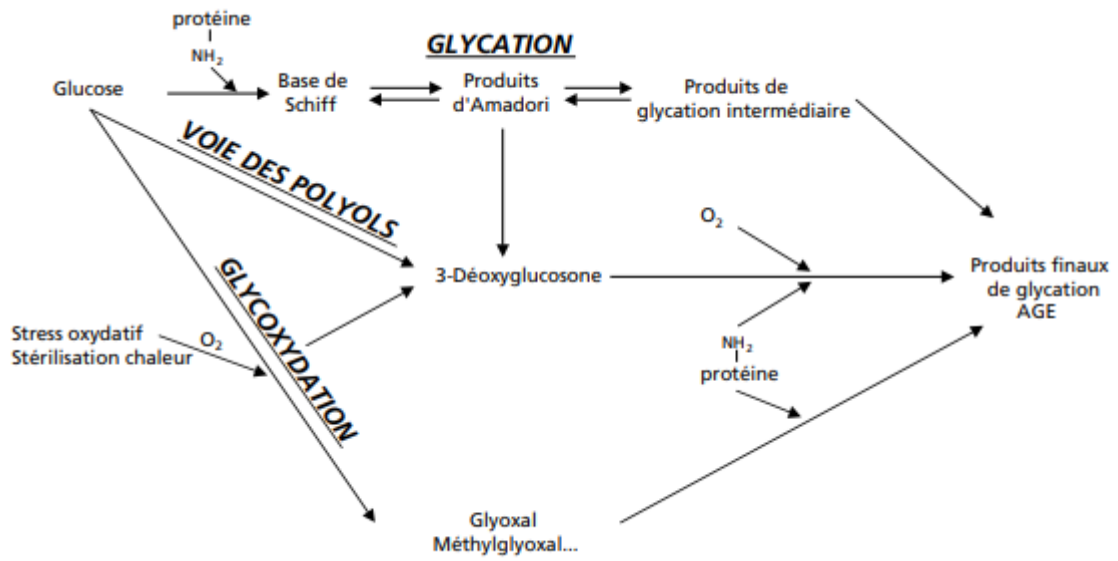


Figure 21 : Les trois voies de formation des AGEs

Les AGEs correspondent aux produits avancés (finaux) de glycation, dite réaction de Maillard. Plus récemment, la glycoxidation et la voie des polyols ont été décrites comme participant aussi à la formation des AGEs (Boulangier *et al*, 2002).

(Huang *et al*, 2011, 2013). Ainsi leur relargage en cas de sepsis accentue la dysfonction endothéliale, la défaillance des organes et la mort cellulaire (Xu *et al*, 2009).

Pareillement, suite à un épisode de mort cellulaire, l'ADN ou l'ARN cellulaire libre en extracellulaire se comporte en alarmine, reconnu notamment par TLR9. Il va alors stimuler des voies pro-inflammatoires comme celle des facteurs NFκB et AP-1 (Tran *et al*, 2008; Padron *et al*, 2020). Les acides nucléiques libres ont été décrits dans la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires, cardiovasculaires ou même dans la thrombose artérielle (Preissner & Herwald, 2017).

e- Un cas un peu particulier : les produits de glycation avancée (AGEs)

Alarmine un peu à part, **les produits avancés de glycation (AGEs** pour Advanced-Glycation End-products) n'ont pas aujourd'hui de fonction physiologique connue. L'origine de ces composés, considérés comme des glycotoxines, peut être à la fois endogène et exogène.

Ils sont dérivés de la glycation, une réaction non enzymatique, dite de Maillard, entre un sucre et le groupement amine (lysine, arginine) d'une protéine, d'un acide nucléique ou d'un lipide. Cette réaction comprend plusieurs étapes intermédiaires, réversibles ou non, avant de donner les AGEs au bout de plusieurs semaines. La première étape est courte (quelques heures) et permet la condensation d'un groupement aminé et d'un groupement carbonyle donnant une base de Schiff. Ce composé deviendra au bout de quelques jours un produit d'Amadori qui, suite à quelques réarrangements, sera converti en produits de glycation intermédiaires puis finaux, les AGEs (Thorpe & Baynes, 2003).

Deux autres voies de production ont été identifiées, la glycoxydation et la voie des polyols. Au cours de la glycoxydation, l'auto-oxydation du glucose forme du glyoxal ou méthylglyoxal qui réagissent avec les groupements amines libres pour donner des AGEs. La voie des polyols, elle, fait intervenir des enzymes telles que l'aldose-réductase ou la sorbitol-déshydrogénase pour produire du 3-déoxyglycosone à partir du glucose (**Figure 21**) (Boulanger *et al*, 2002).

D'autre part, ils pourraient en effet provenir de divers produits alimentaires et surtout du tabagisme (Nicholl & Bucala, 1998; Nicholl *et al*, 1998; Tessier & Niquet, 2007). Leur part reste cependant mineure, ils représenteraient 10% des AGEs totaux plasmatiques, en sachant qu'un tiers des AGEs exogènes sont éliminés par voie urinaire (Boulanger *et al*, 2002). Les AGEs sont ainsi un vaste groupe hétérogène de molécules, possédant des caractéristiques différentes en fonction du composé glyqué.

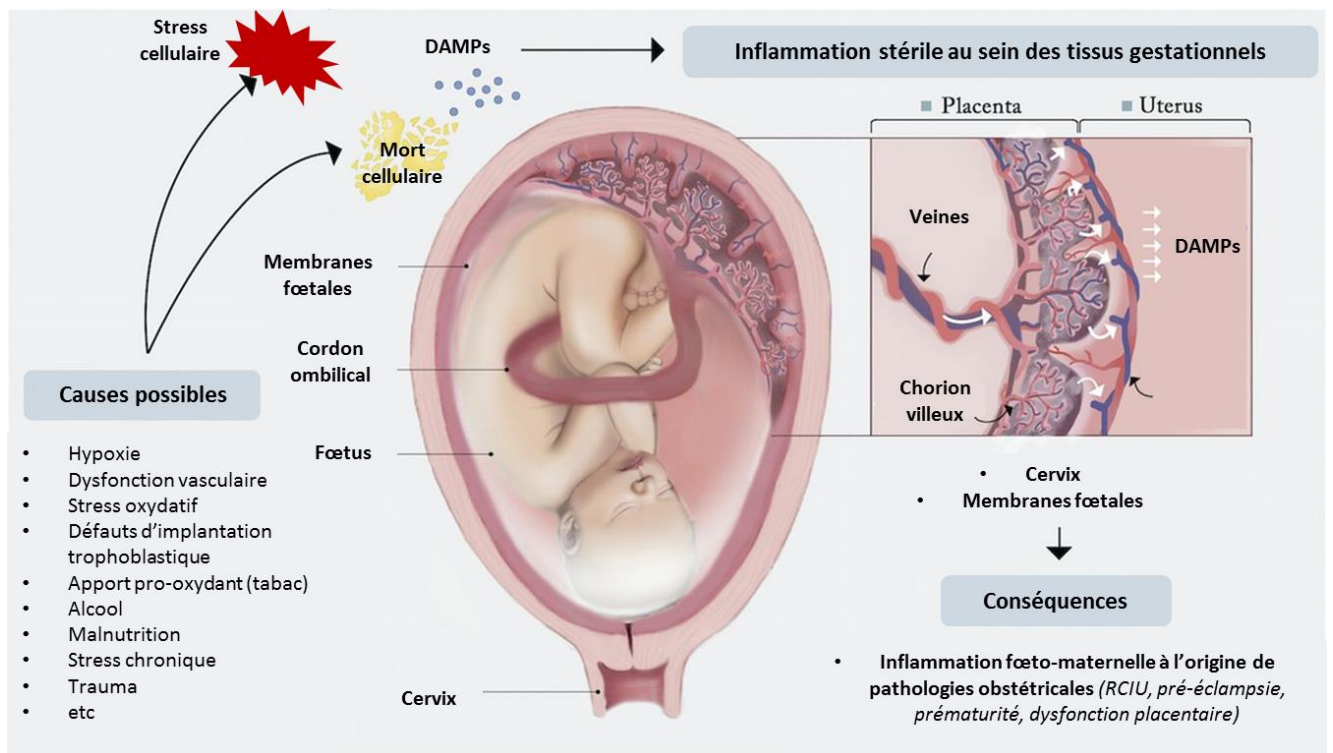


Figure 22 : Libération d'alarmines (DAMPs) durant une grossesse pathologique

Plusieurs causes de stress cellulaires peuvent affecter la viabilité cellulaire et mener à la sécrétion de DAMPs par le placenta et les membranes fœtales. Ces derniers déclenchent une réponse inflammatoire stérile dans les tissus gestationnels contribuant au développement de plusieurs complications obstétricales (Nadeau-Vallée *et al*, 2016).

Les groupements de glycation majeurs sont la pentosidine, retrouvée surtout au niveau de la MEC et la CML (N ϵ -carboxyméthyl-lysine), elle à prédominance sérique. Mais pourquoi classer les AGEs dans les alarmines ? Tout d'abord, ils sont le signe d'une dysfonction. Ils sont en effet accumulés dans les tissus au cours du vieillissement, du diabète, d'insuffisance rénale ou lors de forts stress oxydatifs. Ensuite, ils sont reconnus par un PRR : RAGE. La transduction du signal, conséquence de cette fixation, fait intervenir des mécanismes oxydatifs en stimulant la voie de la NADPH-oxydase mais active aussi la voie pro-inflammatoire NF κ B (Wautier et al, 2001; Bongarzone et al, 2017a). De nombreuses réponses cellulaires sont provoquées par les AGEs : inflammation avec synthèse d'interleukines, oxydation, augmentation de la perméabilité endothéliale. Ces caractéristiques font au final des AGEs de véritables alarmines associées à la pathogénèse ou complications de nombreuses maladies, telles que la rétinopathie ou sclérose vasculaire au cours du diabète et de l'insuffisance rénale (Fishman et al, 2018; Farhan & Hussain, 2019; Singh et al, 2001).

Il est à noter que RAGE n'est pas le seul récepteur des AGEs. Toutefois, il s'agit plutôt de récepteurs scavengers impliqués dans l'épuration de ces composés, limitant leurs effets nocifs. Par exemple, l'ensemble AGE-R1, R2 et R3, correspondant à l'association du complexe OST-48 (oligosacharyl-transferase), avec la protéine kinase 80-KH et la galectine-3, va permettre la reconnaissance des AGEs à la surface des macrophages et par la suite leur endocytose (Vlassara et al, 1995, 1985).

Cet immense panel d'alarmines permet de démontrer qu'un excès d'alarmines est souvent signe de complications pathologiques mais qu'en est-il de leurs implications potentielles dans les complications obstétricales ?

II. Alarmines : oiseaux de mauvais augure en obstétrique ?

Le rôle émergent de l'inflammation stérile dans la parturition a provoqué l'apparition de nombreuses études posant la question des alarmines comme potentiel biomarqueur de diverses pathologies. En effet un relargage de DAMPs au sein des tissus gestationnels peut avoir lieu dans plusieurs conditions (trauma, hypoxie ischémique, dysfonction vasculaire, stress oxydatif, alcool, malnutrition, stress chronique, tabagisme, ...) (**Figure 22**).

Durant une grossesse normale, les niveaux sériques maternels d'acide urique chutent de 25-35% durant le 1^{er} trimestre suite aux adaptations physiologiques mises en place (augmentation du volume sanguin et de la filtration glomérulaire, action uricosurique des œstrogènes, ...). Plus tard, les niveaux ré-augmentent et ceci est expliqué par la forte production placentaire de purines (Santillan *et al*, 2018). Cependant, une hyperurémie est souvent corrélée au développement de **pré-éclampsie**, hypertension artérielle apparaissant durant la grossesse souvent liée à de la prématurité (Bainbridge & Roberts, 2008; Michalczyk *et al*, 2020). Il a en effet été démontré que l'acide urique altère l'invasion des trophoblastes, essentielle à un remodelage correct des artères spiralées et affecte les apports du placenta en acides aminés en stimulant l'activité de la NADPH oxydase. D'autres expériences *in vitro* ont démontré que l'acide urique induisait le relargage de cytokines pro-inflammatoires par les trophoblastes et l'apoptose des cytotrophoblastes (Bainbridge *et al*, 2009a, 2009b; Nadeau-Vallée *et al*, 2016).

Les protéines S100 sont associées à des complications de la grossesse. Par exemple, la concentration amniotique de S100A12 est augmentée en cas de **chorioamniotite** et de pré-éclampsie (Brien *et al*, 2019; Zhao *et al*, 2015) tandis que S100β est retrouvée en plus fortes concentrations dans le LA en cas d'inflammation intra-amniotique et de **travail prématuré** mais aussi lors de **défauts foetaux du tube neural** et de **retard de croissance intra-utérin (RCIU)** (Friel *et al*, 2007; Marinoni *et al*, 2010; Gazzolo *et al*, 2006). S100A8 est, elle, surexprimée lors du cycle menstruel chez les femmes subissant des **fausses couches récurrentes** (Nair *et al*, 2013), et augmentée dans le sérum au 3^{ème} trimestre de la grossesse (combinée à S100A9) lors de pré-éclampsie (Pergialiotis *et al*, 2016).

Des niveaux sanguins d'HSP70 plus élevés sont décrits en cas de plusieurs complications obstétricales (pré-éclampsie, **diabète gestationnel**, **naissance prématurée**) (Garamvölgyi *et al*, 2015; Molvarec *et al*, 2010). Dans le cadre de la pré-éclampsie, là aussi, des niveaux d'ATP plus importants ont été mesurés dans le plasma maternel comparés aux grossesses sans complication (Bakker *et al*, 2007) tandis que des taux circulants accentués d'ADNmt sont observés lors de RCIU (Colleoni *et al*, 2010).

Par ailleurs, il a été décrit qu'une exposition de trophoblastes à HMGB1 menait à une inflammation avec une sécrétion de cytokines et chimiokines (IL6, IL8, MCP1) (Shirasuna *et al*, 2016). HMGB1 a ainsi été rapporté plus élevé dans le LA en cas d'infection intra-amniotique (Baumbusch *et al*, 2016). Mais surtout, Yan *et al*. ont découvert une surexpression d'HMGB1 dans le sérum et les placentas des mères subissant une **rupture prématurée des membranes fœtales** (Yan *et al*, 2018).

Les niveaux d'ADN libre augmentent tout au long de la grossesse pour culminer à la fin du 3^{ème} trimestre et chuter rapidement après la délivrance (Ariga *et al*, 2001). Cependant, des niveaux élevés d'ADN cellulaire libre ont été retrouvés dans les grossesses à complications que ce soit lors de naissance prématurée (van Boeckel *et al*, 2018), pré-éclampsie (Sarzynska-Nowacka *et al*, 2019; Lazar *et al*, 2009; Yu *et al*, 2013), de diabète gestationnel (Thurik *et al*, 2016) ou de **réductions des mouvements du fœtus**, ici associés également à des taux sériques accentués d'acide urique et d'HMGB1 (Girard *et al*, 2014).

Pour finir, de nombreux travaux ont aussi prouvé l'implication des AGEs dans la pré-éclampsie. Harsem *et al*. ont rapporté des taux sériques d'AGEs plus élevés chez les femmes atteintes de cette pathologie, corroborés par les travaux de Yan *et al*. qui ont fait la même observation dans le placenta et le sang du cordon ombilical (Yan & Jiang, 2015; Harsem *et al*, 2008). Ils contribueraient aux modifications vasculaires du lit placentaire menant à la pré-éclampsie (Guedes-Martins *et al*, 2013). Si les AGEs ont effectivement été remarqués au sein des syncytiotrophoblastes, des cellules endothéliales et des macrophages placentaires, un marquage plus intense était dénoté lors de pré-éclampsie (Chekir *et al*, 2006). Ils induisent d'ailleurs la sécrétion de chimiokines (RANTES, MIP1 α/β) et l'apoptose au sein des trophoblastes de 1^{er} trimestre (Konishi, 2004). Les AGEs ont aussi été rapportés comme associés au diabète gestationnel (Li & Yang, 2019). Enfin, une étude préliminaire supporte l'idée d'utiliser les AGEs comme un marqueur sérique précoce de travail et rupture des membranes prématurés (Kansu-Celik *et al*, 2019).

Nous avons présenté ici les alarmines majeures étudiées dans les complications obstétricales notamment dans la pathogénèse de la pré-éclampsie, du RCIU, des inflammations intra-amniotiques, du travail prématuré, des pertes récurrentes de grossesse et de la pPROM. Pour

exercer leur fonction, ces DAMPs vont interagir avec leurs PRRs, qui sont abondamment exprimés dans les tissus gestationnels. Mon travail de thèse s'est focalisé sur un PRR en particulier pouvant fixer diverses alarmines dont HMGB1 et AGEs, surexprimés en cas de pPROM. Ce récepteur, RAGE mérite donc, dans l'environnement de ce travail de thèse, que nous fassions un peu plus connaissance avec celui-ci dans le chapitre suivant.

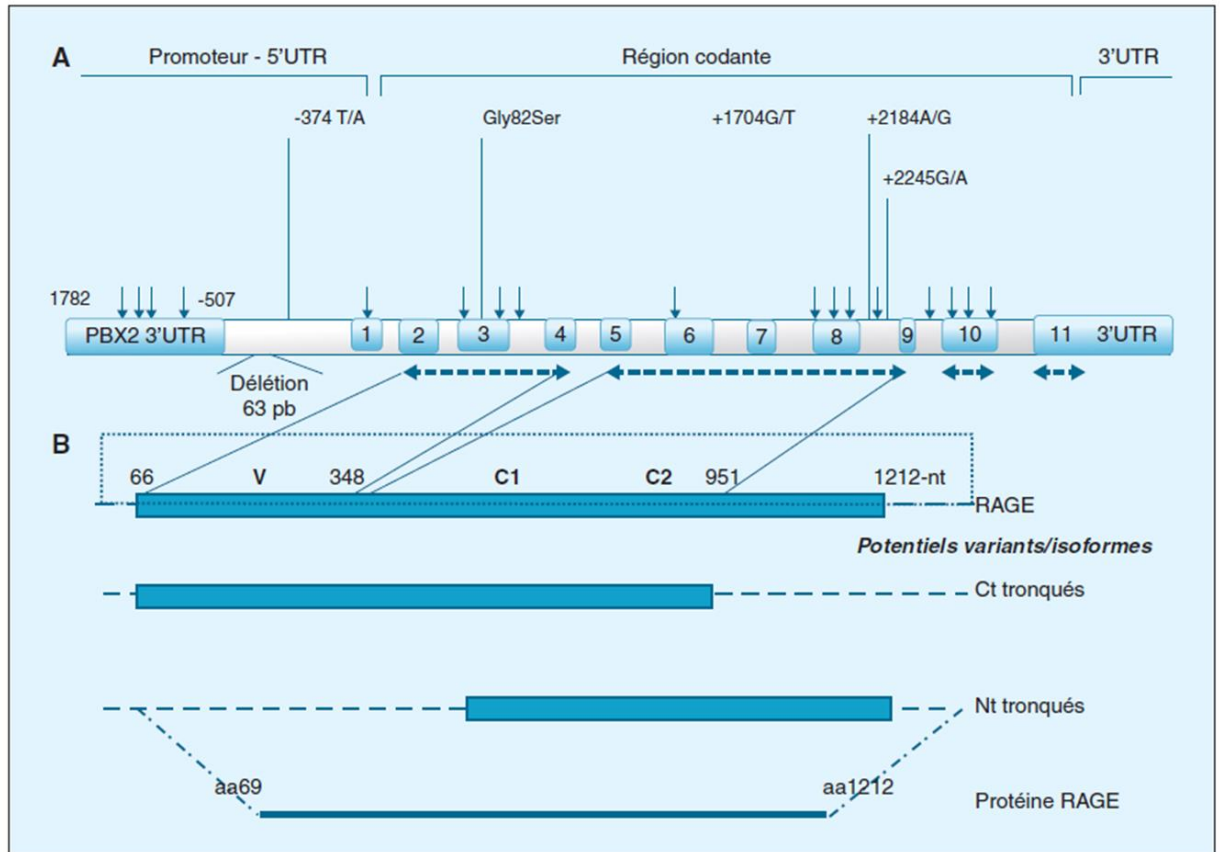


Figure 23 : Organisation du gène codant RAGE

La protéine RAGE est codée par *ager*, un gène composé de 11 exons. En A), les flèches indiquent la position relative des mutations fréquentes identifiées sur *AGER*. En B), sont représentées les séquences exoniques codant RAGE intégral (fl-RAGE) et la position des domaines V, C1/C2 puis ses différents variants (Ct-tronqués, Nt-tronqués) (Barbezier *et al*, 2014).

CHAPITRE IV : LE RÉCEPTEUR AUX PRODUITS DE GLYCATION AVANCÉS (RAGE) OU LE JANUS DES RÉCEPTEURS.

I. RAGE : à qui avons-nous affaire ?

1992 : élection de Bill Clinton aux présidentielles des Etats-Unis, création de l'Union Européenne, assassinat du célèbre juge anti-mafia Giovanni Falcone, mais surtout première caractérisation du récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE) par Michael Neeper en Pennsylvanie. Neeper *et al.* ont mené des expériences isolant une protéine présente à la surface des cellules endothéliales liant sélectivement et de manière saturante les AGEs. Leur travail a consisté ensuite à cloner l'ADN complémentaire dont RAGE est issu. Ils ont ainsi identifié RAGE, un récepteur transmembranaire de type I (longue partie N-terminale extracellulaire/ courte portion C-terminale intracellulaire), nouveau membre de la superfamille des immunoglobulines (Neeper et al, 1992; Schmidt et al, 1996).

1) Expression de RAGE et transcrits

Le gène codant RAGE (ou AGER), d'environ 1400 pb, comprend 11 exons et est localisé sur le chromosome 6, à proximité de la région majeure d'histocompatibilité (CMH) de classe III, et aux environs des gènes codant TNF α et β . Il s'agit d'un gène très conservé. L'existence de plusieurs variants de RAGE a été démontré avec mention d'au moins 19 transcrits RAGE (v1 à v19). En effet, plusieurs sites d'initiation de la transcription et de poly-adénylation ont été caractérisés sur le gène RAGE (Hudson et al, 2008a). Cependant, une partie des transcrits ne code pas de protéine et ceux traduits ne sont pas tous fonctionnels. Ainsi, les formes les plus transcrits sont : la forme intégrale de RAGE donnant une protéine de 404 AA (full-length RAGE), les formes de RAGE tronquées en C-terminal (Ct-RAGE) et en N-terminal (Nt-RAGE). Ct-RAGE est obtenu à partir de l'épissage alternatif de fl-RAGE. Nt-RAGE est issu de la transcription de RAGE à partir de l'exon 3, se finissant au sein d'un intron (**Figure 23**). Ces trois transcrits représentent 90% des transcrits détectés dans les tissus pulmonaires et du muscle lisse aortique. L'expression de RAGE est en effet tissu-spécifique ce qui suppose une régulation transcriptionnelle tissu-spécifique. Par ailleurs, il a été observé une fenêtre de forte expression de RAGE durant le développement embryonnaire notamment dans le cerveau.

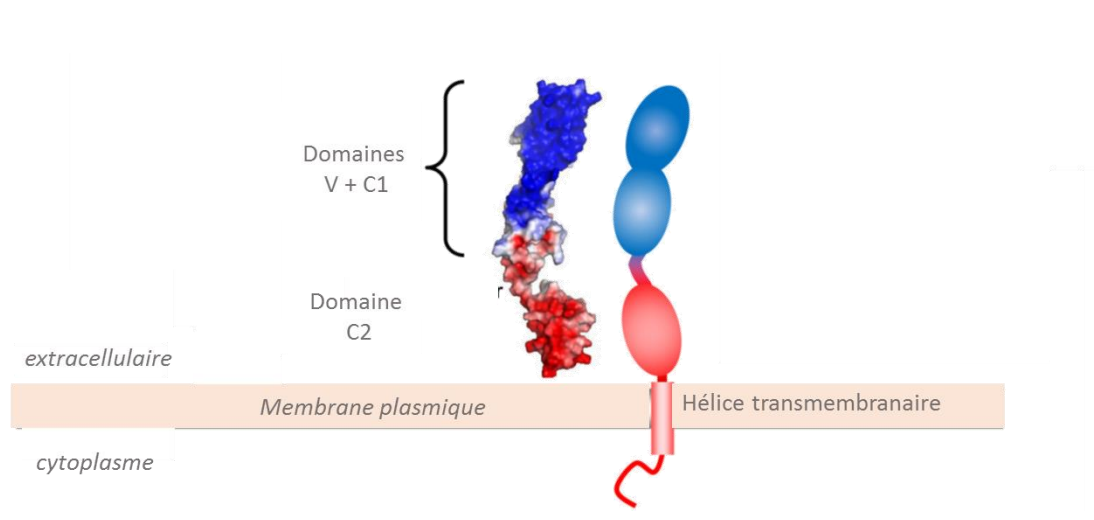


Figure 24 : Structure du récepteur membranaire RAGE

RAGE est un récepteur membranaire composé de trois domaines majeurs : extracellulaire, transmembranaire, intracellulaire. Le domaine extracellulaire est subdivisé en 3 sous-domaines (variable V, constants C1 et C2) qui permettent la fixation de ligands différents. Quant à l'intracellulaire, il permet la transduction d'un signal.

Cependant, à l'âge adulte la majorité des tissus présentent des taux d'expression basale faibles de RAGE excepté dans les poumons, les cellules endothéliales et immunitaires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes T, monocytes) mais également neuronales et musculaires (Brett et al, 1993; Kalea et al, 2009; Schmidt et al, 1993).

Enfin, il est intéressant de relever les polymorphismes existants de RAGE. Concernant les SNP (single nucleotide polymorphism), les plus étudiés sont situés au niveau du promoteur et ont pour conséquence une activité transcriptionnelle doublée voire triplée (Hudson et al, 2001). Des équipes de recherche se sont penchées sur les potentiels liens entre ces polymorphismes, auto-immunité et pathologies. Par exemple, certains SNP sont plus prévalents en cas de lupus érythémateux ou associés à une mortalité aggravée dans le cadre de cancer du sein, tandis que d'autres joueraient un rôle protecteur contre la survenue de sclérose (Tesarova et al, 2017; Giannakou et al, 2017).

2) Structure protéique de RAGE

Structurellement, la forme prédominante de RAGE, de 404 acides aminés et d'environ 50kDa, est composée de trois domaines majeurs : extracellulaire, transmembranaire, intracellulaire (**Figure 24**) (Bongarzone et al, 2017b; Xie et al, 2013).

a- Un domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire, permettant la fixation du ligand (alarmines), comprend le peptide signal (1-22AA) et trois sous-domaines homologues aux immunoglobulines, V, le domaine variable (23-116AA), et les constants C1 (124-221AA) et C2 (227-317AA). Brièvement, la structure du domaine V est formée à l'aide de deux feuillets β reliés par des ponts disulfures. L'ensemble V/C1 présente une cavité hydrophobique et des régions chargées positivement. Les liaisons hydrogènes entre V et C1 font d'eux une unité structurale fixe impliquée dans l'interaction avec divers ligands à caractère acide (chargés négativement) tels que les AGEs, les protéines S100, HMGB1, des fibrilles β -amyloïdes. Quant à la partie C2, elle est reliée à C1 de manière flexible par 12 acides aminés. De même que pour le domaine V, elle est composée de deux feuillets β stabilisés par des ponts disulfures, impliqués dans la dimérisation de RAGE (Yatime & Andersen, 2013; Wei et al, 2012; Bongarzone et al, 2017b; Dattilo et al, 2007).

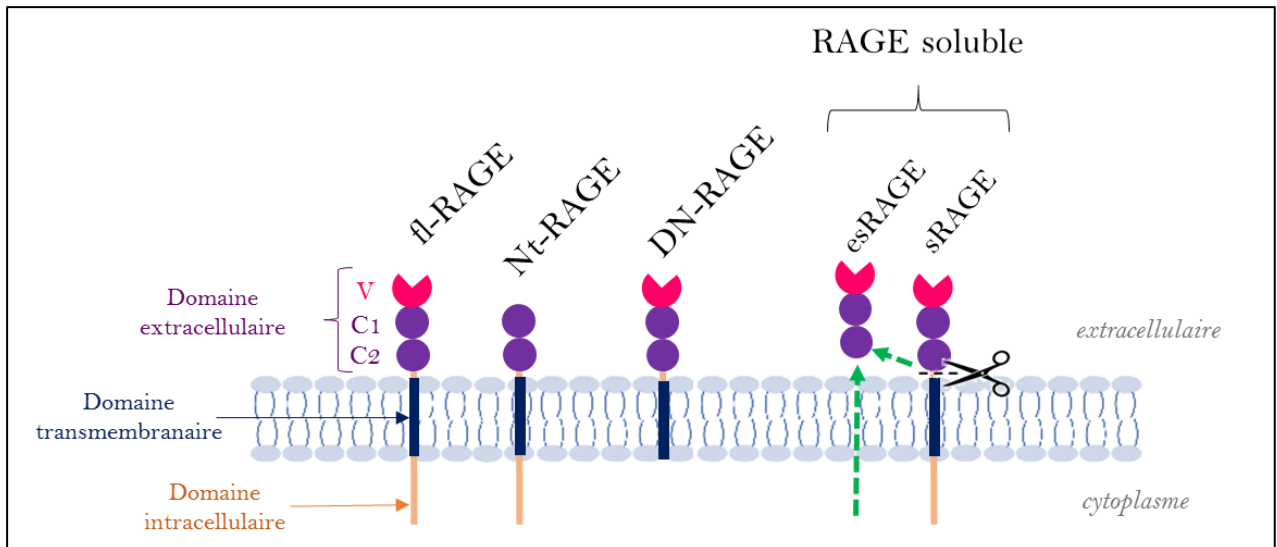


Figure 25 : RAGE et ses isoformes

Outre la forme complète capable de transduire un signal, d'autres isoformes ont été décrites. Parmi elles, Nt-RAGE ne possède pas de domaine variable et ne peut donc lier les ligands correspondants. Les autres formes ne possèdent pas de domaine intracellulaire et permettent un rétrocontrôle de l'activité de RAGE. L'une d'elles (DN-RAGE) est membranaire tandis que les 2 autres sont des formes solubles : esRAGE, directement sécrétée et sRAGE libérée après clivage enzymatique de fl-RAGE.

b- Un domaine transmembranaire

Peu de choses sont décrites à propos de ce domaine transmembranaire hydrophobe et chargé négativement (343-363AA). Il est connu qu'il possède une structure en hélice α suspectée de promouvoir l'oligodimérisation de RAGE (Yatime & Andersen, 2013).

c- Un domaine intracellulaire

Ce dernier domaine, plutôt court (334-404AA) peut être subdivisé en trois fractions. La première, proche de la membrane, est riche en acides aminés basiques (arginine et glutamate). La suivante est une région de phosphorylation composée de sérines. Enfin la dernière fraction correspond à 8 acides aminés non structurés. Au global, cette queue terminale cytosolique, chargée négativement, permet la liaison avec des adaptateurs intracellulaires (qui seront détaillés plus loin) et est ainsi impliquée et essentielle à la transduction du signal intracellulaire (Yatime & Andersen, 2013; Bongarzone et al, 2017b)

3) RAGE et ses isoformes

Il est à noter que la protéine RAGE a plusieurs isoformes (**Figure 25**). Ce récepteur peut en effet exister sous des formes plus ou moins tronquées. Tout d'abord, les protéines issues des divers transcrits cités ci-dessus présentent des propriétés différentes, tandis le **fl-RAGE** conduit à la protéine capable de transduction, le Ct-RAGE est à l'origine d'une forme soluble **esRAGE** (endogenous secretory RAGE) amputée de ses domaines transmembranaire et intracellulaire. Quant au **Nt-RAGE**, privé du domaine V, il ne peut se lier aux ligands habituels. Une autre forme soluble autre que esRAGE a été découverte : **sRAGE** (soluble RAGE). Cette dernière est obtenue à partir du clivage enzymatique de la forme membranaire intégrale par des protéases telles que MMP9 et ADAM-10 (A disintegrin and metalloprotease 10). Ces enzymes vont cliver RAGE au niveau du domaine transmembranaire, tandis que le fragment clivé est pris en charge par une sécrétase γ , esRAGE de 342AA nouvellement formé est sécrété (Raucci et al, 2008; Zhang et al, 2008). Fonctionnellement parlant, les deux formes solubles contrecarrent l'action du RAGE intégral en agissant comme récepteur leurre pour les ligands circulants. La possibilité de détecter ces isoformes solubles circulantes par des anticorps en

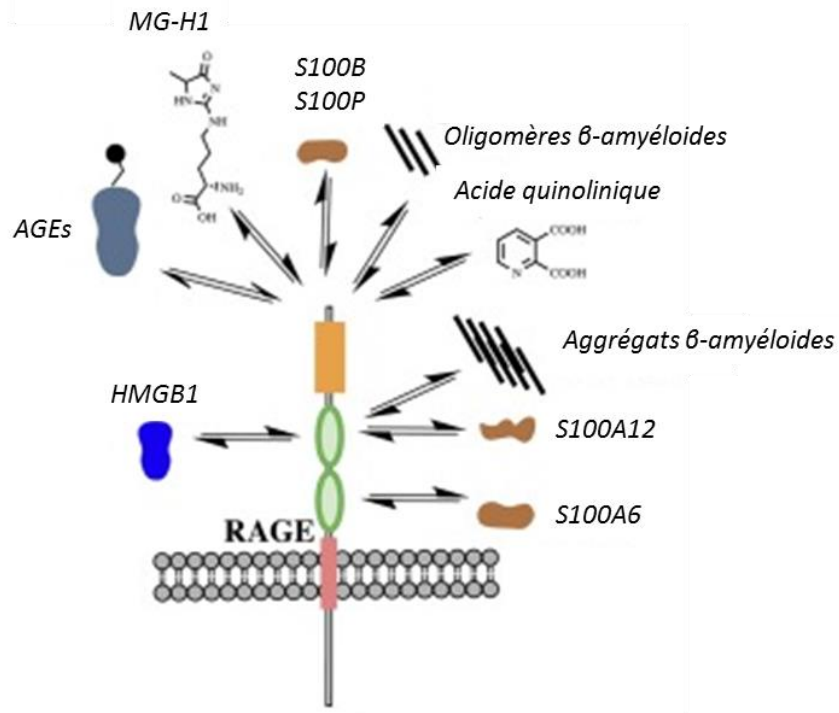


Figure 26 : Diversité des ligands de RAGE

Grâce à son domaine extracellulaire, RAGE a la capacité d'interagir avec de nombreux ligands (Bongarzone *et al*, 2017a).

fait des marqueurs potentiels de pathologies associées à RAGE (Kalea et al, 2009). Il a aussi été décrit l'isoforme **DN-RAGE**, RAGE dominant-négatif, exempt du domaine cytosolique, il est situé à la membrane et peut fixer les ligands mais est incapable de toute transduction de signal (Barbezier et al, 2014).

4) Ligands de RAGE

Grâce à ces domaines extracellulaires multiples (V, C1, C2), RAGE est capable d'interagir avec un panel considérable de ligands à l'image d'un PRR, mais principalement axé sur des ligands endogènes accumulés dans les tissus au cours du vieillissement, de l'inflammation et autres stress : les DAMPs (**Figure 26**) (Teissier & Boulanger, 2019; Bongarzone et al, 2017b; Schmidt et al, 2000).

Il en porte le nom ; les premiers ligands de RAGE découverts sont les **AGEs**, décrits précédemment, tels que les peptides CML ou CEL (Nε-carboxy-ethyl-lysine) (Kd variant du nM au μM selon les études) ou le MG-H1 (Mac-1) (Kd=40nM), fortement accumulés en cas de diabète, qui sont reconnus par le domaine V (Xue et al, 2014, 2011; Xie et al, 2008; Neeper et al, 1992; Schmidt et al, 1992). Des analyses *in silico* ont mis en évidence que les AGEs pentosidine, argyrimidine, imidazole et pyrroline peuvent être capables de fixer RAGE au niveau du domaine C1 (Fatchiyah et al, 2015). Il est à noter que les produits de glycation « précoces » ne sont pas reconnus par RAGE (Xie et al, 2008).

RAGE interagit également avec d'autres molécules comme **HMGB1** qui, à caractère acide, se lie au niveau de V/C1 avec une affinité de l'ordre du nM (Kd = 6-10nM) ce qui en fait un des ligands les plus affins de RAGE (Hori et al, 1995). Des travaux ont révélé qu'HMGB1 avait la capacité de booster la liaison de RAGE avec d'autres ligands comme l'intégrine **Mac-1** (Macrophage-adhesion ligand-1) (Orlova et al, 2007; Pullerits et al, 2006; Chavakis et al, 2003b).

Il a aussi été démontré que la majorité des 21 membres de la famille des **protéines S100** interagissent avec le domaine extracellulaire de RAGE (V, C1 et parfois même C2). L'affinité de RAGE pour les S100 varie avec un Kd allant de l'ordre du μM au nM et qui est augmentée en cas d'oligomérisation des S100 (Leclerc et al, 2009; Hsieh et al, 2004; Donato, 2007; Rani et al, 2014). D'ailleurs, la liaison des S100, dont S100β, est fortement influencée par les taux de Ca²⁺ et les changement conformationnels qu'ils induisent (Park et al, 2010).

Plus brièvement, RAGE compte parmi ses ligands les **peptides β -amyloïdes** ($K_d = 70\text{-}80\text{nM}$, accumulés dans la maladie d'Alzheimer), **l'acide quinolinique** ($K_d=43\text{nM}$), métabolite neurotoxique retrouvé dans des troubles neurodégénératifs (maladie d'Huntington), ou la protéine chaperonne **HSP70** (Iannuzzi et al, 2014; Serratos et al, 2015; Somensi et al, 2017). Bien que peu étudié, le **LPS** a également été démontré comme ligand de RAGE au niveau du domaine V, avec une haute affinité ($K_d=2\text{-}35\text{nM}$) (Yamamoto et al, 2011). Enfin, RAGE est aussi capable d'interagir avec **l'ADN et ARN** double brin (Ruan et al, 2010; Park et al, 2010).

Pour conclure, se pose la question de comment tant de composés peuvent être reconnus par un seul récepteur ? Xie *et al.* en résume assez bien les raisons : i) importante plasticité structurelle de l'ensemble V/C1 procurant une forte adaptation de liaison, ii) nombreuses régions extracellulaires chargées positivement attirant des ligands en grande majorité à caractère acide, iii) capacité d'oligomérisation de RAGE augmentant l'énergie de liaison (Xie et al, 2008).

5) Régulations de l'activité de RAGE

Outre **l'épissage alternatif** et l'existence de formes tronquées de RAGE, d'autres éléments jouent sur la régulation de l'activité de RAGE. Evidemment, l'activité est dépendante du **type cellulaire** et du **type de ligand** fixé, voire de sa concentration à la membrane ou de son état d'oxydation comme c'est le cas pour HMGB1 (Raucci et al, 2019; Sorci et al, 2013b). Sa régulation peut aussi se faire au niveau transcriptionnel par des **facteurs de transcription** comme NF κ B ou Sp1 (specificity protein 1) stimulant l'expression de RAGE, notamment en réponse à la fixation d'un ligand.

Au niveau post-traductionnel, plusieurs modifications ont été décrites. Tout d'abord, deux sites de RAGE, au niveau du domaine V, peuvent être soumis à de la **glycosylation**, modification post-traductionnelle consistant en l'ajout d'un ou plusieurs sucres, ceci permettant de promouvoir la liaison au ligand comme démontrée pour HMGB1 et S100A12 (Srikrishna et al, 2002, 2010). D'autre part, RAGE peut être **phosphorylé** au niveau du domaine intracellulaire par la protéine kinase C ζ suite à la fixation du ligand ce qui permettrait le recrutement des protéines adaptatrices nécessaires à la transduction du signal. **L'adaptateur recruté** aura lui aussi un impact sur la réponse cellulaire (Sakaguchi et al, 2011). En effet, RAGE n'ayant pas lui-même d'activité enzymatique, sa capacité à transduire un signal

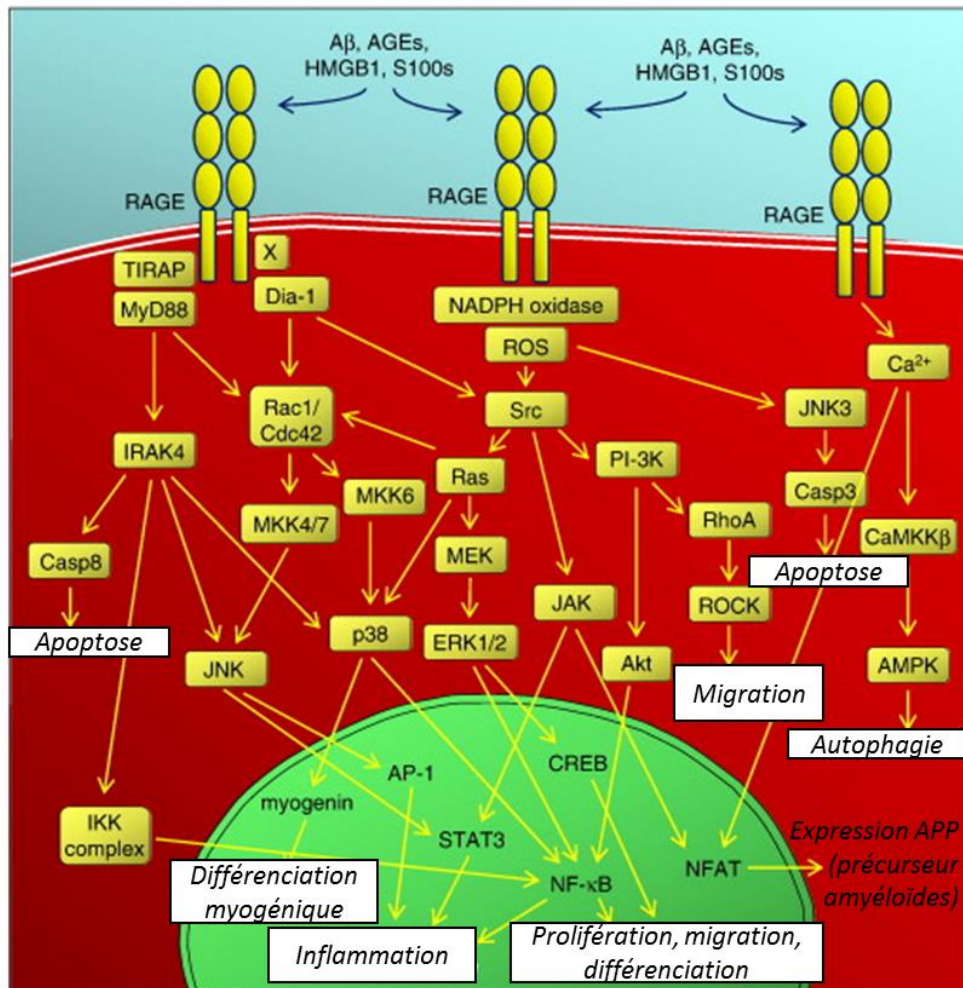


Figure 27 : Voies de signalisation et réponses cellulaires activées par RAGE

L'activation de RAGE par ses ligands peut induire de nombreuses voies de signalisation, différant selon de nombreux paramètres (type de ligand et concentration, adaptateur recruté, type cellulaire, ...). Ainsi, RAGE est globalement impliqué dans l'induction de plusieurs réponses cellulaires telles que l'apoptose, l'inflammation ou encore la différenciation, la prolifération et la migration cellulaires (Adapté de Sorci *et al*, 2013).

repose sur son interaction avec une protéine adaptatrice intracellulaire au niveau de son domaine cytosolique. La littérature en décrit trois majeurs : Dia-1 (Diaphanous-1), puis TIRAP (TIR adaptator protein) et MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) partagés eux avec les récepteurs TLR2/4. Ainsi Hudson *et al.* ont mis en évidence que l'interaction avec Dia-1 conduit plutôt à une réponse de migration cellulaire. Quant au couplage avec TIRAP et MyD88, il est impliqué dans l'induction de cytokines et chimiokines inflammatoires (Sakaguchi *et al.*, 2011; Hudson *et al.*, 2008b).

De façon plus anecdotique, DOCK7 (dedicator of cytokinesis protein 7) a également été identifié par Yamamoto *et al.* comme adaptateur intracellulaire de RAGE impliqué dans des réponses de migration cellulaire à l'image de Dia-1 (Yamamoto *et al.*, 2013).

Enfin, cela a déjà été effleuré précédemment, RAGE a la capacité de s'**oligomériser** suite à la fixation du ligand, grâce au domaine V, notamment lorsqu'il est stimulé par de fortes concentrations en ligands. Cette oligomérisation a tendance à favoriser l'activation de la PKC ζ et à induire une réponse apoptotique. Cela dit, RAGE peut s'**hétéro-dimériser** avec d'autres partenaires. Bien que peu décrits, deux ont été identifiés : DAP10 (DNAX-Activating Proteine 10) (Wilson *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2014) et le récepteur BLT1, couplé à une protéine G (leukotriene B4 receptor 1) (Ichiki *et al.*, 2016). Il semblerait que le dimère RAGE-DAP10 engendre une réponse de survie cellulaire tandis que le couple RAGE-BLT1 induit une réponse pro-inflammatoire bien que cette dernière piste nécessite des études complémentaires.

Toutes ces données sur les ligands, les modifications et les partenaires de RAGE donne un aperçu de la complexité de ce récepteur sur son activité. Dans la partie ci-dessous, une synthèse des diverses réponses cellulaires induites par RAGE va être effectuée.

II. RAGE : un labyrinthe de voies de signalisation et réponses cellulaires

1) Réponses cellulaires activées par RAGE

La liaison de ligands à RAGE provoque l'activation de nombreuses voies de signalisation : les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal Kinases), p38 ; ou JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of transcription) ; les voies PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) et Akt ou les Rho GTPases, qui vont impliquer à leur tour des facteurs de transcription comme NF κ B, CREB (C-

AMP Responses Element-binding protein), AP-1 (Activator Protein 1), STAT3, NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) ou la myogénine (**Figure 27**). *In fine*, ces voies peuvent permettre la régulation de la transcription de molécules d'adhésion, de métalloprotéases, de constituants du cytosquelette ou impliqués dans divers processus cellulaires (prolifération, migration, survie, différenciation, autophagie). Mais surtout ces signaux sont souvent à l'origine de la stimulation de la transcription de cytokines et chimiokines et de leurs récepteurs pouvant déclencher à terme une réponse inflammatoire.

a- Migration cellulaire

Le rôle de RAGE dans la migration cellulaire a été décrit dans divers types cellulaires (cellules immunitaires, astrocytes, cellules des muscles lisses vasculaires, endothéliales, chondrocytes, mésengium rénal, microglie). Plusieurs données expérimentales démontrent par exemple que l'interaction de RAGE avec HMGB1 conduit à l'activation des voies Rac1/Cdc42, MAPK, PI3K/Akt provoquant des processus de migration voire de croissance tumorale et métastase en conditions pathologiques ([Chen et al, 2014b](#); [Taguchi et al, 2000](#); [Chou et al, 2004](#)). Entre autres, la fixation des AGEs stimule elle aussi des phénomènes de migration impliqués dans la carcinogénèse à travers la voie ERK1/2, ou lors de processus de cicatrisation des cellules cornéennes par la voie NFκB, tout comme l'axe S100A4/RAGE/ERK est décrit dans le cancer colorectal (Ko et al, 2014; Dahlmann et al, 2014; Gross et al, 2020). Toutefois, des effets inverses de RAGE ont été observés dans les myoblastes où l'inactivation de RAGE augmente la prolifération et promeut la formation tumorale *in vivo*, alors que l'expression de RAGE diminue la migration au cours d'un rhabdomyosarcome, tumeur maligne musculaire (Riuzzi et al, 2006, 2007).

b- Survie, prolifération et mort cellulaire

Là encore, RAGE présente des effets dichotomiques entre apoptose et survie en fonction de divers paramètres. Tout d'abord, il a été démontré que des doses de l'ordre du nM de S100β stimulent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et donc la survie cellulaire de neuroblastomes et gliomes. A l'inverse, des doses plus fortes de S100β (μM) induisent l'apoptose (Huttunen et al, 2000; Sorci et al, 2013a). Par ailleurs, le statut d'oxydo-réduction d'HMGB1 impacte sur la réponse induite. En effet, la forme totalement réduite est associée à la survie et la prolifération des cellules cancéreuses en induisant la protéine Beclin-1 alors que

la forme oxydée est responsable d'apoptose (*via* l'activation des caspases 3 et 9) et de nécrose (Tang *et al*, 2010c, 2010a). Quant aux AGEs, des travaux ont démontré leur effet pro-apoptotique à travers la stimulation de TGF β au sein d'ostéocytes (Notsu *et al*, 2017). Dans le même thème, RAGE est aussi lié à l'autophagie, ce processus catabolique où des autolysosomes phagocytent des éléments indésirables tels que des organites ou protéines endommagées. Il a été découvert que l'activité de mTOR, protéine inductrice majeure de l'autophagie, est inhibée dans des cellules tumorales RAGE $^{-/-}$, et qu'HMGB1 est requis pour la liaison de Beclin-1, autre protéine autophagique impliquée dans la formation du phagosome (Kang *et al*, 2010; Tang *et al*, 2010b). Cette stimulation de l'autophagie conduit en général à une survie cellulaire et limite l'apoptose.

c- Inflammation

Finissons avec le rôle originel assigné à RAGE : sa participation à la réponse inflammatoire. Ce constat est basé sur deux découvertes. D'une part, RAGE présente de hauts niveaux d'expression lors de lésions inflammatoires associées à de nombreux types de pathologies. D'autre part, le blocage de RAGE retarde la réponse inflammatoire (Hofmann *et al*, 1999). Par exemple, les souris RAGE $^{-/-}$ se montrent plus protégées envers des troubles inflammatoires (sepsis, inflammation pulmonaire due au tabac) (Xie *et al*, 2013; Liliensiek *et al*, 2004). Sans oublier le fait que RAGE est exprimé dans de nombreuses cellules immunitaires comme décrit précédemment et qu'une accumulation de ses ligands est souvent observée au niveau des sites d'inflammation (Chen *et al*, 2008; Collison *et al*, 2002; Chuah *et al*, 2013).

En effet, la stimulation de RAGE est désormais bien connue pour enclencher diverses voies pro-inflammatoires. Ainsi, la voie NF κ B a été le premier signal de transduction décrit comme activé par les AGEs (Yan *et al*, 1994). Ce facteur de transcription régule ensuite l'expression de plusieurs gènes dont des médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , IL6, cyclo-oxygénase 2 par exemple) et RAGE lui-même, amplifiant par conséquent cette inflammation la plupart du temps chronique (Li & Schmidt, 1997). L'activation de RAGE par ses ligands peut conduire également à l'induction des cascades de signalisation des MAP kinases comme ERK ou p38-MAPK. Enfin, il a été démontré l'activation de la MAPK JNK par la protéine S100 β , conduisant

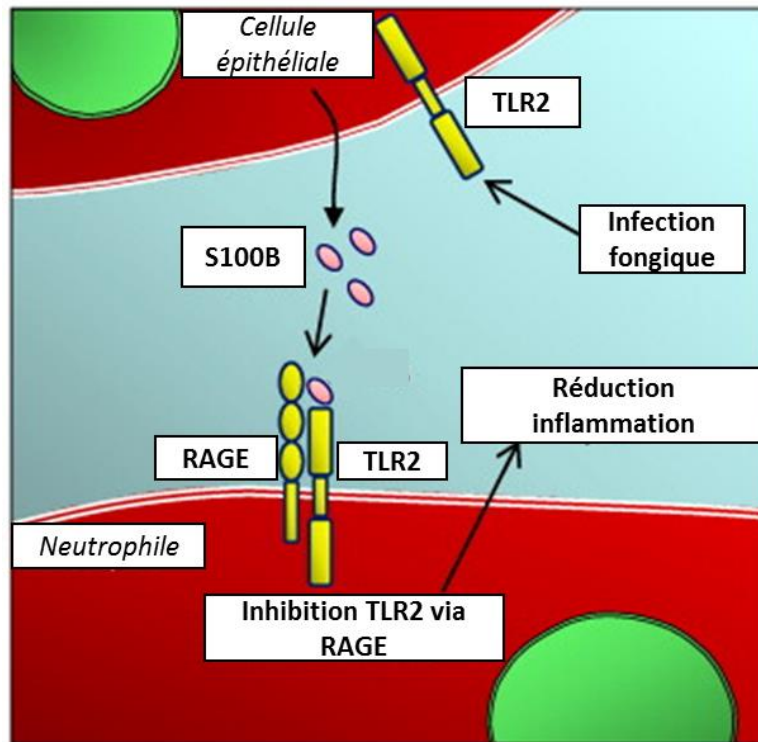


Figure 28 : Résolution de l'inflammation par RAGE

L'infection de cellules épithéliales bronchiques par *Aspergillus fumigatis* provoque l'activation de TLR2 et ainsi une réponse inflammatoire. De plus, cette activation a pour résultat une augmentation de la sécrétion de S100B, qui va interagir avec RAGE, exprimé à la surface des neutrophiles recrutés, régulant l'activité de TLR2 et donc diminuant l'inflammation TLR2-dépendante (Adapté de Sorci *et al*, 2013).

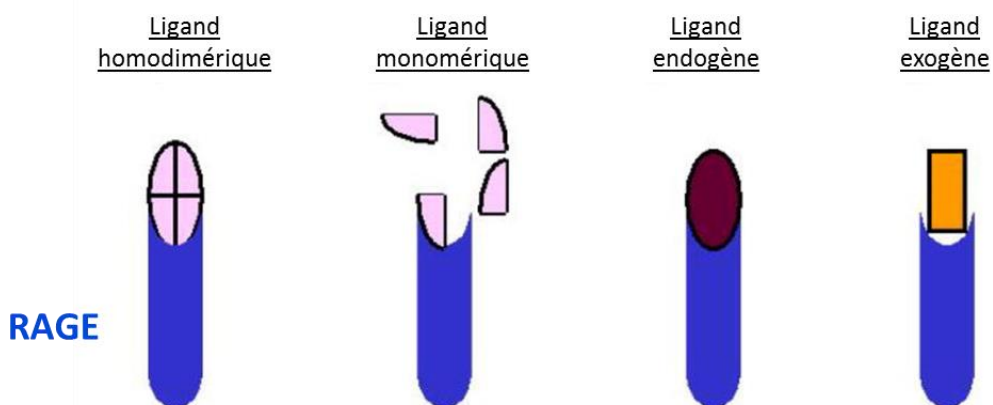


Figure 29 : Paramètres impactant sur l'affinité de RAGE pour ses ligands

L'affinité du ligand pour RAGE est une hypothèse émise pour expliquer le rôle de RAGE parfois dans l'inflammation aiguë ou parfois chronique. Il a été souligné que les ligands homodimériques présentent une plus forte affinité pour RAGE que les monomériques. Pareillement, les ligands endogènes sont plus affins que les ligands exogènes de RAGE (Adapté de Lin *et al*, 2009).

à l'activation du facteur de transcription AP-1 régulant l'expression de gènes pro-inflammatoires à l'image de NFκB (Xie et al, 2013; Bianchi et al, 2007). Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont révélé l'implication de RAGE dans le recrutement des cellules inflammatoires. RAGE a effectivement la capacité d'agir comme un récepteur endothélial d'adhésion attirant les leucocytes (Chavakis et al, 2003a). D'autre part, les travaux de Manfredi *et al.* ont démontré que l'expression de RAGE était essentielle à la migration des cellules dendritiques jusqu'aux ganglions lymphatiques (Manfredi et al, 2008).

Paradoxalement, des données suggèrent également un rôle de RAGE dans l'atténuation de l'inflammation aiguë. Par exemple, au niveau du poumon, il a été observé que l'activation de RAGE par S100β menait à la résolution de l'inflammation provoquée par le champignon *Aspergillus fumigatus*. Ce résultat est expliqué par le fait que l'infection fongique provoque l'activation de TLR2, et le relargage de S100β qui va agir de manière paracrine en se fixant sur RAGE, réduisant l'activation de TLR2 et donc permettant la réduction de l'inflammation. Par contre, en présence de doses exacerbées de S100β, l'inflammation pulmonaire due au champignon est accentuée (**Figure 28**) (Sorci et al, 2011). Dans la même logique, il a aussi été démontré en modèle murin que RAGE facilite la défense de l'hôte lors d'un sepsis dû à *Escherichia coli* en limitant l'inflammation au niveau abdominal (van Zoelen et al, 2009).

Bien qu'il est certain que RAGE est impliqué dans l'inflammation chronique et aiguë, il reste un flou sur le mécanisme de régulation décisionnel de la participation de RAGE chronique *versus* aiguë. Herold *et al.* ont émis une première hypothèse : le statut d'oligomérisation des ligands de RAGE. Les ligands oligomériques présentent une plus forte affinité et sont responsables de la mise en place d'une inflammation chronique. A l'inverse, les ligands monomériques affichent des affinités plus faibles et peuvent seulement provoquer une réponse aiguë (Herold et al, 2007). Toujours question d'affinité, d'autres travaux proposent une seconde hypothèse : l'origine des ligands. Les ligands endogènes, présentant une plus forte affinité, sont en effet initiateurs d'une inflammation chronique, en opposition aux ligands exogènes qui contribuent à une réponse aiguë. Il a aussi été suggéré une collaboration entre TLRs et RAGE dans la génération d'une inflammation aiguë afin de procéder à la clairance rapide du pathogène (**Figure 29**) (Lin et al, 2009; Tian et al, 2007).

2) Fonctions biologiques de RAGE et pathologies

Il est à noter que la fonction physiologique de RAGE n'est pas encore clarifiée. L'invalidation génétique de RAGE en modèle murin ne s'est pas révélée létale toutefois certains phénotypes ont été observés (Xie et al, 2013). En plus d'une protection envers des troubles inflammatoires citée plus tôt, une hyperactivité et une sensibilité auditive accrue ont de même été notés, suggérant un rôle de RAGE au niveau des signaux neuronaux (Sakatani et al, 2009). RAGE apparaît comme bénéfique pour la régénération du système nerveux périphérique après une blessure (Rong et al, 2004a, 2004b). Par ailleurs, le remodelage osseux est affecté chez les KO RAGE, il semblerait en effet que RAGE permette la maturation des ostéoclastes (Zhou et al, 2006). Enfin, la forte expression de RAGE au niveau pulmonaire serait associée à son rôle dans le maintien de l'homéostasie, par exemple le blocage de RAGE perturbe les contacts cellule-matrice extracellulaire au sein du poumon (Queisser et al, 2008).

Cependant, les études menées sur RAGE ont plutôt permis de mettre en évidence le lien entre la pathogénicité de RAGE et sa surexpression. Plus précisément, ces pathologies résultent d'une longue durée d'exposition des cellules aux ligands de RAGE en fonction de l'état physiopathologique, cause directe de la production accentuée des ligands. Par exemple, l'augmentation de la concentration sérique des AGEs retrouvée dans le cadre du diabète (II ou gestationnel) ou lors du vieillissement, provoque des effets connexes tels que la glycation et oxydation des lipoprotéines LDL, un dysfonctionnement endothélial et une baisse de la vasodilatation ainsi qu'une altération des protéines de la matrice extracellulaire comme les collagènes (Barbezier et al, 2014; Ziemann & Kass, 2004; Gautieri et al, 2017). La teneur élevée des ligands de RAGE (AGEs en cas de diabète, vieillissement ; HMGB1 et les S100 en cas de syndrome coronaire, de syndromes de détresse respiratoire aiguë, de septicémie ou de cancers ; peptide β -amyloïdes pour Alzheimer, ...) initie le rétrocontrôle positif de RAGE, conduisant à la mise en place d'une inflammation chronique ou à l'altération des vaisseaux sanguins. Ainsi, une surexpression de RAGE a été mise en évidence dans les complications vasculaires et neurologiques du diabète (rétinopathie, neuropathie, néphropathie, athérosclérose), la maladie d'Alzheimer, le syndrome métabolique, des troubles neurodégénératifs, des lésions pulmonaires, certains types de cancer (poumon, sein, pancréas, ovaire) et du psoriasis (Jangde et al, 2020; Chhipa et al, 2019; Cai et al, 2016; Lei et al, 2017; Selejan et al, 2018; Blondonnet et al, 2017; Lorenz et al, 2008; Andersson et al, 2020).

III. RAGE et rupture prématurée des membranes : quels éléments pour soutenir cette piste ?

Nous venons ainsi d'apprendre que l'action pathologique de RAGE passe notamment par l'accumulation excessive de ses ligands, les alarmines, dans les tissus. Or nous l'avons vu en amont, il arrive que ces DAMPs soient justement surexprimés dans plusieurs complications obstétricales dont la pPROM. Rappelons les travaux de Yan *et al.* et de Baumbush *et al.* qui démontraient une surexpression de HMGB1 lors d'infection intra-amniotique, de rupture et naissance prématurées au sein du placenta, du sérum ou LA (Yan et al, 2018; Baumbusch et al, 2016). Rappelons également l'accumulation pathologique des AGEs décrite chez les patientes atteintes de pré-éclampsie ou de RPM (Oliver et al, 2011; Kansu-Celik et al, 2019). Mais qu'en est-il des connaissances sur RAGE dans la sphère obstétricale ?

En réalité, même si l'implication de RAGE a été décrite dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire, les données concernant les pathologies de la grossesse restent lacunaires. La majorité des études se limitent au dosage des formes solubles de RAGE (sRAGE et esRAGE), contrant l'action de RAGE par compétition. Ainsi, Oliver *et al.* ont démontré non seulement une diminution de la concentration sérique de sRAGE chez les femmes enceintes comparées aux femmes non enceintes, mais aussi une élévation sérique et amniotique de sRAGE-esRAGE associée à une augmentation de la concentration de RAGE dans les membranes fœtales chez les mères atteintes de **pré-éclampsie sévère**, observation corroborée par Germanová *et al.* (Oliver et al, 2011; Germanová et al, 2010). Ota *et al.* quant à eux ont démontré une augmentation des niveaux sériques de sRAGE associés à la hausse d'expression de marqueurs pro-inflammatoires (TNF α) dans le cadre de **perte récurrente de grossesse**. L'hypothèse des auteurs serait que l'axe RAGE impacterait les flux sanguins utérins, provoquant une ischémie fœtale *via* des phénomènes d'inflammation et de thrombose (Ota et al, 2014). Avec la même démarche, Romero *et al.* ont mis en évidence des taux amniotiques de sRAGE et esRAGE plus élevés en cas d'**inflammation et d'infection intra-amniotique** (Romero et al, 2008). Toutefois, une autre étude démontre dans les mêmes conditions que ces taux ne sont pas influencés par la présence d'inflammation/infection intra-amniotique mais révèle bien l'expression de RAGE au sein de l'amnios et du chorion (Buhimschi et al, 2007).

Concernant la **prématurité**, les données sont contradictoires là encore. En 2008, Hájek *et al.* soutient que les taux sériques de sRAGE sont accentués en cas naissance prématurée associée à du **travail prématuré** (Hájek et al, 2008). Plus tard en 2012, Bastek *et al.* affirment que les patientes avec des taux sériques de sRAGE plus élevés semblent moins susceptibles de souffrir de naissance prématurée et de **septicémie néonatale** (Bastek et al, 2012). Enfin, une augmentation des taux plasmatiques de esRAGE et des taux placentaires de RAGE a aussi été observée en cas de **rupture prématurée** des membranes (Rzepka et al, 2015; Yan et al, 2018). Cependant, plus récemment en 2020, une autre étude n'a pas révélé de différence significative des taux plasmatiques de sRAGE entre RPM et naissances à terme (Bouvier et al, 2020).

Pour conclure ce chapitre sur RAGE, même si la bibliographie semble présenter des résultats divergents, l'ensemble des données appuient l'hypothèse d'une implication de la voie RAGE dans la fragilisation physiopathologique des membranes fœtales. RAGE apparaît ainsi comme un candidat potentiel de la transduction du signal d'inflammation stérile engendrée par la libération physiologique ou pathologique d'alarmines au cours de la grossesse dans le LA et au sein des MF. Ainsi, ce travail de thèse a eu pour objectif de répondre à la question : Quel est le rôle de RAGE dans la mise en place de la rupture physiopathologique des membranes fœtales.

Objectifs de thèse & résultats

Nous l'avons compris tout est notion d'équilibre. Ce travail de thèse s'est donc divisé en deux axes majeurs : i) étudier l'activation de la voie RAGE dans un contexte physiologique de rupture ; ii) étudier son activation lors d'un contexte pathologique engendré par un facteur de risque de la RPM, le tabagisme.

I. ONTOGENESE DE L'AXE RAGE AU SEIN DES MEMBRANES FOETALES ET ETUDE DE SON ACTIVATION DANS UN CONTEXT PHYSIOLOGIQUE

Les travaux suivants vont d'abord concerner le premier axe. Dans ce cadre, l'objectif a été double. D'une part, il était nécessaire de procéder à l'ontogénèse de l'axe RAGE au sein des membranes fœtales. En effet, même si nous avons pu voir dans la littérature que l'expression de RAGE a déjà été établie dans les membranes fœtales (ceci uniquement par immunomarquage), aucune donnée n'existait à propos de l'expression de ses adaptateurs dans ces tissus, pourtant essentiels à l'activité de signalisation de RAGE. Par ailleurs, nous avons souhaité comparé l'expression des acteurs de l'axe RAGE entre les deux feuillets, mais aussi entre la zone de rupture ZAM et ZIM. D'autre part, le second but de ce travail a été de déterminer si la réponse inflammatoire provoquée par l'exposition de l'amnios et du chorion à des alarmines libérées physiologiquement au cours de la grossesse (AGEs, HMGB1) dépendait de l'activation de RAGE.

Publication N°1

Occurrence of a RAGE-Mediated Inflammatory Response in Human Fetal Membranes

Hélène Choltus^{1†}, Marilyne Lavergne¹, Corinne Belville¹, Denis Gallot^{1,2}, Régine Minet-Quinard^{1,3}, Julie Durif³, Loïc Blanchon¹ and Vincent Sapin^{1,3*}

¹ CNRS, INSERM, GReD, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

² CHU de Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand, France

³ CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, Clermont-Ferrand, France

Frontiers in physiology, Juin 2020



Occurrence of a RAGE-Mediated Inflammatory Response in Human Fetal Membranes

Hélène Choltus^{1†}, Marilyne Lavergne¹, Corinne Belville¹, Denis Gallot^{1,2}, Régine Minet-Quinard^{1,3}, Julie Durif³, Loïc Blanchon¹ and Vincent Sapin^{1,3*}

¹ CNRS, INSERM, GReD, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, ² CHU de Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand, France, ³ CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, Clermont-Ferrand, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Ramkumar Menon,
The University of Texas Medical
Branch at Galveston, United States

Reviewed by:

Terrence Allen,
Duke University, United States
Huijuan Zhang,
International Peace Maternity
and Child Health Hospital, China

*Correspondence:

Vincent Sapin
vincent.sapin@uca.fr

†ORCID:

Hélène Choltus
orcid.org/0000-0002-7557-7029

Specialty section:

This article was submitted to
Embryonic and Developmental
Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 04 March 2020

Accepted: 11 May 2020

Published: 25 June 2020

Citation:

Choltus H, Lavergne M, Belville C,
Gallot D, Minet-Quinard R, Durif J,
Blanchon L and Sapin V (2020)
Occurrence of a RAGE-Mediated
Inflammatory Response in Human
Fetal Membranes.
Front. Physiol. 11:581.
doi: 10.3389/fphys.2020.00581

Context: Sterile inflammation has been shown to play a key role in the rupture of the fetal membranes (FMs). Moreover, an early and exacerbated runaway inflammation can evolve into a preterm premature rupture of membranes and lead to potential preterm birth. In this context, we investigated the receptor for advanced glycation end products (RAGE), an axis implied in physiological sterile inflammation, in conjunction with two major ligands: AGEs and High-Mobility Group Box 1 (HMGB1). Our first objective was to determine the spatiotemporal expression profiles of the different actors of the RAGE-signaling axis in human FMs, including its intracellular adaptors Diaphanous-1 and Myd88. Our second goal was to evaluate the functionality of RAGE signaling in terms of FMs inflammation.

Methods: The presence of the actors (RAGE, HMGB1, Myd88, and Diaphanous-1) at the mRNA level was investigated by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the human amnion and choriodecidua at the three trimesters and at term. Measurements were conducted at two distinct zones: the zone of intact morphology (ZIM) and the zone of altered morphology (ZAM). Then, proteins were quantified using Western blot analysis, and their localization was evaluated by immunofluorescence in term tissues. In addition, pro-inflammatory cytokine secretion was quantified using a Multiplex assay after the treatment of amnion and choriodecidua explants with two RAGE ligands (AGEs and HMGB1) in the absence or presence of a RAGE inhibitor (SAGEs).

Results: The FMs expressed the RAGE-signaling actors throughout pregnancy. At term, RNA and protein overexpression of the RAGE, HMGB1, and Diaphanous-1 were found in the amnion when compared to the choriodecidua, and the RAGE was overexpressed in the ZAM when compared to the ZIM. The two RAGE ligands (AGEs and HMGB1) induced differential cytokine production (IL1 β and TNF α) in the amnion and choriodecidua.

Conclusion: Considered together, these results indicate that RAGE signaling is present and functional in human FMs. Our work opens the way to a better understanding of FMs weakening dependent on a RAGE-based sterile inflammation.

Keywords: fetal membranes, RAGE, alarmins, sterile inflammation, rupture of fetal membranes

INTRODUCTION

Fetal membranes are an essential actor in human parturition; if they do not achieve their missions, the childbirth can be impacted (Naeye and Peters, 1980; Romero et al., 2006; Menon, 2016; Menon and Richardson, 2017). These fetal tissues consist of two layers: the amnion, which is the innermost layer directly in contact with the amniotic fluid (AF), and the chorion, which adheres to the maternal decidua. This 9-month organ participates in the correct development of the fetus by providing AF homeostasis as well as physical and microbial barriers during pregnancy; however, they also play a role in parturition by their programmed rupture at term (after 37 weeks gestation) (Buhimschi et al., 2004; Moore et al., 2006; King et al., 2007; Prat et al., 2012). In this way, FMs undergo progressive weakening leading to this physiologic rupture of membranes (ROM) thanks to several mechanisms, such as apoptosis, senescence, or inflammation (Parry and Strauss, 1998; Menon et al., 2019).

Recently, an increasing number of studies have shown the implication of one key phenomenon in the FMs weakening: sterile inflammation (Girard et al., 2014; Romero et al., 2014, 2015). This concept is dependent on specific molecules called alarmins or “damage-associated molecular patterns” (DAMPs), which are released and recognized by pattern recognition receptors (PRRs) leading to a microbial-free inflammatory response or a “sterile” inflammation. Examples of DAMPs include high-mobility group box 1 (HMGB1) protein, the S100 protein family, uric acid, cell-free DNA, and advanced glycation end-products (AGEs), and examples of PRRs include toll-like receptors, scavenger receptors, NOD-like receptors, and the receptor for AGEs (Taglauer et al., 2014; Nadeau-Vallée et al., 2016; Brien et al., 2019). It has been determined that AF contains many of these alarmins, which induce pro-inflammatory cytokine release by activating various cellular pathways (Holmlund et al., 2007; Jakobsen et al., 2012; Bredeson et al., 2014; Menon and Moore, 2020). Lappas and colleagues demonstrated an induction of cytokine release (IL1 β , IL6, IL8, TNF α) by FMs in response to AGEs (Lappas et al., 2007).

However, it still remains unclear how this phenomenon works exactly or which receptor translates this inflammatory signaling to the FMs to prepare for a successful ROM that does not occur before 37 weeks. In the case of early activation, preterm prelabor rupture of the membranes (pPROM) can occur. pPROM affects 3–4% of all pregnancies and leads to 30–40% of all preterm births. Yearly, there are about 15 million cases of preterm birth worldwide. It is important to note that this problem is associated with the rise of perinatal mortality, morbidity, and developmental troubles (Schreiber and Benedetti, 1980; Silverman and Wojtowycz, 1998; Fujimoto et al., 2002; England et al., 2013; Lorthe, 2018; Bouvier et al., 2019; Shiqiao et al., 2019). Thus, it is essential to better understand the ROM to improve pPROM diagnostics and clinical care.

In this study, we decided to investigate the implication of one actor: RAGE (Neeper et al., 1992; Brett et al., 1993). Originally discovered in 1992 as a new member of the immunoglobulin superfamily of receptors, the RAGE is a 55 kDa cell surface

receptor that interacts with several ligands (including AGEs and HMGB1) implicated in the pathogenesis of many inflammatory diseases (Kierdorf and Fritz, 2013; Ray et al., 2016; Hudson and Lippman, 2018). Indeed, the RAGE is known to activate pro-inflammatory pathways and the release of cytokines and has been described as participating in the weakening of FMs (Rzepka et al., 2015). Plus, lower concentrations of a soluble RAGE, a competitive RAGE isoform lacking the intracellular domain, has been discovered in the maternal serum of patients suffering from pPROM (Hájek et al., 2008). Furthermore, even if the expression of the RAGE has been outlined in the placental sphere, little is known about the RAGE in FMs and even less on the action and physiopathology of the RAGE in terms of the ROM (Yan et al., 2018). Plus, it is well known that RAGE signaling activity relies on its interaction with intracellular adaptors proteins such as Diaphanous-1, Myd88, and TIR adaptor protein (TIRAP) (Hudson et al., 2008; Sakaguchi et al., 2011). Thus, this study intends to provide more information about the RAGE axis actors in the FMs and determine if a RAGE-dependent inflammatory response can specifically occur in the amnion or choriodecidua when exposed to alarmins such as HMGB1 and AGEs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

HMGB1 (SRP6265, 10 μ g/mL in phosphate-buffered saline 1X) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and AGE-bovine serum albumin (10 mg/mL, ab51995) from Abcam (Paris, France). Semi-synthetic glycosaminoglycan ethers (SAGEs) (GM-1111, 10 mg/mL in water), used for the RAGE inhibition, were kindly gifted by GlycoMira Therapeutics (Salt Lake City, UT, United States) (Zhang et al., 2011). Cell culture medium and antibiotics (streptomycin, penicillin, amphotericin B) were obtained from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Eurobio Scientific (Les Ulis, France). Collagen I was obtained from Stemcell Technologies (Grenoble, France). Superscript IV first-strand-synthesis system, Taq DNA polymerase recombinant (10342020), and Pierce BCA protein assay kit (23225) were obtained from Fisher Scientific.

Tissue Collection

Full-term FMs were collected from non-smoking women with healthy pregnancies from vaginal or scheduled cesarean deliveries (breech presentation, scarred wombs) (Centre Hospitalier Universitaire Estaug, Clermont-Ferrand, France) after obtaining informed consent. Gestational ages were 39.08 ± 0.11 weeks, mean maternal ages were 35.30 ± 0.94 years, and maternal body mass index (BMI) was 26.64 ± 6.65 . The selected FMs were collected from singleton pregnant women who had no underlying diseases and no gestational diabetes or clinical chorioamnionitis (defined by maternal fever, uterine tenderness, and/or purulent amniotic fluid). The research protocol was approved by the institutional regional ethics committee (DC-2008-558). The

amnion was dissociated from the choriodecidua. The zone of altered morphology (ZAM, with the thread) and the zone of intact morphology (ZIM, away from the thread) were also distinguished. Indeed a suture sewn placed onto the FMs (from cesarean deliveries) in front of the cervix by the midwife allowed us to identify ZAM; then, a 4-cm-diameter circle was cut and considered as ZAM, and explants localized places away from circle boundary were considered as ZIM.

Concerning samples used for RAGE axis actor exploration throughout the pregnancy, first-trimester membranes ($N = 3$) were obtained following aspiration after voluntary termination of pregnancy. Second-trimester membranes were harvested after medical termination of pregnancy ($N = 3$). Eligible cases corresponded to lethal fetal anomalies that had no impact on the FMs (e.g., severe cardiac anomalies or brain damage). Then, preterm third-trimester membranes ($N = 3$) were collected from pregnancies after cesarean births. The amnion was dissociated from the choriodecidua except for trimester 1 samples.

Tissue Culture

Explants (dissociated) of the amnion and choriodecidua were cultivated (5% CO₂, 95% humidified air, 37°C) in Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM-F12- GlutaMAX) supplemented with 10% FBS, 100 µg/ml of streptomycin, 100 U/ml of ampicillin, and 25 µg/ml amphotericin B. Explants were 2 cm² in size, obtained 2 cm away from the pre-placental edge and prepared by dissection. Tissue fragments were transferred (in duplicate) to 24-well culture plates and incubated in cell media at 37°C for 1 h before treatment.

Tissue Explant Treatment

Explants were treated with AGEs (150, 250, and 500 µg/ml) or HMGB1 (100, 200, and 300 ng/ml) in the absence or presence of SAGEs (500 µg/ml) for 18 h (cell medium collection for cytokine release assay). In addition, an internal control was performed by treating explants with a combination of lipopolysaccharide (LPS) (10 µg/ml) and TNFα (100 ng/ml) to validate inflammatory reactivity of FMs samples used. FMs were validated when there was a release response of at least one cytokine.

RT-PCR and Quantitative RT-PCR

After the disruption step with Precellys homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) using ceramic beads (KT03961, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France), total RNAs were extracted from human amnion or choriodecidua using RNeasy[®] RT (RN190, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, United States). The reverse transcription was made from 1 µg of RNA using a Superscript IV first-strand-synthesis system for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PCR experiments were performed using specific oligonucleotides (Table 1). Results were analyzed on a 2% agarose gel and verified by DNA sequencing. RAGE, HMGB1, Myd88, and Diaphanous-1 expression was assessed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) performed using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Meylan, France). Transcript quantification was performed twice on at least four independent experiments. Results were normalized to the geometric mean of the human

housekeeping genes RPL0 (36b4) and RPS17 (acidic ribosomal phosphoprotein P0 and ribosomal protein S17, respectively) as recommended by the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009).

Western Blot Analysis

After the preliminary tissue homogenization previously described, total proteins were extracted from human amnion and choriodecidua (total, ZIM, or ZAM) with a plasma membrane protein extraction kit (BioVision, Lyon, France), and protein sample concentrations were measured using a Pierce BCA protein assay kit. For Western blot analysis, proteins were resolved on a 4–15% Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] Precast Gel (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to perform total protein normalization (Gilda and Gomes, 2013). Before transfer, stain-free imaging was completed. This technology utilizes a proprietary trihalo compound to enhance natural protein fluorescence by covalently binding to tryptophan residues with a brief UV activation (Bio-Rad). Then, the transfer was performed on nitrocellulose membrane (Bio-Rad) and saturated over 1 h 30 min with 5% skimmed milk in tris-buffered saline (TBS) 1X. Antibody against the RAGE (1/1000, AF1179, R&D Systems, Noyal-Châtillon-sur-Seiche, France), HMGB1 (1/10000, ab79823, Abcam), Myd88 (1/1000, ab133739, Abcam), and Diaphanous-1 (1/5000, ab1173, Abcam) were diluted in 5% skimmed milk-TBS 1X-TWEEN[®] 20 0.1% and incubated overnight at 4°C. The next day, the membrane was washed three times with TBS 1X/TWEEN[®] 20 0.1% and incubated at room temperature with a horseradish peroxidase coupled secondary antibody anti-goat or anti-rabbit (1/5000 or 1/10,000, respectively, BI 2403 or BI 2407, Abliance, Compiègne, France) for 1 h 30 min. The revelation was completed using an ECL clarity kit for Western blot on the ChemiDoc[™] imaging system (Bio-Rad). Image Lab Software (Bio-Rad) was used for quantification. Results are expressed as a mean of at least three independent experiments.

Supernatant Protein Concentration

Before the Multiplex assays were completed, the supernatants of the treated explants were concentrated into 2 kDa centrifugal filter units (Vivacon[®] 500, Sartorius, Aubagne, France) for protein concentration and purification, following the manufacturer's instructions.

Cytokine Multiplex Assay

The release of TNFα, IL1β, IL6, and IL8 in the culture media was tested using a MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Milliplex[®] MAP Kit (Merck Millipore, Molsheim, France) based on the Luminex[®] xMAP[®] technology, according to the manufacturer's instructions (Biosource International). Finally, cytokine concentrations were normalized to total protein concentration, and the ratio "treated/untreated" was reported.

Cellular Distress Determination

For the evaluation of the treatment impact on cell suffering, the release of the intracellular enzyme lactate dehydrogenase

TABLE 1 | Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR and RT-qPCR amplification of human genes.

Gene	Sequence 5'-3' (F: forward, R: reverse)	Product size (bp)	Hybridation temperature (°C)
<i>hsRAGE</i>	F:TGTGCTGATCCTCCCTGAGA R: CGAGGAGGGGCCAACTGCA	139	61
<i>hsRPL0/36B4</i>	F: AGGCTTTAGGTATCACCACCT R: GCAGAGTTTCCTCTGTGATA	219	61
<i>hsRSP17</i>	F: TGCGAGGAGATCGCCATTATC R: AAGGCTGAGACCTCAGGAAC	169	61
<i>hsMyd88</i>	F: GCAGGAGGAGGCTGAGAAGC R: CGGATCATCTCCTGCACAACT	167	63
<i>hsDia-1</i>	F: AGAGCCACACTTCCTTTCCATC R: TCAATCTCAATCTGGAGGTGCC	167	61
<i>hsHMGB1</i>	F: ACCTATATCCCTCCCAAAGGG R: TTTTGGGCGATACTCAGAGCA	109	61

(LDH) into the cell media was quantified on a machine automate (Siemens Vista, Paris, France) using an enzymatic assay, following the manufacturer's recommendations.

Immunofluorescence

After permeabilization in PBS 1X/FBS 10%/Triton 0.1% over 1 h 30 min, the primary antibody against the RAGE (1/100, ab37647, Abcam) was applied on the FM sections overnight at 4°C. After three washes in permeabilization buffer, secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1/1000, A21206, Life Technologies) was incubated for 2 h at room temperature. Slides were washed three times in TWEEN® PBS 1X and incubated with Hoechst (15 min, dilution in PBS 1X 1/10,000; bisBenzimide H, 33258, Sigma-Aldrich). Finally, slides were mounted with CitiFluor™ Tris-MWL 4–88 (Electron Microscopy Science) and examined under an Apotome Zeiss Imager microscope (magnification ×200). For negative controls, incubation without the primary antibody was performed.

Statistical Analysis

The data expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) are an average of duplicates or triplicates of at least three independent experiments. The comparison of means was performed by non-parametric test (Kruskal–Wallis one-way ANOVA test followed by a Dunn's post-test for comparison of more than two conditions), or a Wilcoxon signed-rank test (comparing a fold change to one) using PRISM software 5.02 (GraphPad Software Inc.). For all studies, values were considered significantly different at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***).

RESULTS

Are RAGE Axis Actors Expressed in Fetal Membranes During Pregnancy?

We investigated the mRNA expression profile of the RAGE, its adaptors and one ligand (HMGB1) in FMs on amnion and choriodecidua samples throughout pregnancy (first trimester: 1 to 13 weeks of gestation (WG); second trimester: 14–26 WG; third trimester: 27–37 WG; at term: 38–40 WG, by cesarean or vaginal delivery). RT-PCR experiments revealed that FMs expressed the RAGE, HMGB1, Myd88, and Diaphanous-1 in both layers, the

amnion and choriodecidua in each of the stages considered (Figure 1A). No significant difference in RAGE expression was revealed by RT-qPCR between trimesters (data not shown). Plus, RAGE protein expression was also demonstrated in both layers obtained after vaginal delivery or caesarean section with the separate consideration of the ZIM and ZAM (Figure 1B).

Is the RAGE Axis Actor Expression Layer- or Zone-Dependent at Term?

Based on RT-qPCR analysis at term, we revealed an overexpression of RAGE (Figure 2A, left panel) and HMGB1 (Figure 2A, right panel) in the amnion compared to the choriodecidua in consideration of the ZAM. Moreover, RAGE expression was also area-dependent: it was found to be significantly more expressed in the rupture zone (ZAM) than in the ZIM. These results were confirmed at the protein level for both using western blot analysis (Figure 2B, upper panel for representative experiment and Figure 2B, lower panel for quantification).

Furthermore, considering that the RAGE requires intracellular adaptor binding to induce a cellular response, we also investigated the expression of Diaphanous-1, Myd88, and TIR adaptor protein (TIRAP). First, TIRAP was found at very low levels for mRNA and not detected by immunoblot in both layers (data not shown). Furthermore, we revealed that Diaphanous-1 is overexpressed in the amnion for mRNA (only in ZAM) and protein level in both zones (Figures 3A,B, left panels). Plus, we found a Myd88 protein overexpression in the choriodecidua in comparison to the amnion in the ZAM (Figures 3A,B, right panels).

Are the Amnion or Choriodecidua Able to Trigger an Inflammatory Response to Alarmins?

Before further investigation, cell toxicity that may have been caused by the induction of AGEs and HMGB1 treatments in the amnion and choriodecidua explants was checked. This was done using LDH release measurements in the culture media after 18 h of alarmin treatment and revealed no cell toxicity for each condition (three concentrations tested for each one; Figure 4). Then, we performed a dose response effect of AGEs and HMGB1 on cytokine release after 18 h

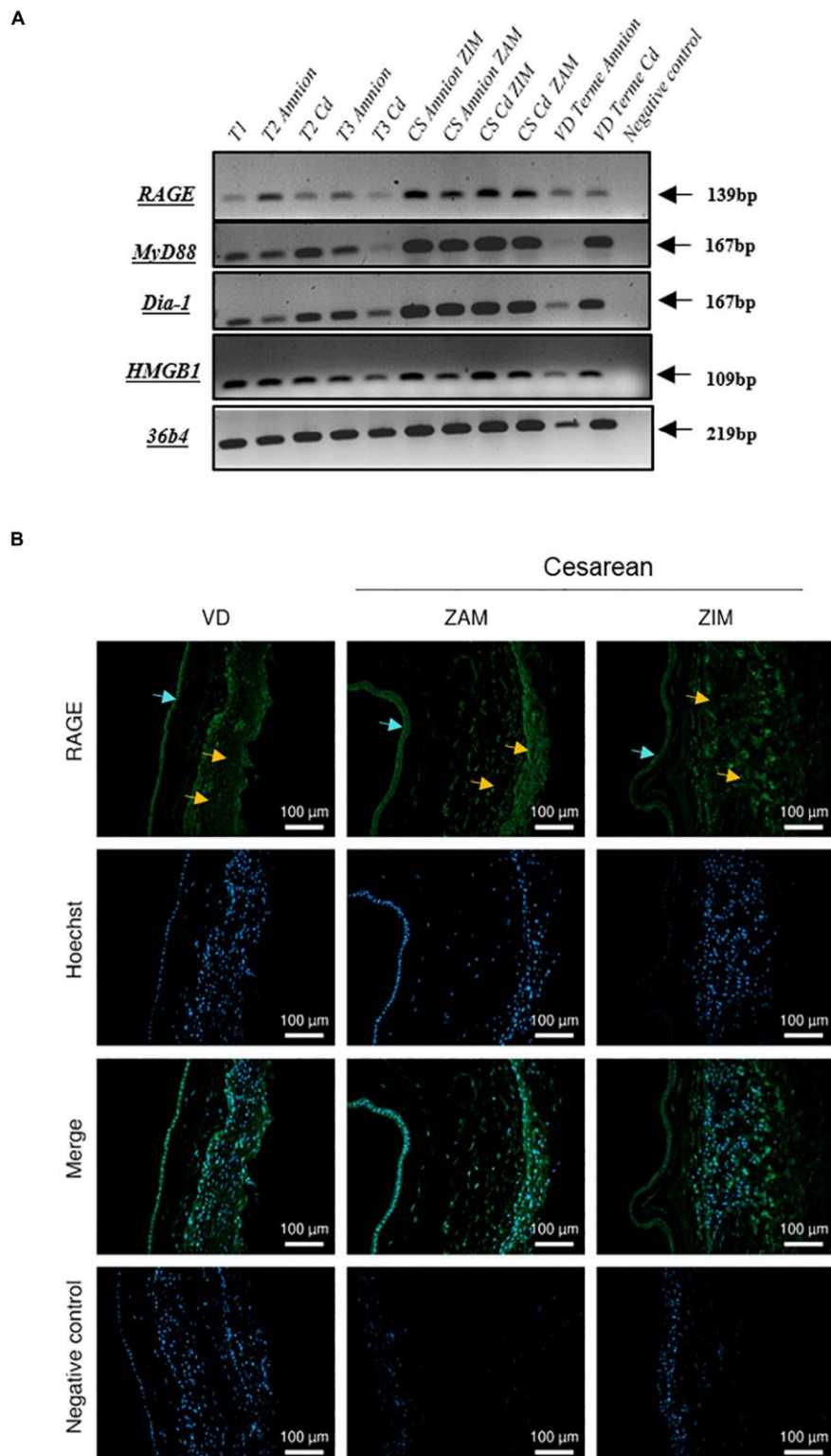
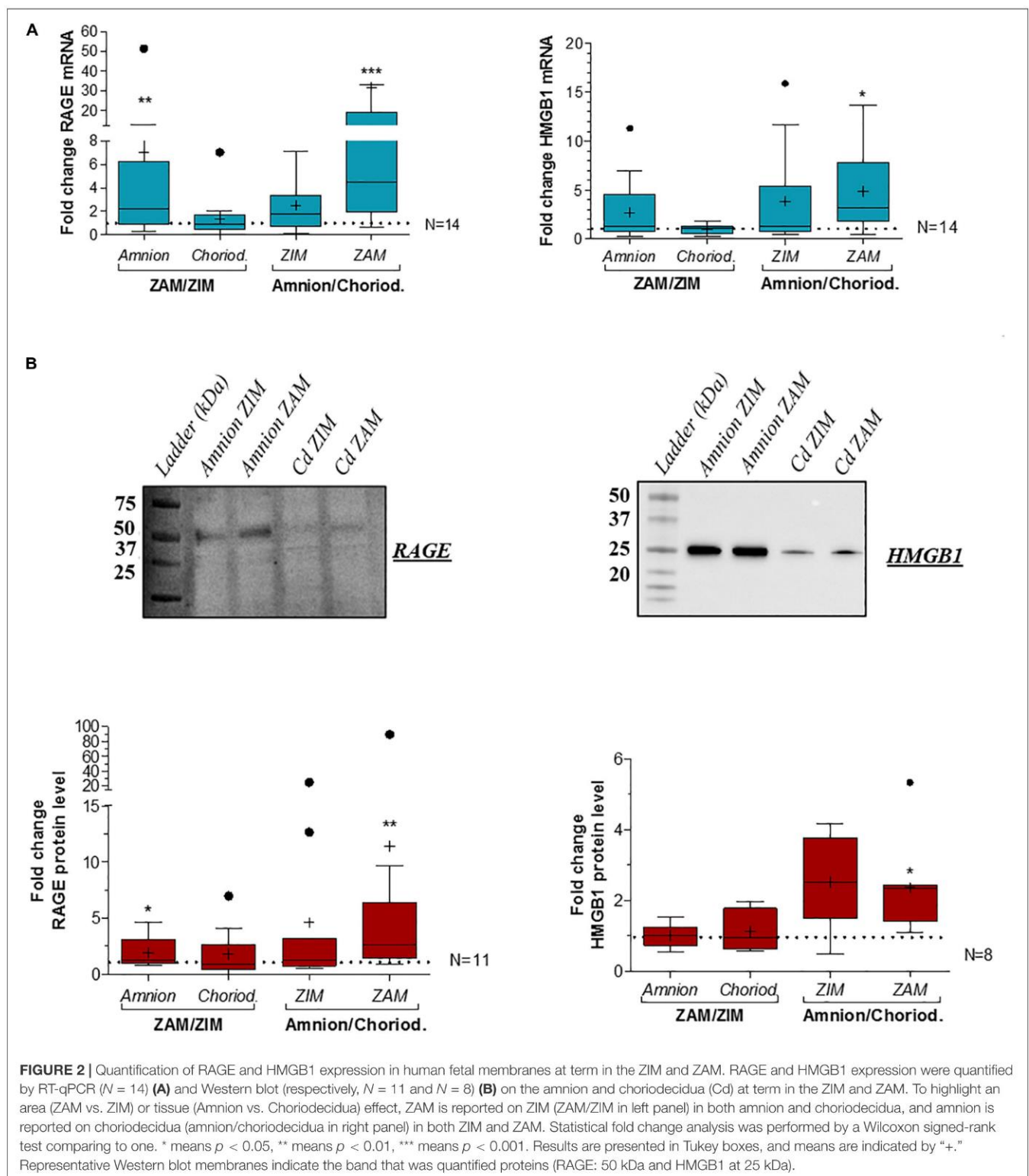
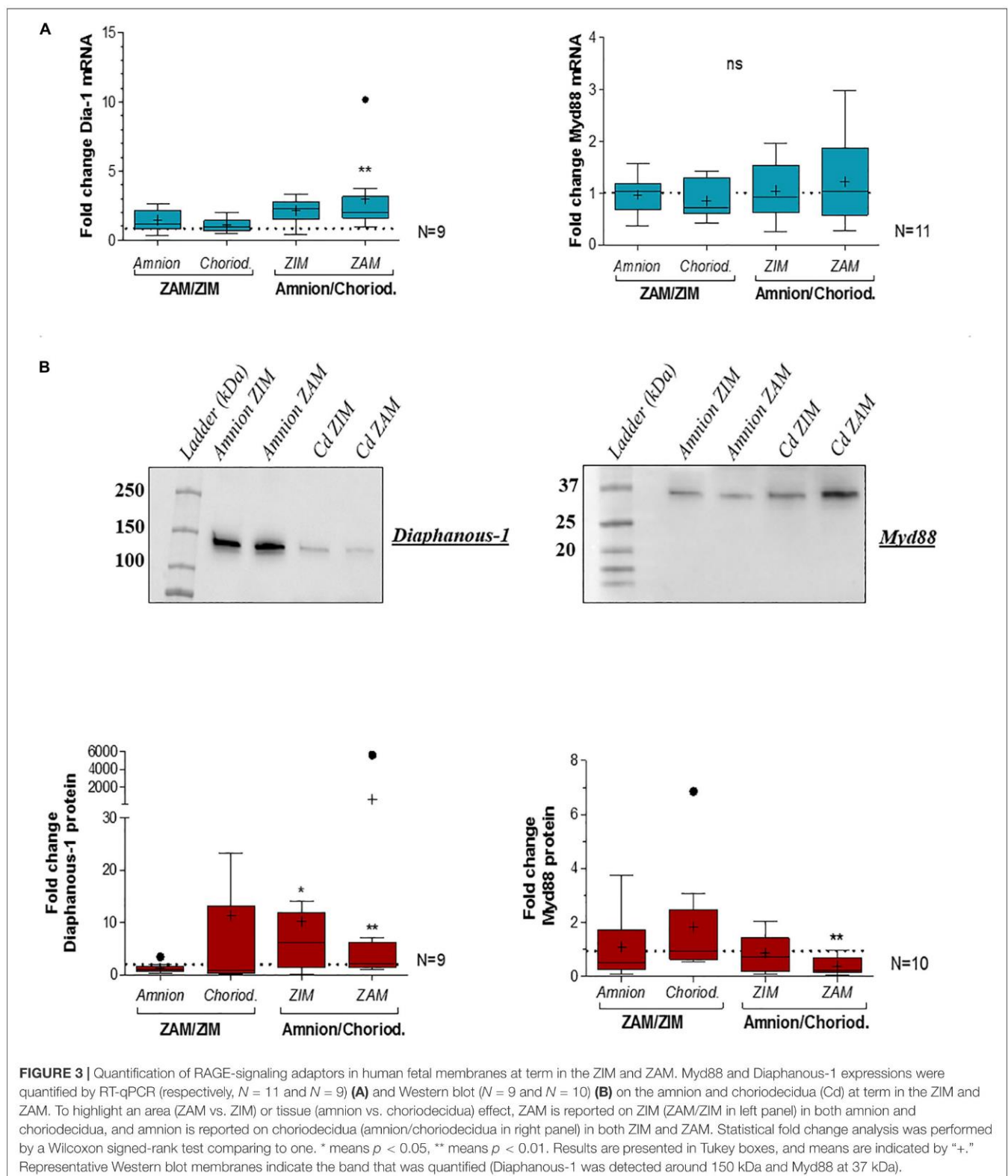


FIGURE 1 | Expression of RAGE-signaling actors in human fetal membranes. **(A)** RNA expression of the RAGE, Myd88, Diaphanous-1, and HMGB1 was detected by RT-PCR on the amnion and chorion (Cd) samples from the different trimesters (T1, T2, and T3), caesarean (CS), or vaginal (VD) delivery at term. Negative controls were performed in the absence of cDNA. **(B)** RAGE protein localization in human fetal membranes at term was investigated by immunofluorescence (green staining, Alexa488) on sections from vaginal delivery (VD) or caesarean (ZIM and ZAM) at magnification $\times 200$. Cyan arrows indicate amniotic epithelium and yellow designate chorion. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Negative controls consisted of primary antibody-free incubation.



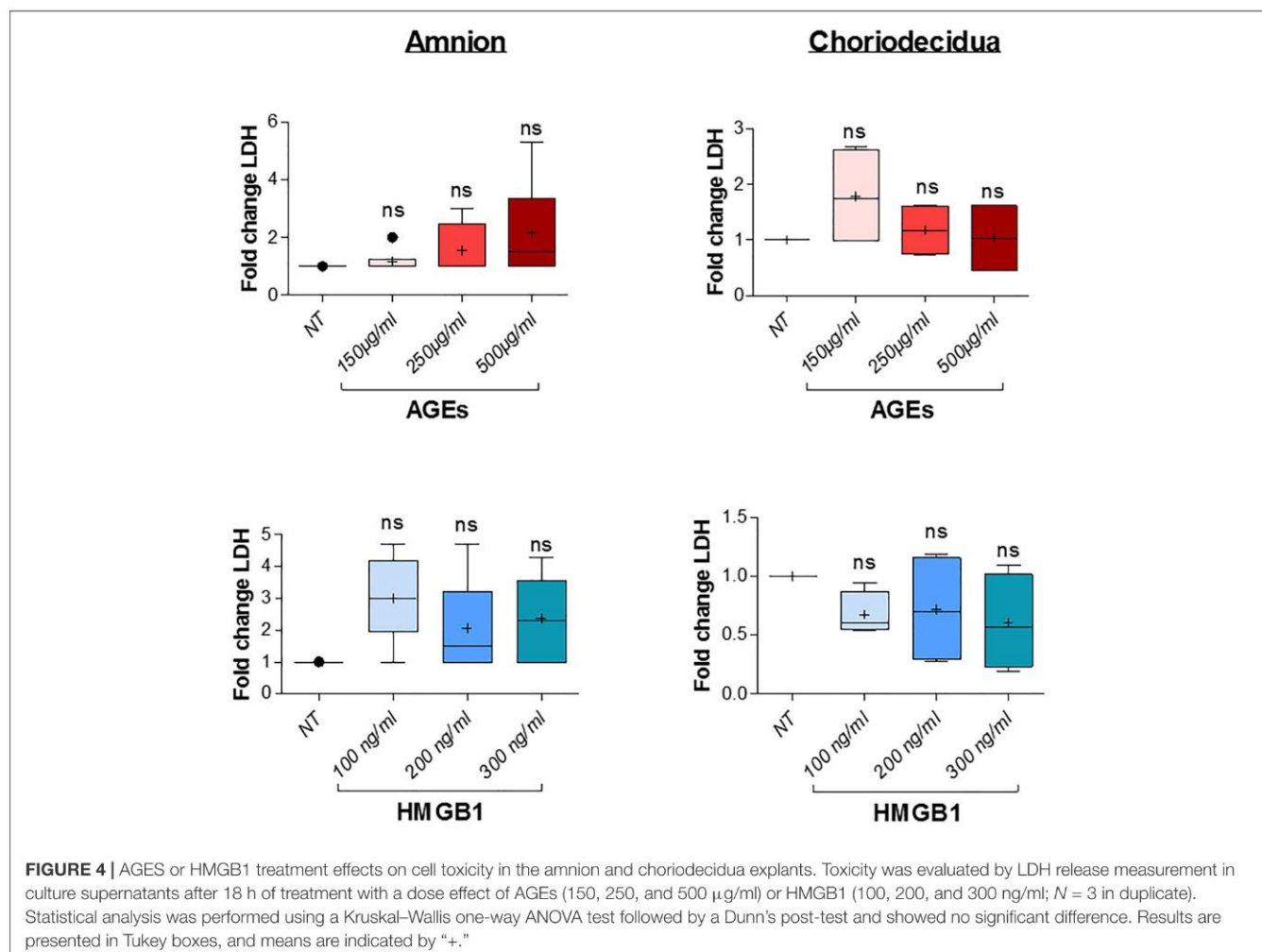
of treatment on both the amnion and choriodecidua. First, in the amnion (Figure 5, upper left panel), we observed that AGEs did not stimulate IL8 release, but increased TNF α in the same way for all concentrations (150, 250, and 500 $\mu\text{g/ml}$)

and IL1 β (more at 150 than 500 $\mu\text{g/ml}$). Finally, we found that AGEs also induced IL6 release at 150 $\mu\text{g/ml}$. For the choriodecidua (Figure 5, upper right panel), the same responses as the amnion were found for IL8 and TNF α , and IL1 β was



increased regardless of the dose (more with 500 $\mu\text{g/ml}$). By contrast, induction was not relevant for IL6 at any concentration. A second time, we demonstrated that HMGB1 (Figure 5,

lower panel) stimulated TNF α release in both tissues (at 200 and 300 ng/ml) and IL1 β at the same doses but only in the amnion. Any significant induction could be reported by



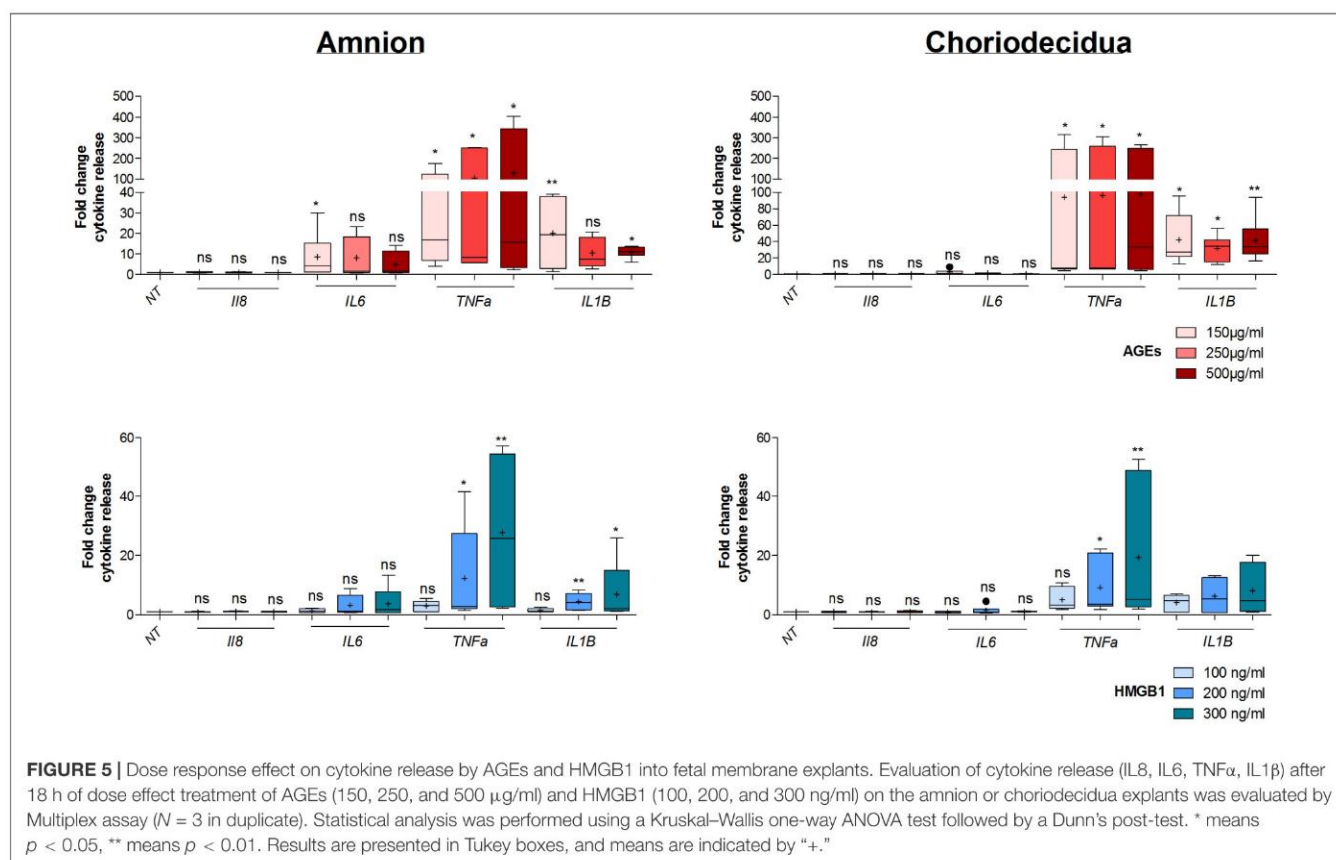
HMGB1 treatment for IL8 and IL6. Regarding our results, and in accordance with those already described in previous articles (Lappas et al., 2007; Plazyo et al., 2016), 500 µg/ml of AGEs and 200 ng/ml of HMGB1 were kept for the following SAGEs blocking experiments.

Does Blocking the RAGE Modulate the Inflammatory Response Induced by Alarmins in Fetal Membranes?

Finally, to investigate whether AGEs and HMGB1 alarmins induce a RAGE-dependent inflammatory response, we measured pro-inflammatory cytokine release in the amnion and choriodecidua co-treated with or without SAGEs (a RAGE inhibitor) for 18 h. Results demonstrated a significant lower TNF α release induction by AGEs (Figure 6, upper panel) and HMGB1 (Figure 6, lower panel) when the RAGE was inhibited by SAGEs in the amnion and choriodecidua. Plus, we noticed that AGEs and HMGB1 stimulated IL1 β secretion in both layers, but in the presence of SAGEs, this induction was not any more significant for HMGB1. Finally, we found no impact on either IL8 or IL6.

DISCUSSION

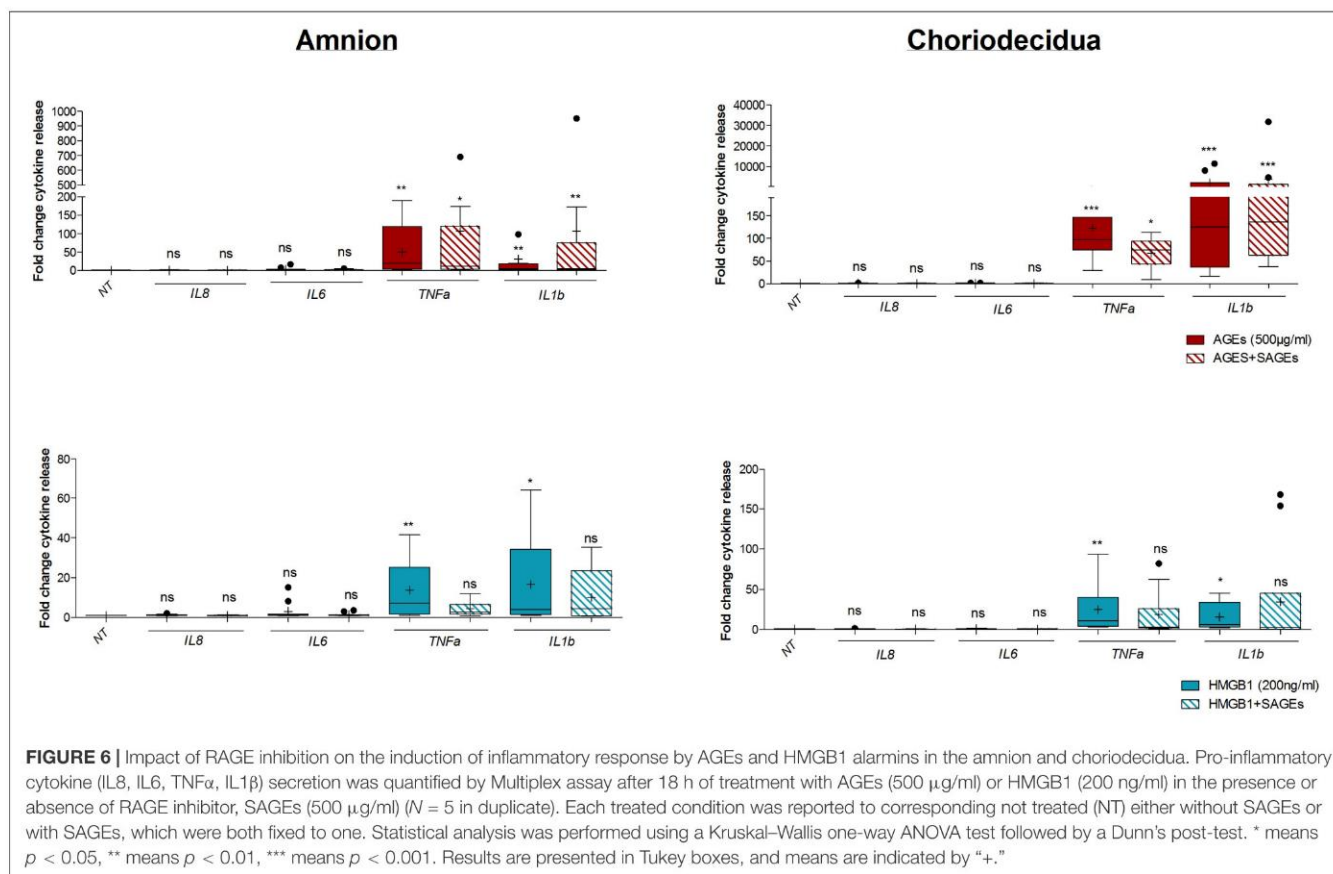
Since these last years, more and more studies have underlined the importance of sterile inflammation in the weakening of FMs as a key event of the ROM (hopefully after 37 weeks of gestation). It is now considered that AF is a source of specific molecules called alarmins (or DAMPs), which are endogenously expressed and produced when cells are suffering. For example, HMGB1 is normally a nuclear protein implicated in DNA repair, but when cells are in danger, HMGB1 is released and becomes an alarmin, triggering an inflammatory cascade. As another kind of DAMPs, AGEs are formed by the non-enzymatic Maillard reaction, between sugars and proteins, lipids, or nucleic acids (John and Lamb, 1993), and many inflammatory diseases are linked to an accumulation of these AGEs in tissues (Kang et al., 2012; Guedes-Martins et al., 2013; Wautier et al., 2014). Above all, both AGEs and HMGB1 have been described as activating inflammatory response in gestational tissues (placenta, FMs, umbilical cord) and were found to be increased in cases of pPROM. Indeed, HMGB1 has been found to be more elevated in the AF due to a release caused by damaged FMs occurring during intra-amniotic inflammation found during preterm birth



(Bredeson et al., 2014; Baumbusch et al., 2016). This could be an exacerbation of inflammatory processes mediated by HMGB1, a major player in labor events (Stephen et al., 2015). In addition, AGEs levels in maternal plasma were described as more important during the first trimester for pregnancies with preterm labor or pPROM (Kansu-Celik et al., 2019). However, there is still a lack of knowledge about which receptor recognizes these alarmins and causes inflammation in the FMs. Some studies have described an overexpression of the RAGE in the placenta and maternal serum in cases of pPROM and also a progressive increase of the soluble isoform of RAGE (sRAGE), acting as a decoy, during pregnancy and then finally decreasing at term (Romero et al., 2008; Yan et al., 2018). Moreover, plasmatic sRAGE levels were found to be lower in patients with pPROM, suggesting an over-activation of the RAGE pathway (Hájek et al., 2008). In this way, our work aimed to enlighten the implication of the RAGE in sterile inflammation in FMs.

The expression of the RAGE in FMs has already been described at term but had not been described during the different trimesters of pregnancy. Presently, we conducted a global exploration of the RAGE axis in both FMs layers (amnion and choriodecidua). First, we proved that FMs not only expressed the RAGE and HMGB1 during all three trimesters of pregnancy, but it also expressed Diaphanous-1 and Myd88, two intracellular adaptors required for inflammatory activity of the RAGE. After that, we observed the presence of the RAGE protein in the amniotic epithelium, the layer directly exposed to AF alarmins

and also in all choriodecidua. Thus, we found a differential RNA and protein expression between not only the amnion and choriodecidua and also between the ZAM and the rest of the FMs, the ZIM. Indeed, we showed the overexpression of the RAGE in the amnion compared to the choriodecidua and, above all, in the ZAM compared to the ZIM. These findings strengthen the idea of RAGE participation and importance in the ROM process as previously suggested (Rzepka et al., 2015). Plus, we demonstrated HMGB1 levels to be more important in the amnion. This was not very surprising; indeed, literature already described an increase in sterile inflammation linked with HMGB1 on the fetal side of the FMs, more precisely, in the amnion epithelial cells (Romero et al., 2011). But our work brings the first data on RAGE adaptors in fetal membranes and this is not negligible. In fact, it is currently well known that the RAGE is deficient in intrinsic tyrosine kinase activity and requires intracellular adaptors to induce cell signaling cascades. In this way, a yeast-two-hybrid experiment was achieved and identified a binding partner of RAGE cytosolic domain, the protein Diaphanous-1. Meanwhile, there is no proof that Diaphanous-1 is required for all RAGE induced-transduction cascades; however, some studies reported its implication in protein/signal pathway stimulation triggered by RAGE ligands (Xu et al., 2010; Touré et al., 2012). Hudson et al. (2008) also demonstrated that downregulation of Diaphanous-1 expression by RNA interference inhibited RAGE-mediated activation of Rac-1 and Cdc42 and, in parallel, RAGE ligand-stimulated inflammatory, vascular, and cell migration



responses. Diaphanous-1 aside, the RAGE owns other adaptor proteins, such as TIRAP or MyD88, shared with the toll-like receptors TLR2 and TLR4. The Sakaguchi group revealed that ligand binding leads to phosphorylation of the RAGE cytoplasmic domain by protein kinase C ζ (pSer391), promoting TIRAP and MyD88 interaction. Furthermore, blocking TIRAP and MyD88 considerably abolished ligand-activated RAGE inflammatory signaling (Akt, p38 MAP kinase, NF κ B) (Sakaguchi et al., 2011). In our study, we demonstrated an overexpression of Diaphanous-1 in the amnion, unlike Myd88, which was found to be expressed more in the choriodecidua. These data may suggest a layer-specific signaling couple, RAGE/Diaphanous-1 in the amnion and RAGE/Myd88 in the choriodecidua. Additionally, considering that RAGE and TLR2/4 partly share an intracellular signaling pathway, including MyD88 binding, we could suppose cooperation between RAGE and TLRs in immune response in choriodecidua, explaining why MyD88 was overexpressed in this layer, closer to the genito-urinary microbiota. Indeed, fetal membranes are already known to respond to different types of bacteria by modifications of TLR expression patterns (Abrahams et al., 2013).

As previously stated, AGEs or HMGB1 have been described as inducing cytokine release (IL6, IL8, TNF α , IL1 β) in the FMs but without making a distinction between both layers. To investigate a possible differential response to ligands between the amnion and choriodecidua, we decided to perform our treatments with

a dissociation of these two sheets using either AGEs or HMGB1. First, we confirmed results from previous studies with TNF α and IL1 β release in response to AGEs and HMGB1 in both the amnion and choriodecidua (Lappas et al., 2007; Bredeson et al., 2014; Plazyo et al., 2016). In addition to such results, we did not find the same results for IL8 and IL6 with their release not being stimulated by any dose except for IL6 in the amnion by AGEs at 150 μ g/ml. This contrast with previous results can be explained by the use of different concentrations of alarmins. For example, the Lappas group used concentrations of 1 mg/ml of AGEs, and those used for HMGB1 were between 10 ng and 50 μ g/ml for Plazyo and colleagues and 1 and 50 ng/ml by the Bredeson team. Then, in our study, for IL6 release, we dissociated layers and could, therefore, hypothesize that only the amnion produces such interleukin in response to AGEs or to HMGB1.

Finally, the major finding of this study was that RAGE inhibition by SAGEs decreased or aborted the TNF α release for both alarmins, indicating that RAGE is required for FMs to initiate this cytokine production. However, contrary to choriodecidua, in amnion, it seems RAGE is not the only actor needed in TNF α release induction because the induction was diminished and not aborted. Globally, this result is of primary importance, as TNF α could activate NF κ B complex and the production of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which is described to be the critical intermediate for FMs weakening by the intervention of specific

proteases (Kumar et al., 2014). The release of IL1 β was only inhibited by SAGEs when tissues were treated by HMGB1 and not by AGEs. Considered together, the results obtained in our work proved for the first time that the RAGE is directly implied in the inflammatory response in human FMs in a ligand and layer-dependent manner.

Our study constitutes the direct evidence of RAGE action in FMs weakening, which is an essential process for the ROM, adding a feature of the pathophysiological partition of the RAGE in the story of childbirth. Further studies are required to elucidate which intracellular pathway, among NF κ B and MAPK kinases, for example, leads to this RAGE-dependent cytokine release in FMs, but also which cellular type inside the amnion or choriondecidua has the ability to react to the presence of alarmins.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

The Institutional Local Ethics Committee, structure of the University Hospital of Clermont-Ferrand (specialized for Human

clinical questions) approved this study and the research protocol. Healthy fetal membranes were collected after receiving oral informed consent (according to the French law named “Huriet-n°88–1138” which considers placenta and fetal membranes as chiralurgical wastes) from the patients in the “Centre Hospitalier Universitaire Estaing” (Clermont-Ferrand, France).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HC designed and performed the experiments, and wrote the manuscript. ML and CB helped HC to carry out some experiments. JD helped with Multiplex assays. RM-Q performed lactate dehydrogenase assays. DG allowed HC to obtain human fetal membranes from patients in the Centre Hospitalier Universitaire Estaing (Clermont-Ferrand, France). VS and LB supervised the project.

FUNDING

HC was supported by a French ministerial grant. ML was supported by Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes and the Région Auvergne Rhône-Alpes.

REFERENCES

- Abrahams, V. M., Potter, J. A., Bhat, G., Peltier, M. R., Saade, G., and Menon, R. (2013). Bacterial modulation of human fetal membrane toll-like receptor expression. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69, 33–40. doi: 10.1111/aji.12016
- Baumbusch, M. A., Buhimschi, C. S., Oliver, E. A., Zhao, G., Thung, S., Rood, K., et al. (2016). 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* 81, 82–87. doi: 10.1016/j.cyt.2016.02.013
- Bouvier, D., Forest, J.-C., Blanchon, L., Bujold, E., Pereira, B., Bernard, N., et al. (2019). Risk factors and outcomes of preterm premature rupture of membranes in a cohort of 6968 pregnant women prospectively recruited. *J. Clin. Med.* 8:1987. doi: 10.3390/jcm8111987
- Bredeson, S., Papaconstantinou, J., Deford, J. H., Kechichian, T., Syed, T. A., Saade, G. R., et al. (2014). HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS One* 9:e113799. doi: 10.1371/journal.pone.0113799
- Brett, J., Schmidt, A. M., Yan, S. D., Zou, Y. S., Weidman, E., Pinsky, D., et al. (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am. J. Pathol.* 143, 1699–1712.
- Brien, M.-E., Baker, B., Duval, C., Gaudreault, V., Jones, R. L., and Girard, S. (2019). Alarmins at the maternal-fetal interface: involvement of inflammation in placental dysfunction and pregnancy complications 1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97, 206–212. doi: 10.1139/cjpp-2018-0363
- Buhimschi, I. A., Jabr, M., Buhimschi, C. S., Petkova, A. P., Weiner, C. P., and Saed, G. M. (2004). 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. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 1678–1687. doi: 10.1016/j.ajog.2004.03.081
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- England, M., Benjamin, A., and Abenheim, H. (2013). Increased risk of preterm premature rupture of membranes at early gestational ages among maternal cigarette smokers. *Am. J. Perinatol.* 30, 821–826. doi: 10.1055/s-0032-1333408
- Fujimoto, T., Parry, S., Urbaneck, M., Sammel, M., Macones, G., Kuivaniemi, H., et al. (2002). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J. Biol. Chem.* 277, 6296–6302. doi: 10.1074/jbc.M107865200
- Gilda, J. E., and Gomes, A. V. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Anal. Biochem.* 440, 186–188. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.027
- Girard, S., Heazell, A. E. P., Derricott, H., Allan, S. M., Sibley, C. P., Abrahams, V. M., et al. (2014). Circulating cytokines and alarmins associated with placental inflammation in high-risk pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 422–434. doi: 10.1111/aji.12274
- Guedes-Martins, L., Matos, L., Soares, A., Silva, E., and Almeida, H. (2013). AGEs, contributors to placental bed vascular changes leading to preeclampsia. *Free Radic. Res.* 47, 70–80. doi: 10.3109/10715762.2013.815347
- Hájek, Z., Germanová, A., Koucká, M., Zima, T., Kopecká, P., Vitkova, M., et al. (2008). Detection of fetomaternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study. *J. Perinat. Med.* 36, 399–404. doi: 10.1515/JPM.2008.080
- Holmlund, U., Wähämaa, H., Bachmayer, N., Bremme, K., Sverremark-Ekström, E., and Palmblad, K. (2007). The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology* 122, 430–437. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02662.x
- Hudson, B. I., Kalea, A. Z., Del Mar Arriero, M., Harja, E., Boulanger, E., D’Agati, V., et al. (2008). Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* 283, 34457–34468. doi: 10.1074/jbc.M801465200
- Hudson, B. I., and Lippman, M. E. (2018). Targeting RAGE signaling in inflammatory disease. *Annu. Rev. Med.* 69, 349–364. doi: 10.1146/annurev-med-041316-085215
- Jakobsen, T. R., Clausen, F. B., Rode, L., Dziegiel, M. H., and Tabor, A. (2012). High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat. Diagn.* 32, 840–845. doi: 10.1002/pd.3917
- John, W. G., and Lamb, E. J. (1993). The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye* 7(Pt 2), 230–237. doi: 10.1038/eye.1993.55
- Kang, R., Tang, D., Lotze, M. T., and Zeh, H. J. III (2012). AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics

- through the IL6-pSTAT3 pathway. *Autophagy* 8, 989–991. doi: 10.4161/aut.20258
- Kansu-Celik, H., Tasci, Y., Karakaya, B. K., Cinar, M., Candar, T., and Caglar, G. S. (2019). Maternal serum advanced glycation end products level as an early marker for predicting preterm labor/PPROM: a prospective preliminary study. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 32, 2758–2762. doi: 10.1080/14767058.2018.1449202
- Kierdorf, K., and Fritz, G. (2013). RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J. Leukocyte Biol.* 94, 55–68. doi: 10.1189/jlb.1012519
- King, A. E., Paltoo, A., Kelly, R. W., Sallenave, J.-M., Bocking, A. D., and Challis, J. R. G. (2007). Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 28, 161–169. doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.006
- Kumar, D., Moore, R. M., Nash, A., Springel, E., Mercer, B. M., Philipson, E., et al. (2014). Decidual GM-CSF is a critical common intermediate necessary for thrombin and TNF induced in-vitro fetal membrane weakening. *Placenta* 35, 1049–1056. doi: 10.1016/j.placenta.2014.10.001
- Lappas, M., Permezel, M., and Rice, G. E. (2007). Advanced glycation endproducts mediate pro-inflammatory actions in human gestational tissues via nuclear factor- B and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J. Endocrinol.* 193, 269–277. doi: 10.1677/JOE-06-0081
- Lorthe, E. (2018). Épidémiologie, facteurs de risque et pronostic de l'enfant. RPC: rupture prématurée des membranes avant terme CNGOF. *Gynéc. Obstét. Fertil. Sénol.* 46, 1004–1021. doi: 10.1016/j.gofs.2018.10.019
- Menon, R. (2016). Human fetal membranes at term: dead tissue or signalers of parturition? *Placenta* 44, 1–5. doi: 10.1016/j.placenta.2016.05.013
- Menon, R., and Moore, J. J. (2020). Fetal membranes, not a mere appendage of the placenta, but a critical part of the fetal-maternal interface controlling parturition. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 47, 147–162. doi: 10.1016/j.ogc.2019.10.004
- Menon, R., and Richardson, L. S. (2017). Preterm prelabor rupture of the membranes: a disease of the fetal membranes. *Semin. Perinatol.* 41, 409–419. doi: 10.1053/j.semperi.2017.07.012
- Menon, R., Richardson, L. S., and Lappas, M. (2019). Fetal membrane architecture, aging and inflammation in pregnancy and parturition. *Placenta* 79, 40–45. doi: 10.1016/j.placenta.2018.11.003
- Moore, R. M., Mansour, J. M., Redline, R. W., Mercer, B. M., and Moore, J. J. (2006). The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 27, 1037–1051. doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.002
- Nadeau-Vallée, M., Obari, D., Palacios, J., Brien, M., Duval, C., Chemtob, S., et al. (2016). Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction* 152, R277–R292. doi: 10.1530/REP-16-0453
- Naeye, R. L., and Peters, E. C. (1980). Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. *Lancet* 1, 192–194. doi: 10.1016/s0140-6736(80)90674-1
- Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., et al. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 14998–15004.
- Parry, S., and Strauss, J. F. (1998). Premature rupture of the fetal membranes. *New Engl. J. Med.* 338, 663–670. doi: 10.1056/NEJM199803053381006
- Plazyo, O., Romero, R., Unkel, R., Balancio, A., Mial, T. N., Xu, Y., et al. (2016). HMGB1 induces an inflammatory response in the chorioamniotic membranes that is partially mediated by the inflammasome. *Biol. Reprod.* 95, 130–130. doi: 10.1095/biolreprod.116.144139
- Prat, C., Blanchon, L., Borel, V., Gallot, D., Herbet, A., Bouvier, D., et al. (2012). Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biol. Reprod.* 86:48. doi: 10.1095/biolreprod.111.095448
- Ray, R., Juranek, J. K., and Rai, V. (2016). RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 62, 48–55. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.12.006
- Romero, R., Chaiworapongsa, T., Savasan, Z. A., Xu, Y., Hussein, Y., Dong, Z., et al. (2011). 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.* 24, 1444–1455. doi: 10.3109/14767058.2011.591460
- Romero, R., Espinoza, J., Hassan, S., Gotsch, F., Kusanovic, J. P., Avila, C., et al. (2008). Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *J. Perinat. Med.* 36, 388–398. doi: 10.1515/JPM.2008.076
- Romero, R., Espinoza, J., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Hassan, S., Erez, O., et al. (2006). The preterm parturition syndrome. *BJOG* 113(Suppl. 3), 17–42. doi: 10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x
- Romero, R., Miranda, J., Chaemsaitong, P., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., Dong, Z., et al. (2015). Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 28, 1394–1409. doi: 10.3109/14767058.2014.958463
- Romero, R., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., Korzeniewski, S. J., Chaemsaitong, P., Gotsch, F., et al. (2014). Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 458–474. doi: 10.1111/aji.12296
- Rzepka, R., Dolegowska, B., Rajewska, A., Kwiatkowski, S., Sałata, D., Budkowska, M., et al. (2015). Soluble and endogenous secretory receptors for advanced glycation end products in threatened preterm labor and preterm premature rupture of fetal membranes. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–10. doi: 10.1155/2015/568042
- Sakaguchi, M., Murata, H., Yamamoto, K., Ono, T., Sakaguchi, Y., Motoyama, A., et al. (2011). TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One* 6:e23132. doi: 10.1371/journal.pone.0023132
- Schreiber, J., and Benedetti, T. (1980). Conservative management of preterm premature rupture of the fetal membranes in a low socioeconomic population. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 136, 92–96. doi: 10.1016/0002-9378(80)90572-4
- Shiqiao, H., Bei, X., Yudi, G., and Lei, J. (2019). Assisted reproductive technology is associated with premature rupture of membranes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* doi: 10.1080/14767058.2019.1610738 [Epub ahead of print].
- Silverman, R. K., and Wojtowycz, M. (1998). Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim. Care Update OB GYNS* 5:181. doi: 10.1016/s1068-607x(98)00092-4
- Stephen, G. L., Lui, S., Hamilton, S. A., Tower, C. L., Harris, L. K., Stevens, A., et al. (2015). Transcriptomic profiling of human choriondecidua during term labor: inflammation as a key driver of labor. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73, 36–55. doi: 10.1111/aji.12328
- Taglauer, E. S., Wilkins-Haug, L., and Bianchi, D. W. (2014). Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 35(Suppl.), S64–S68. doi: 10.1016/j.placenta.2013.11.014
- Touré, F., Fritz, G., Li, Q., Rai, V., Daffu, G., Zou, Y. S., et al. (2012). The formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative & signal transduction pathways. *Circ. Res.* 110, 1279–1293. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262519
- Wautier, M.-P., Tessier, F. J., and Wautier, J.-L. (2014). [Advanced glycation end products: a risk factor for human health]. *Ann. Pharm. Fr.* 72, 400–408. doi: 10.1016/j.pharma.2014.05.002
- Xu, Y., Toure, F., Qu, W., Lin, L., Song, F., Shen, X., et al. (2010). Advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages. *J. Biol. Chem.* 285, 23233–23240. doi: 10.1074/jbc.M110.117457
- Yan, H., Zhu, L., Zhang, Z., Li, H., Li, P., Wang, Y., et al. (2018). HMGB1-RAGE signaling pathway in pPROM. *Taiwanese J. Obstet. Gynecol.* 57, 211–216. doi: 10.1016/j.tjog.2018.02.008
- Zhang, J., Xu, X., Rao, N. V., Argyle, B., McCoard, L., Rusho, W. J., et al. (2011). Novel sulfated polysaccharides disrupt cathelicidins, inhibit RAGE and reduce cutaneous inflammation in a mouse model of rosacea. *PLoS One* 6:e16658. doi: 10.1371/journal.pone.0016658

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Choltus, Lavergne, Belville, Gallot, Minet-Quinard, Durif, Blanchon and Sapin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. ACTIVATION DE RAGE DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE : TABAGISME

MATERNEL

Les pages suivantes permettent de présenter les résultats concernant l'étude de l'activation de RAGE dans un contexte pathologique de rupture des membranes modélisé par le tabagisme. Il est ici nécessaire d'aborder quelques points bibliographiques afin de justifier notre choix du tabagisme.

Tout d'abord, il faut savoir que le nombre de fumeurs s'élève environ à 1,3 milliard de personnes dans le monde et il est prévu que ce taux continue d'augmenter et donc avec lui le nombre de fumeurs passifs (OMS, Mai 2020). Pourtant, le tabagisme est un des facteurs de risques primordiaux à l'origine d'une multitude de pathologies comme des maladies respiratoires (maladie pulmonaire obstructive chronique), les cancers (poumons, œsophage, larynx, ...) ou les troubles cardiovasculaires. De manière globale, le tabac engendre au total 8 millions de décès par an dont 1,2 million sont la conséquence d'un tabagisme passif (exposition involontaire et/ou par les proches). Le coût annuel de ce seul polluant est approximativement de 500 milliards de dollars pour les systèmes de santé (Ekpu & Brown, 2015).

Concernant la grossesse, il est considéré que 15-20% des femmes enceintes sont fumeuses alors que le tabac engendre aussi bien des atteintes développementales du fœtus (défauts congénitaux, retard de croissance intra-utérin, faible poids de naissance, RPM et naissance prématurée) que des pathologies maternelles de la grossesse telles que la pré-éclampsie (Lewis *et al*, 2017a; Wrześniak *et al*, 2016; Witt *et al*, 2018; Rogers, 2009; Günther *et al*, 2020). Les effets néfastes du tabagisme maternel empruntent divers mécanismes, que ce soit direct à travers un transfert placentaire ou indirect en affectant les tissus gestationnels (placenta, membranes fœtales, artère ombilicale). Plus de 4000 substances chimiques sont contenues dans le tabac telles que la nicotine, le monoxyde de carbone (CO), du goudron, du benzène ou encore des métaux lourds (plomb, cadmium) (Shea & Steiner, 2008).

Or, nombreuses sont les substances traversant le placenta. En effet toute molécule au caractère lipophile a la capacité de franchir les membranes biologiques. Ainsi, il existe de forts

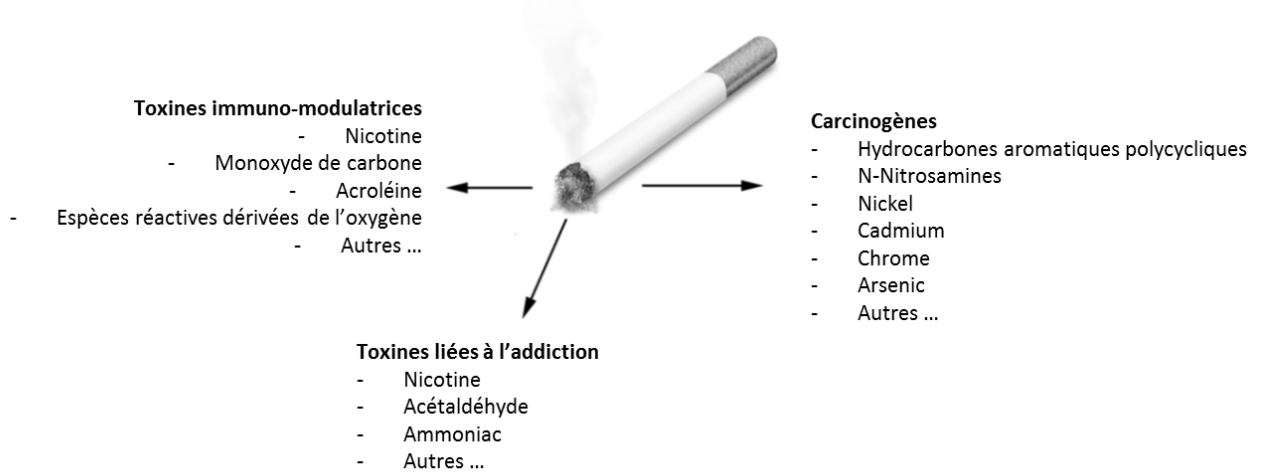


Figure 30 : Illustration des composés toxiques contenus dans la cigarette

Il est bien connu que la cigarette contient de nombreuses substances chimiques. Ce schéma en rapporte une partie reconnue comme toxiques, certaines identifiées comme cancérigènes, d'autres pro-inflammatoires ou liées à l'effet d'addiction.

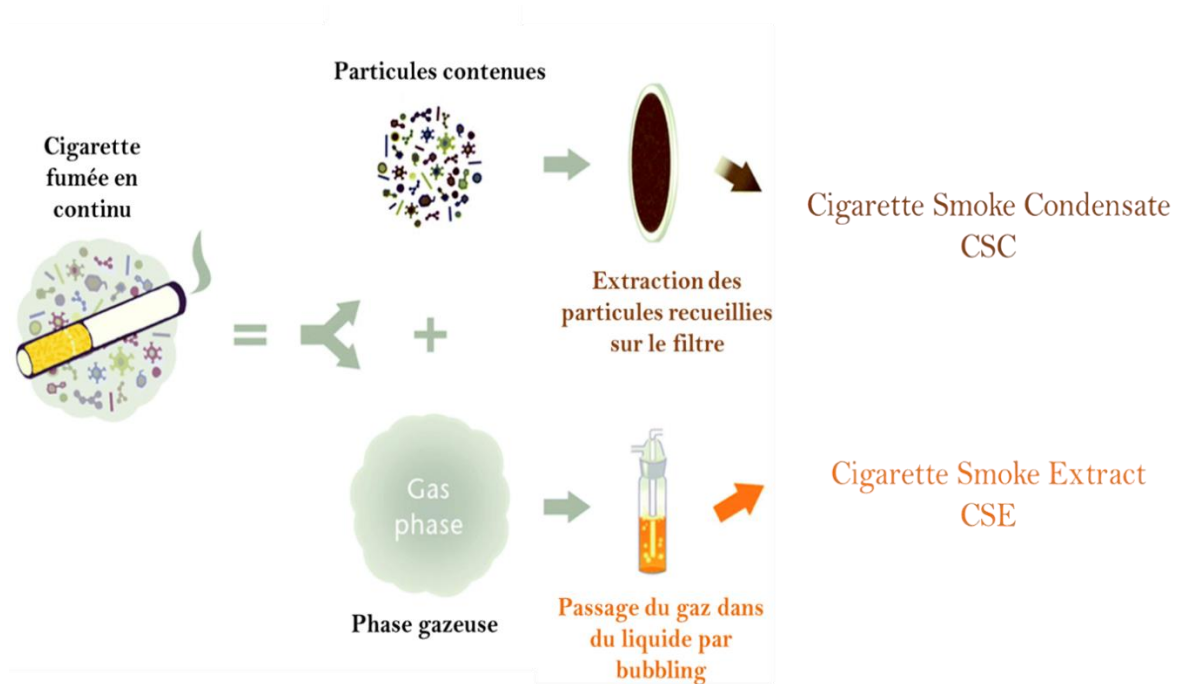


Figure 31 : CSC et CSE, deux produits pour modéliser l'effet du tabagisme

Le « Cigarette Smoke Condensate » (CSC) et le « Cigarette Smoke Extract » (CSE) sont deux alternatives de traitement possibles pour étudier l'effet du tabagisme *in vitro*. Des cigarettes de référence sont fumées en continu à l'aide d'une pompe à vide, le passage de la phase gazeuse dans du liquide permet d'obtenir du CSE, alors que l'extraction des particules contenues dans le filtre permet l'obtention de CSC plus proche de la réalité d'une exposition tabagique (Ticha & Wright, 2016).

phénomènes de concentration de la substance au sein du LA, espace où leur biodisponibilité est importante puisque la concentration protéique amniotique est faible. Par exemple, la nicotine et le CO sont capables d'engendrer une vasoconstriction au niveau placentaire mais aussi de traverser la barrière placentaire et de pénétrer les tissus fœtaux grâce à sa solubilité lipidique. Les mesures des taux de nicotine au sein du LA révèlent que le fœtus se retrouve exposé à des concentrations plus fortes que la mère fumeuse (Luck *et al*, 1985). Parmi les autres composés, une grande partie est connue pour générer des états inflammatoires (**Figure 30**) (Lee *et al*, 2012; Rogers, 2009). Par exemple, il a été établi que la combustion des composés du tabac provoque la formation d'AGEs capables de se lier à RAGE, récepteur dont l'implication a déjà été décrite dans l'apparition de pathologies identiques à celles engendrées par une exposition au tabac (maladies respiratoires, cancer, pathologies placentaires, ...) (van Waateringe *et al*, 2017). De plus, plusieurs travaux ont prouvé que l'exposition au tabac engendre dans divers tissus/types cellulaires (macrophages alvéolaires, cellules épithéliales pulmonaires, placenta, cellules gingivales, ...) une augmentation de l'expression de RAGE (Lewis *et al*, 2017a, 201; Reynolds *et al*, 2008; Sanders *et al*, 2017; Robinson *et al*, 2012; Chapman *et al*, 2017). Il apparaît donc d'un point de vue mécanistique, que RAGE et ses voies de transduction émergent comme une des cascades préférentielles empruntées par les dérivés du tabac pour déclencher des réponses néfastes au sein de divers tissus et organes. D'ores et déjà, plusieurs études ont commencé à clarifier le lien entre tabac, RAGE et inflammation notamment en utilisant un mimétique appelé CSE pour « Cigarette Smoke Extract ». Bien qu'étant à l'heure actuelle le plus utilisé pour étudier l'effet du tabagisme *in vitro* (particulièrement pour générer un stress oxydant) comme détaillé ci-dessous, il existe une autre méthode d'extraction permettant d'obtenir du CSC (« Cigarette Smoke Condensate ») (**Figure 31**). Ce second produit est plus proche de l'action réelle de l'exposition au tabac chez un fumeur « actif ou « passif ». Ainsi, Reynolds *et al* ont établi que le KO de RAGE en modèle murin ou l'inhibition de ce récepteur dans des cellules épithéliales pulmonaires annulait l'action pro-inflammatoire d'une exposition au CSE qui active normalement la voie NFκB et conduit à une sécrétion des cytokines IL-1β, ou CCL-5 (Reynolds *et al*, 2011). Le même mode d'action a aussi été retrouvé dans des cellules gingivales par Sanders *et al*, où un traitement au CSE induit la voie inflammatoire NFκB et la sécrétion des cytokines IL-1β et IL-6 dépendamment de RAGE (Sanders *et al*, 2017). Concernant la sphère placentaire, il a été démontré en modèle murin que l'inhibition de RAGE permet de prévenir le développement

de RCIU dépendant du tabac. En effet, cette étude établit qu'une exposition passive au tabac stimule les voies de signalisation MAPK p38, JNK, ERK1/2 et la sécrétion de TNF α , IL-1 β menant ainsi à une réaction inflammatoire au sein du placenta, réaction révélée comme RAGE-dépendante (Lewis *et al*, 2017b). A côté du RCIU touchant directement le développement fœtal, des données préliminaires ont permis de démontrer que la RPM était elle-aussi fortement corrélée à une consommation maternelle de tabac ou à une exposition passive de celle-ci (England *et al*, 2013; Bouvier *et al*, 2019). Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'impact négatif du tabac sur l'intégrité des MF restaient, là encore, à éclaircir. En regard de l'ensemble des études citées auparavant, établissant un lien entre RAGE et action inflammatoire délétère du tabac au sein de divers modèles, l'implication de RAGE dans la fragilisation physiopathologique des MF par la génération d'un environnement inflammatoire constitue le cœur de la deuxième partie de ce travail.

Publication N°2

Cigarette Smoke Condensate exposure induces RAGE-dependent sterile inflammation in amniotic epithelial cells

Hélène Choltus¹, Régine Minet-Quinard^{1,2}, Corinne Belville¹, Denis Gallot^{1,3}, Julie Durif², Loïc Blanchon¹, Vincent Sapin^{1,2}

¹ CNRS, INSERM, iGReD, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

² CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, Clermont-Ferrand, France

³ CHU de Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand, France

Accepted in International Journal of Molecular Sciences, August 2021



Article

Cigarette Smoke Condensate Exposure Induces Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE)-Dependent Sterile Inflammation in Amniotic Epithelial Cells

Helena Choltus ¹ , Régine Minet-Quinard ^{1,2}, Corinne Belville ¹, Julie Durif ², Denis Gallot ³, Loïc Blanchon ¹ and Vincent Sapin ^{1,2,*}

- ¹ CNRS, INSERM, GRéD, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France; helena.choltus@uca.fr (H.C.); rquinard@chu-clermontferrand.fr (R.M.-Q.); corinne.belville@uca.fr (C.B.); loic.blanchon@uca.fr (L.B.)
- ² CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, 63000 Clermont-Ferrand, France; j_durif@chu-clermontferrand.fr
- ³ CHU de Clermont-Ferrand, Obstetrics and Gynecology Department, 63000 Clermont-Ferrand, France; denis.gallot@uca.fr
- * Correspondence: vincent.sapin@uca.fr; Tel.: +33-4731-781-74



Citation: Choltus, H.; Minet-Quinard, R.; Belville, C.; Durif, J.; Gallot, D.; Blanchon, L.; Sapin, V. Cigarette Smoke Condensate Exposure Induces Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE)-Dependent Sterile Inflammation in Amniotic Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8345. <https://doi.org/10.3390/ijms22158345>

Academic Editor: Masashi Tanaka

Received: 1 July 2021

Accepted: 31 July 2021

Published: 3 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Maternal smoking is a risk factor of preterm prelabor rupture of the fetal membranes (pPROM), which is responsible for 30% of preterm births worldwide. Cigarettes induce oxidative stress and inflammation, mechanisms both implicated in fetal membranes (FM) weakening. We hypothesized that the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its ligands can result in cigarette-dependent inflammation. FM explants and amniotic epithelial cells (AECs) were treated with cigarette smoke condensate (CSC), combined or not with RAGE antagonist peptide (RAP), an inhibitor of RAGE. Cell suffering was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) medium-release. Extracellular HMGB1 (a RAGE ligand) release by amnion and choriodecidua explants were checked by western blot. NF- κ B pathway induction was determined by a luciferase gene reporter assay, and inflammation was evaluated by cytokine RT-qPCR and protein quantification. Gelatinase activity was assessed using a specific assay. CSC induced cell suffering and HMGB1 secretion only in the amnion, which is directly associated with a RAGE-dependent response. CSC also affected AECs by inducing inflammation (cytokine release and NF κ B activation) and gelatinase activity through RAGE engagement, which was linked to an increase in extracellular matrix degradation. This RAGE dependent CSC-induced inflammation associated with an increase of gelatinase activity could explain a pathological FM weakening directly linked to pPROM.

Keywords: maternal smoking; fetal membranes; RAGE; pPROM

1. Introduction

Worldwide, between 15 and 20% of pregnant women still smoke, even though smoking cigarettes is a well-known risk factor for preterm prelabor rupture of fetal membranes (pPROM). This obstetrical complication can lead to disaster for both the mother and her baby, such as chorioamnionitis or oligohydramnios, and it is responsible for 30% of preterm births [1–5]. How does maternal smoking induce pPROM? Current data support the hypothesis that pPROM is caused most often by the exacerbation of the same cellular and molecular mechanisms that lead to term rupture: apoptosis, oxidative stress, extracellular matrix degradation, senescence, and sterile inflammation. In vitro studies offer different possibilities for tabagism modelling. First, some studies use a specific component of cigarettes; for example, nicotine. A recent study highlighted the dose-dependent impact of nicotine on maternal and fetal inflammatory responses in pregnant rats [6]. Moreover, two products allow the testing of cigarette smoke's impact regarding its whole composition [7]. The first, which samples the water-soluble compounds, is cigarette

smoke extract (CSE), which is used primarily as an inducer of oxidative stress (OS) [8–13]. The second, cigarette smoke condensate (CSC), is obtained from a particular part of cigarette smoke. CSE has already shown that cigarette smoke induces OS, senescence, and apoptosis, and also activates a p38 MAPK inflammatory cell pathway in FM cells, mechanisms that are implicated in tissue weakening [9,13]. Bredeson et al. also demonstrated that CSE induces high-mobility group B1 (HMGB1) release, a protein that acts as an alarmin when it becomes extracellular and activates sterile inflammation [10]. Moreover, in vivo, CSE injections also induce senescence and inflammation (the release of interleukin in amniotic fluid) in mice [8]. CSC demonstrated that it can dysregulate gene expression (for example, those targeted by a retinoid pathway) in amniotic cells [14], but the available studies on CSC implications remain scarce.

To date, the signaling actors and pathways activated in these tissues by cigarette smoke exposure are poorly understood. Nevertheless, mounting evidence supports the role of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in inflammatory diseases associated with tabagism. Tobacco smoke has been shown to initiate the non-enzymatic Maillard reaction, leading to the formation of advanced glycation end-products (AGEs), which are one of the main ligands of RAGE. Moreover, cigarette smoke exposure has also been associated in vivo with the release or overexpression of HMGB1 or S100 proteins (A6, A9) in lungs [15–19]. Most of all, the abortion of RAGE activity in mice and humans has been described as being associated with a decrease of cigarette smoke-induced inflammation in different tissues. This is the case at the pulmonary level [20–22], in cardiovascular diseases [23], and for intrauterine growth restriction (IUGR) syndrome in the obstetrical sphere [24]. RAGE is a 50 kDa cell membrane receptor that is implicated in many cell responses, including inflammation from its interaction with alarmins (HMGB1 and AGEs). Following its engagement through ligand fixation, RAGE can activate many pro-inflammatory cell-signaling pathways, such as NF κ B or MAPK [25,26]. All previous data led to our hypothesis that cigarette smoking, modeled by CSC use and focusing on RAGE activation, induces FM weakening by increasing sterile inflammation.

2. Results

2.1. Cigarette-Smoke Condensate Induces a Danger Response in the Fetal Amnion and Its Cells

The impact of CSC treatment on cell toxicity was evaluated in FM explants (dissociated amnion and choriondecidua) by measuring LDH release in culture media (Figure 1A). Here, CSC provoked significant cell toxicity (ratio of 2.9) only in the amnion layer. Further, the release of the alarmin HMGB1 was investigated, and here again, we noted the induction of such a release only in the amnion layer (ratio of 6.6) but not in the choriondecidua layer (ratio of 0.9) (Figure 1B). Considering these results, further investigation of what happens in the amnion after CSC exposure was conducted by focusing on amniotic epithelial cells (AECs), which are in direct contact with the amniotic fluid that contains cigarette metabolites. Therefore, for the entire amnion layer, we demonstrated that CSC induced amniotic cell LDH release (ratio of 2.0) (Figure 1C) and provoked the nuclear toward cytosolic HMGB1 translocation. Indeed, whereas the control (DMSO, dimethylsulfoxide) exhibited classical HMGB1 nuclear localization, CSC-treated cells showed a cytosolic HMGB1 cloud, a key step in subsequent extracellular release (Figure 1D).

2.2. RAGE Axis Actors Are Expressed in Primary Amniotic Epithelial Cells (pAECs)

HMGB1 is a well-known ligand of RAGE, implicated both in pro-inflammatory processes. It was necessary to confirm the expression of RAGE axis actors, including RAGE itself, as well as three other proteins: TIR adaptor protein (TIRAP), Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), and Diaphanous-1. In fact, many studies have established that RAGE requires one of these intracellular adaptors to induce a cell signal [27–29]. As shown in Figure 2, the RT-PCR demonstrated the expression of RAGE and its three adaptors in pAECs (2A). Then, immunocytochemistry experiments (2B) confirmed the protein expression of these RAGE axis actors. Further, we can observe that RAGE is localized in the

nuclei and at the cell membrane of pAECs, in accordance with its functions as a membrane receptor and as a regulator of DNA repair [25,30].

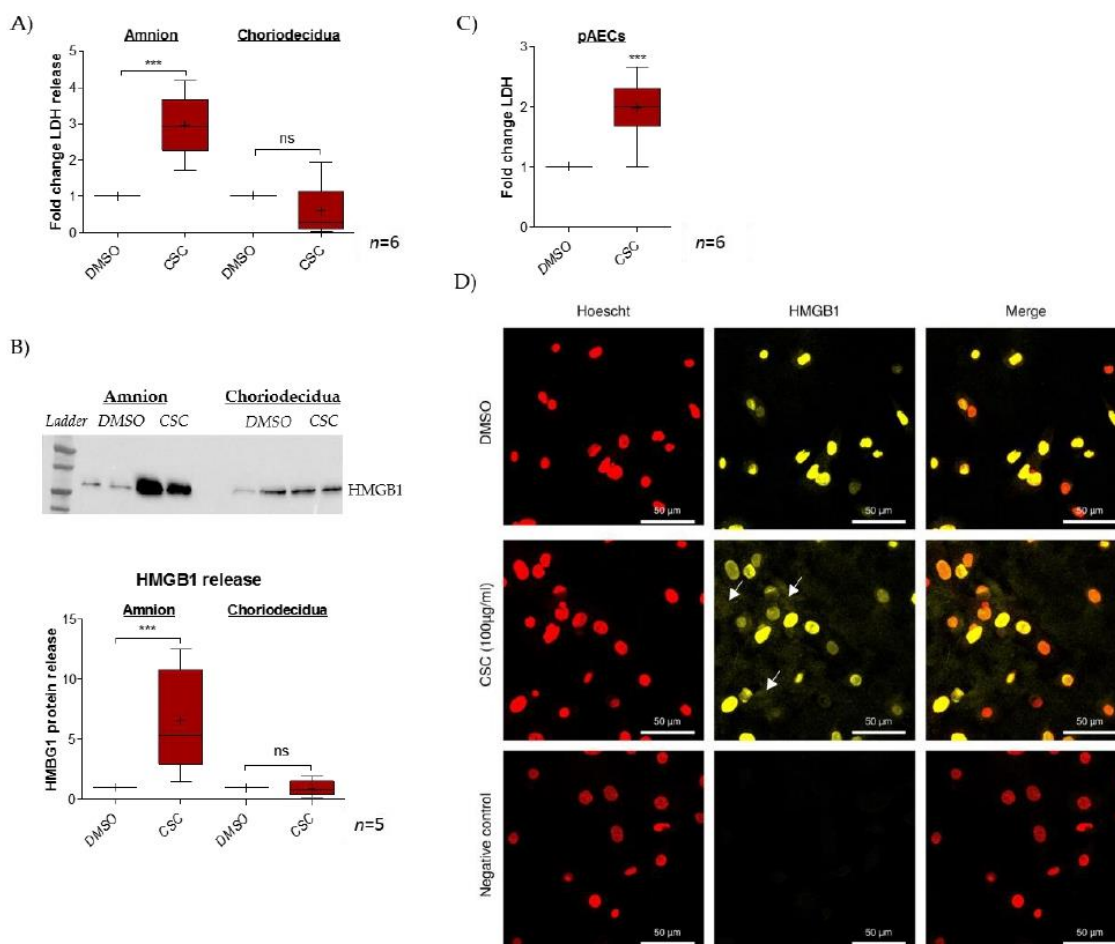


Figure 1. CSC treatment induces a cell danger response into amnion. (A) Cell toxicity was evaluated by measuring LDH release in a supernatant culture after a 24 h treatment with CSC in amnion and choriodecidua ($n = 6$). (B) HMGB1 release in a supernatant culture after a 48 h treatment with CSC was quantified by the western blot method in amnion and choriodecidua; the results are reported in the histogram ($n = 5$). (C) Toxicity was evaluated by LDH release measurement in primary amniocytes (pAECs) cell-culture supernatants after a 48 h treatment with CSC (100 µg/mL) ($n = 6$). (D) HMGB1 nuclear toward cytosolic translocation was investigated by immunocytochemistry on pAECs after 7 h treatment with CSC (yellow staining; Alexa488). Nuclei were counterstained with Hoechst (red). Scales bars: 50 µm (magnification $\times 200$). Negative control was realized without primary antibody hybridization. White arrows indicate the cytosolic cloud of HMGB1. Comparison with the control (DMSO) was realized by a Mann-Whitney t -test. *** means $p < 0.001$, and “ns” means “not significant”. Results are presented in Tukey boxes; means are indicated by “+”.

2.3. Cigarette Smoke Condensate Induces RAGE Signaling Cascade in pAECs

The pAECs were treated for 48 h with either only CSC or with a RAGE competitive inhibitor, RAP. RT-qPCR was performed on pAECs to quantify RAGE axis members' expression. The results revealed no impact on RAGE, Dia-1, or TIRAP expression. However, CSC significantly increased the Myd88 transcription level (ratio of 1.6), and this augmentation was lower in the case of co-treatment with RAP (ratio of 1.3) (Figure 3A). Yet, the NF κ B luciferase reporter assay demonstrated that pAECs exposed to CSC activated the pro-inflammatory NF κ B cell signaling (ratio of 2.4), which was aborted in the presence of

RAP (ratio of 1.7) (Figure 3B). Furthermore, the immunofluorescence of p65 NF κ B protein supported the idea that CSC activates this pathway by passing through the RAGE receptor. As described in the literature, control cells exhibited p65 localization mainly in cytosol (a cell compartment where p65 is mainly sequestered when there is no activation). Linked to the signal transduction by RAGE (blocked by RAP), the CSC treatment affected this localization with an addressing of p65 from the cytosol to the perinuclei/nuclei, which attests NF κ B activation (Figure 3C).

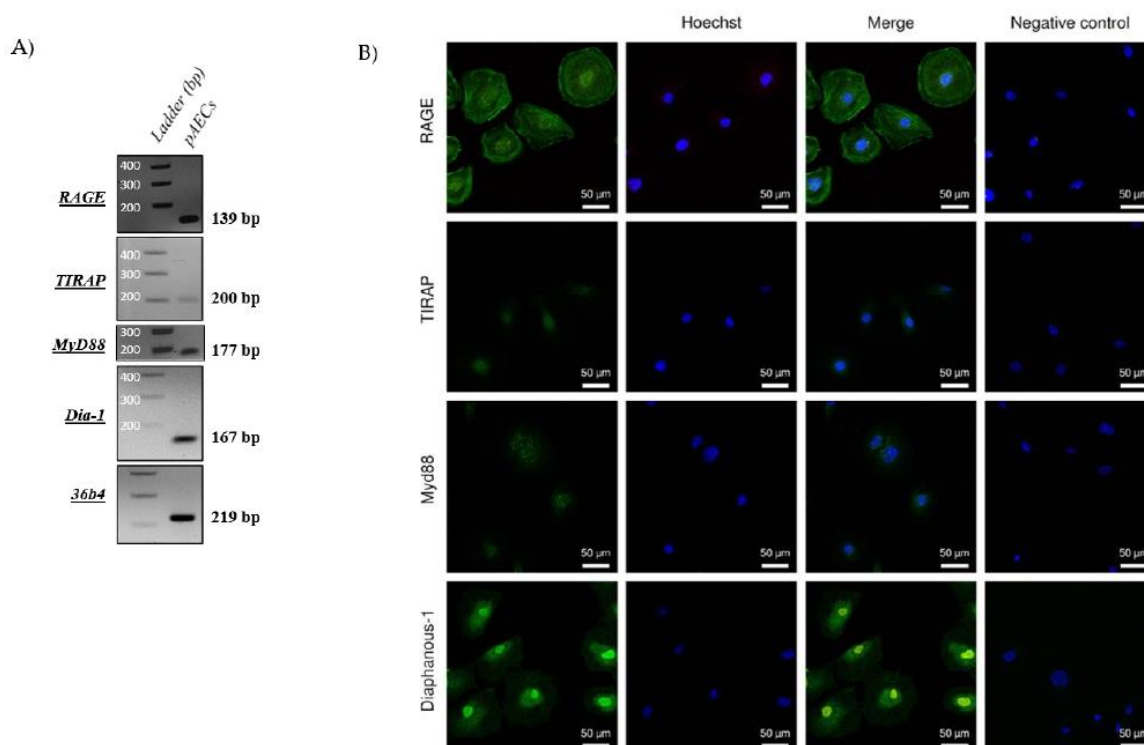


Figure 2. Amniotic epithelial cells expressed a functional RAGE axis. (A) RNA expressions of RAGE, TIRAP, Myd88, and Diaphanous-1 were detected by RT-PCR in pAECs. Negative controls were performed in the absence of a cDNA template. (B) The RAGE receptor and its adaptors, Diaphanous-1, MyD88, and TIRAP (green staining, Alexa488), were detected by immunocytochemistry on primary amniocytes (pAECs). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Scale bars: 50 μ m (magnification \times 200). Negative control was realized without primary antibody hybridization.

2.4. Cigarette Smoke Condensate Induces Pro-Inflammatory Response in pAECs

As CSC engages the RAGE pathway, one of the most well-known consequences of RAGE activation to study is the increasing production of pro-inflammatory mediators, such as cytokines. In fact, transcription quantification of pro-inflammatory cytokines demonstrated a significant fold change induction of IL1 β (ratio of 10.13), IL8 (ratio of 904.3), and IL6 (ratio of 291.10³), but not TNF α (data not shown), after CSC treatment. Above all, RAGE inhibition by RAP led to an abortion of IL8 induction (ratio of 45.1) and a smaller increase of IL6 expression (ratio of 142.10³), but it had no impact on the IL1 β fold change (ratio of 13.33) (Figure 4A). The cytokines released by pAECs were investigated after 48 or 72 h of CSC treatment, using ELLA assays (Figure 4B). First, we observed that CSC provoked a release of IL1 β (ratio of 2.0 at 48 h), IL8 (ratio of 4.3 at 48 h and 13.6 at 72 h), and IL6 (ratio of 2.7 at 72 h). Second, these results confirmed the inhibitory effect of RAP on CSC inflammatory action (as obtained before) for IL8 (ratio of 6.1) and IL6 (ratio of 1.6) release at 72 h, but also for IL1 β at 48 h (ratio of 1.8).

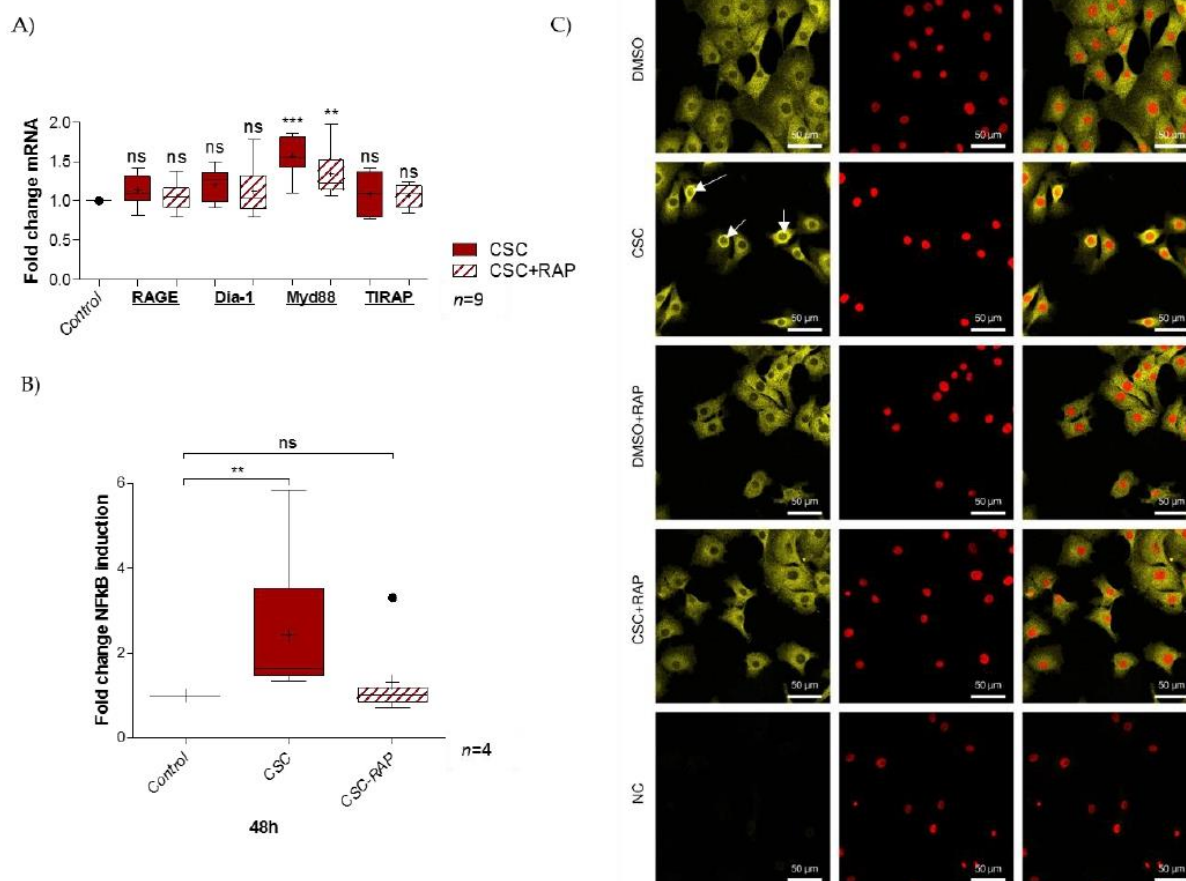


Figure 3. Activation of RAGE axis by CSC-response in pAECs. (A) Quantification of RAGE and its signaling adaptors (Diaphanous-1, Myd88, and TIRAP) transcription by RT-qPCR following 48 h of CSC (100 µg/mL) +/− RAP (12.7 µg/mL) treatment of pAECs ($n = 7$). (B) NFκB luciferase reporter assay was performed after 48 h of CSC treatment (100 µg/mL), whether combined or not with RAP (12.7 µg/mL) ($n = 4$). (C) p65-NFκB relocalization was investigated by immunocytochemistry on pAECs, whether treated or not with CSC for 48 h (yellow staining; Alexa488). Nuclei were counterstained with Hoechst (red). Scales bars: 50 µm (magnification $\times 200$). Negative controls were realized without primary antibody hybridization. White arrows indicate perinuclear/nuclear relocalization of the p65 protein. A comparison of conditions was realized by a Kruskal–Wallis one-way ANOVA test, followed by a Dunn’s post-test. ** means $p < 0.01$, *** means $p < 0.001$, and “ns” means “not significant”. Results are presented in Tukey boxes, and means are indicated by “+”.

FM integrity relies on an extracellular matrix (ECM) structure. Some proteins, such as the metalloproteases 2 and 9, exercise gelatinase activity, leading to ECM degradation. We investigated whether CSC treatment could have an impact on this by first modulating the transcription of MMP2 and MMP9, and then increasing gelatinase activity. The RT-qPCR experiment revealed a significant induction of MMP9 expression (ratio of 8.5) by CSC at 48 h, but no impact on the MMP2 expression level (ratio of 0.7) (Figure 5A). We also observed that RAP decreased MMP9 induction (ratio of 4.8) and diminished MMP2 expression compared to the control (ratio of 0.6). Then, the measurement of gelatinase activity after 48 or 72 h of CSC treatment, whether or not it was combined with RAP, revealed the induction of gelatinase activity at 72 h, compared to the control (ratio of 1.14); this induction was suppressed in the presence of the RAGE inhibitor RAP (ratio of 0.94) (Figure 5B).

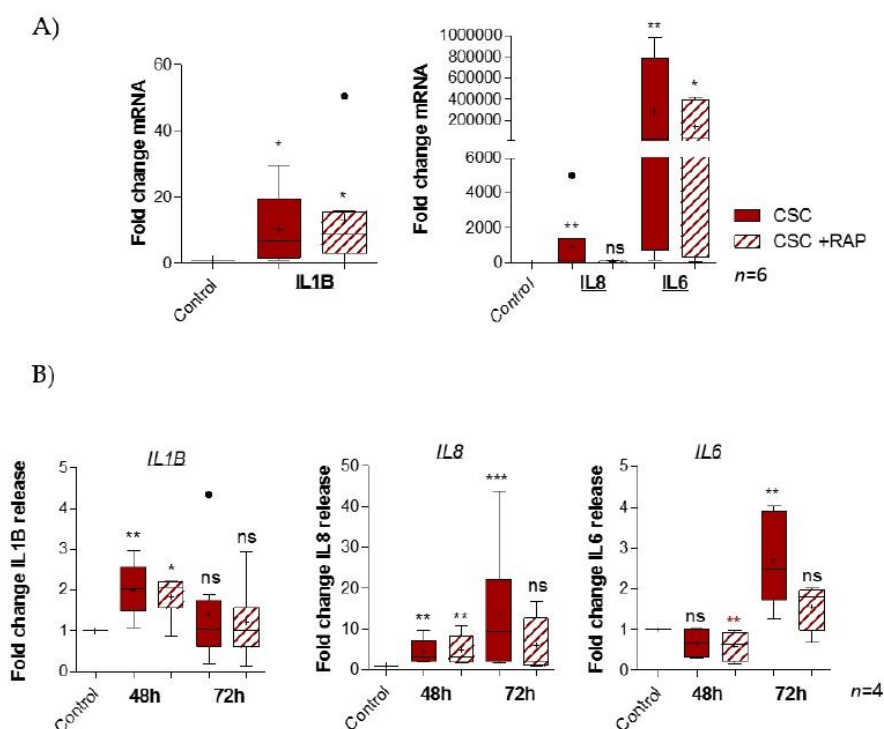


Figure 4. RAGE is implicated in CSC-induced pro-inflammatory cytokine production in pAECs. (A) Quantification of cytokine mRNA expression by RT-qPCR following 48 h of CSC (100 µg/mL) +/- RAP (12.7 µg/mL) treatment of pAECs ($n = 6$). (B) Pro-inflammatory cytokine (IL8, IL6, IL1 β) secretion was quantified by ELLA technology after 48 and 72 h (with 48 h re-treatment) of CSC treatment ($n = 4$). A comparison of conditions was realized by a Kruskal–Wallis one-way ANOVA test, followed by a Dunn’s post-test. * means $p < 0.05$, ** means $p < 0.01$, *** means $p < 0.001$, and “ns” means “not significant”. Cigarette Smoke Condensate Enhances Gelatinase Activity in pAECs through the RAGE Pathway.

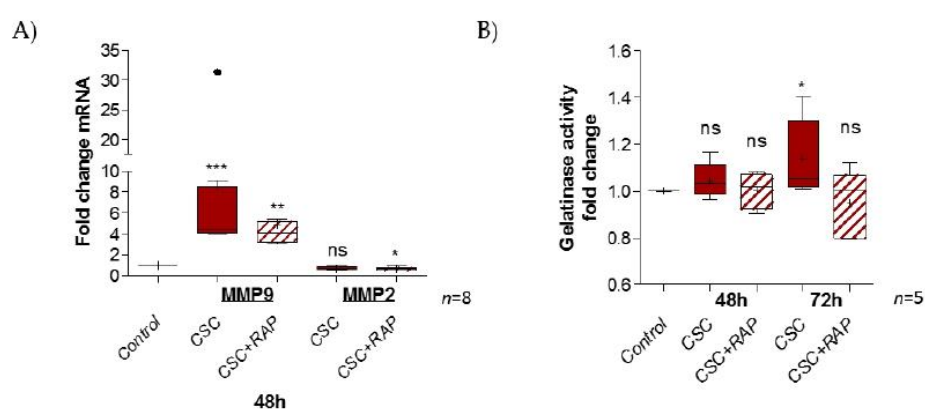


Figure 5. CSC exposure stimulates gelatinase activity in pAECs through the RAGE pathway. (A) Transcription of MMP2 and MMP9 gelatinases were measured by RT-qPCR into pAECs after 48 h of CSC treatment (100 µg/mL), whether combined or not with RAP (12.7 µg/mL) ($n = 8$). (B) Gelatinase activity was studied by a zymography kit assay on pAECs cell media after 48 and 72 h (with 48 h re-treatment) of CSC treatment ($n = 5$). Statistical analysis was performed using a Kruskal–Wallis one-way ANOVA test, followed by a Dunn’s post-test. * means $p < 0.05$, ** means $p < 0.01$, *** means $p < 0.001$, and “ns” means “not significant”. Results are presented in Tukey boxes, and means are indicated by “+”. Black dots indicate values outside of the Tukey boxes.

3. Discussion

Many pathologies are caused by cigarette-induced sterile inflammation, which can lead to lung impairments (e.g., chronic obstructive pulmonary disease), cancer mechanisms (in lung, larynx, and pancreas), cardiometabolic abnormalities (e.g., atherosclerosis, dyslipidemia, hyperinsulinemia, and cardiomyopathy), as well as joint (osteoarthritis) or maternal-fetal disorders [2]. More and more studies highlight the implication of RAGE signaling in the establishment of sterile inflammatory diseases that are linked with exposure to primary and secondhand cigarette smoke. For many decades, it has been well known that cigarette smoking has deleterious effects on pregnancy outcomes, such as preterm births and pPROM [31–33]. The involvement of RAGE has already been described in IUGR development, and it is also well known that inflammation is implicated in physiopathological FM weakening. Surprisingly, only a few studies have investigated the cellular signaling actors responsible for cigarette-induced inflammation in pPROM pathogenesis. Nevertheless, it is important to underline that this inflammation is of a “sterile type”, involving the release of alarmins, which could be recognized by the RAGE receptor. From this initial evidence, our work consisted of investigating whether RAGE was implied in FM weakening and whether this is a new link between maternal smoking and premature sterile inflammation.

Human FM are composed of two layers: the amnion and the choriodecidua. Our *in vitro* experiments identified a different response to CSC from each of these tissues. Indeed, we noticed a significant induction of cell toxicity and an induction of HMGB1 release only in the amnion. The choriodecidua did not seem to be sensitive to CSC treatment. This could be explained by the fact that *in vivo* cigarette compounds are classically accumulated in amniotic fluid and in direct contact with the amnion (particularly its epithelial cells), but this is not the case for the choriodecidua. Our work aimed to more precisely describe the inflammatory response activated by CSC at the cellular amniotic level. We demonstrated that cigarette smoke compounds induce cell toxicity and provoke a release of alarmins (HMGB1), which is associated with sterile inflammation in pAECs. The release of DAMPs has already been identified in other models (e.g., chronic obstructive pulmonary disease), where it is well established that cigarette smoke exposure can induce necrotic death in airway epithelial cells, provoking DAMP (HMGB1, AGEs, S100, HSP70, and dsDNA) accumulation in the extracellular space [18,34–36]. These DAMPs are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), such as RAGE. The engagement of these receptors can lead to an inflammatory response through the activation of pro-inflammatory pathways, such as NF κ B. RAGE expression has already been identified in human FM. Our team already reported that RAGE is overexpressed, not only in the amnion compared to choriodecidua, but also in the rupture zone compared to the intact one. In parallel, a previous study demonstrated that FM are sensitive to RAGE ligands: the AGEs and HMGB1 [37]. This preferential expression of RAGE in the amnion could be exacerbated by contact with smoking compounds, explaining such amniotic susceptibility to CSC.

RAGE is a transmembrane receptor implicated in many cell responses (e.g., apoptosis, proliferation, inflammation, and cell migration), but cannot act alone [25]. Indeed, RAGE is deficient in intrinsic activity and requires intracellular adaptors to induce cell-signaling cascades. In the literature, we found three major adaptor proteins that interacted with the RAGE cytosolic domain and were described in the inflammatory signal: TIRAP, MyD88 shared with the toll-like receptors TLR2 and TLR4, and Diaphanous-1 [28,29]. For the first time, RAGE and its three adaptors were identified in AECs. Interestingly, our work additionally revealed a significant overexpression of MyD88, a RAGE intracellular adaptor whose expression was decreased by RAGE inhibition. Some studies have already investigated the role of Myd88 regarding cellular consequences of smoking. For example, Myd88-dependent signaling regulates, at least partially, CS-induced inflammation in bronchial epithelial cells, supporting the role of RAGE [34]. Moreover, the Filipovich group demonstrated that knockout mice for MyD88 were protected against *Escherichia coli*-induced preterm delivery, proving the essential role of Myd88 in septic preterm de-

livery, which allowed us to suppose that it could also be implicated in sterile cases of preterm birth [38]. Then, our work demonstrated that RAGE is required for the activation of NF- κ B, which is a pro-inflammatory pathway well-known for inducing the production of pro-inflammatory mediators, such as cytokines. NF- κ B was already known to be implicated in childbirth, since human labor is associated with a constant increase of NF- κ B activity in the amnion [39]. Moreover, Sheller-Miller et al. demonstrated that the *in vivo* injection of an NF- κ B inhibitor delays LPS-induced preterm delivery [40]. Thus, by its impact on this cell pathway, it seems that maternal smoking could provoke preterm birth by affecting other events of parturition (preterm labor) in addition to pPROM.

Finally, our work illustrated the downstream effects of this RAGE activation by CSC in pAECs following NF- κ B activation. In this way, this study highlighted that CSC-treated pAECs exhibit higher levels of pro-inflammatory cytokine transcription and release (IL6, IL8, and IL1 β). In addition, RAGE inhibition led to the decrease of IL1 β and the cessation of IL8 and IL6 release. This directly proves that cigarette smoke (CS) can induce inflammation through a RAGE pathway. However, the absence of a total abortion for IL1 β release could suggest the intervention of other actors, such as the well-known TLR4, which can also interact with alarmins. For example, it was found that nicotine modulates the expression of TLR2/4 into cord blood mononuclear cells [41]. Cheng et al. also demonstrated that HMGB1 translocation can mediate CS-induced pulmonary inflammation through the TLR4/MyD88 pathway [42]. However, Allam et al. demonstrated that RAGE and TLR4 differentially regulate airway responsiveness to cigarette smoke (CS). Indeed, the authors used RAGE and TLR4 knockout mice and found that only RAGE deletion procured protection against CS-induced neutrophils and airway responsiveness [43]. In our amniotic context, we tested at the beginning of the project the impact of CSC on TLR4 expression and found that there is no induction (ratio 1.1 by qRT-PCR, Supplementary Data S1, See Supplementary Files) excluding the TLR4 hypothesis. Nevertheless, further studies are required to explore the potential cooperation between these two PRRs concerning sterile inflammation in FM.

Sterile inflammation is clearly associated with extracellular matrix (ECM) degradation, which is also a recurrent phenomenon that destructures tissue integrity, in fine, the FM weakening. The major actors in this ECM deterioration are enzymes called metalloproteinases. Two major groups comprise this family: gelatinases (MMP2 and 9) and collagenases (MMP1, 7, 8, and 13). Amniotic epithelium express MMP1, 2, and 9. Our work demonstrated that CSC stimulates MMP9 transcription in amniotic epithelial cells but has no impact on MMP2 and MMP1 (data not shown for MMP1). Moreover, the RAGE blockade led to a decrease in CSC-induced MMP9 expression and the physiological expression of MMP2. We also investigated gelatinase activity on cell supernatants by zymography assay. Here, we revealed an induction of gelatinase activity by CSC at 72 h, and this induction was aborted by RAP treatment. In the literature, RAGE was implicated in CS-induced MMP expression and/or activity (MMP2, 9, and 14) in the respiratory tree [44]. Moreover, MMP9 was revealed to be increased in amniotic fluid and fetal plasma in the case of pPROM; thus, it is considered a potential biomarker of pPROM [45,46]. Polymorphism in the MMP9 promoter is associated with an increased risk of pPROM [47]. Finally, many studies have described the implication of NF κ B pathway in MMP9 upregulation in the case of inflammation [48–51]. Our results revealed a new way in which CSC weakens FM through RAGE and is in total accordance with the results obtained in other tissues.

In conclusion, our work makes clear a way that cigarette smoking (CSC) can induce FM weakening and, in fine, a pPROM, as summarized in our RAGE-dependent model of action (Figure 6).

Indeed, we proved that CSC provokes a sterile inflammatory response in amnion epithelial cells by activating the RAGE pathway. This increase in inflammation may accelerate the physiological weakening of FM. Due to the complexity of the molecules, as well as the gas released during cigarette smoking, it would be interesting to compare the effects of CSC (the particular phase) to the effects of CSE (sampling the water-soluble

compounds) and to check the activation and implication of RAGE pathways in such a mixed exposure case. Nevertheless, this study still supports a cellular explanation for the negative effects of tobacco smoke on pregnant women and paves the way for developing new preventive strategies to protect smoking mothers from pPROM by targeting the RAGE pathway.

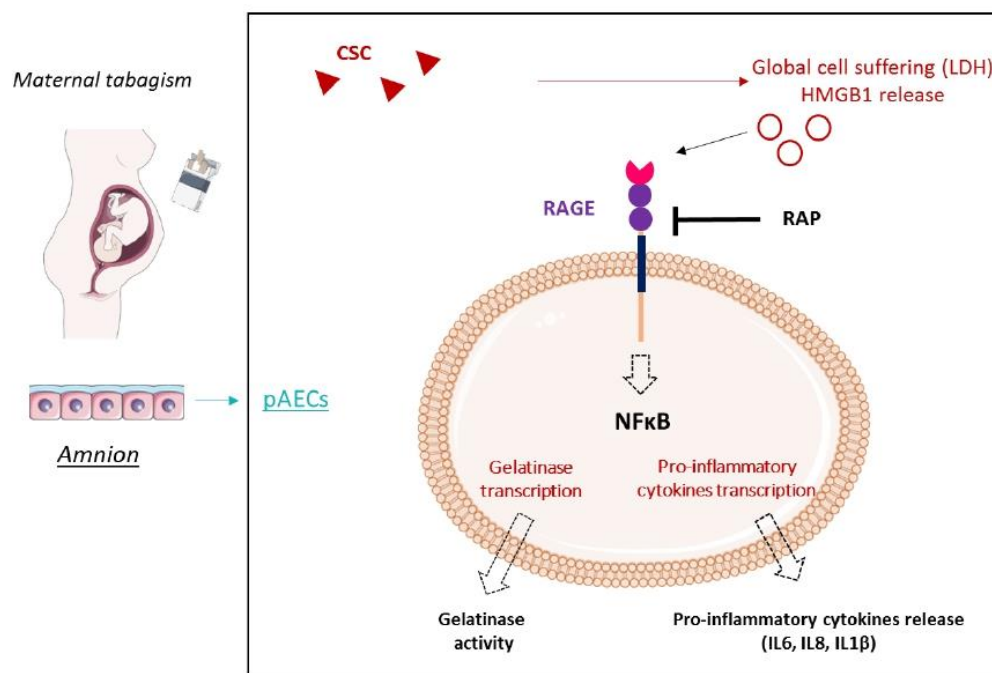


Figure 6. Maternal tabagism model of negative consequences on amniotic cells by the induction of RAGE-dependent sterile inflammation and gelatinase activity. Sterile inflammation is a key phenomenon of FM weakening, not only in physiological rupture, but also in pPROM. Exposure to tobacco during pregnancy is a well-known risk factor of pPROM. We demonstrated here that CSC induces an in vitro HMGB1 release by the amnion, a well-known danger signal. Then, this alarmin, a major ligand of RAGE, can induce a pro-inflammatory response (NF- κ B activation and cytokine production) through the RAGE pathway in amniotic epithelial cells, which suggests the essential role of RAGE in FM rupture and pPROM. smart.servier.com was used to create the figure.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

CSC (20 mg/mL in dimethylsulfoxide (DMSO)) was purchased from Kentucky Tobacco & Research Development Center (Lexington, KY, USA), and DMSO was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). RAGE Antagonist Peptide (RAP) (Cat N° 553031, Calbiochem®, 5 mg/mL in water) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The cell culture medium and antibiotics (streptomycin, penicillin, and amphotericin B) were obtained from Fisher Scientific™ (Illkirch-Graffenstaden, France), and fetal bovine serum was purchased from Eurobio Scientific (Les Ulis, France). Collagen I (3 mg/mL) was obtained from Stemcell Technologies (Grenoble, France). Superscript IV First-Strand-Synthesis System, Taq DNA polymerase recombinant (10342020), and Pierce BCA Protein Assay Kit (23225) were obtained from Fisher Scientific™ (Illkirch-Graffenstaden, France) and SYBR Green from Roche (Meylan, France).

4.2. Tissue Collection

Full-term FMs were collected from non-smoking women with healthy pregnancies from vaginal or scheduled cesarean deliveries (e.g., breech presentation or scarred wombs)

(Centre Hospitalier Universitaire Estaing, Clermont-Ferrand, France) after obtaining informed consent. Gestational ages were 39.04 ± 0.38 weeks, the mean maternal ages were 31.26 ± 3.79 years, and the maternal body mass index was 26.33 ± 4.14 . The selected FMs were collected from singleton pregnant women who had no underlying diseases, gestational diabetes, or clinical chorioamnionitis (defined by maternal fever, uterine tenderness, and/or purulent amniotic fluid). The research protocol was approved by the institutional regional ethics committee (DC-2008-558).

4.3. Tissue and Cell Culture

Explants (dissociated) of the amnion and choriodecidua were cultivated (5% CO₂; 95% humidified air; 37 °C) in Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEMF12- GlutaMAX, Gibco™, Illkirch-Graffenstaden, France), supplemented with 10% FBS, 100 mg/mL of streptomycin, 100 U/mL of ampicillin, and 25 mg/mL amphotericin B (Gibco™, Illkirch-Graffenstaden, France). Explants were 2 cm² in size, cut 2 cm away from the preplacental edge, and prepared by dissection. Tissue fragments were transferred (in duplicate) to 24-well culture plates and incubated in the cell media at 37 °C for 1 h before treatment.

pAECs were cultivated under standard conditions (5% CO₂; 95% humidified air; 37 °C) in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 nutrient mixture (DMEM-F12- GlutaMAX) supplemented with 10% FBS, 100 µg/mL of streptomycin, 100 U/mL of ampicillin, and 25 µg/mL amphotericin B. As previously validated, the isolation of pAECs was conducted in three trypsinization steps (10, 20, and 30 min), followed by the scraping of the amnion [52]. Cells were filtered to remove the collagen, centrifuged for 5 min at 1000 rpm, and grown on culture dishes coated with collagen I (1/50 dilution in PBS 1X) in complete media.

4.4. Tissue and Cell Treatment

Cells or explants were treated with DMSO or CSC (respectively 100 or 500 µg/mL) in the absence or presence of RAP (12.7 or 63.6 µg/mL) for 24 h, 48 h, or 72 h (with treatment renewal at 48 h).

4.5. Global Cellular Distress Determination

To evaluate the impact of treatment on global cell suffering, the release of the intracellular enzyme lactate dehydrogenase (LDH) into the cell media was quantified on an automate (Siemens Vista, Paris, France) using an enzymatic assay, following the manufacturer's recommendations.

4.6. Western Blot Analysis of HMGB1 Release

First, the supernatants of the treated explants were concentrated into 2 kDa centrifugal filter units (Vivacon®500, Sartorius, Aubagne, France) for protein concentration and purification, following the manufacturer's instructions. Then, the proteins were resolved on a 4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gel (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to perform total protein normalization [53]. Before the transfer, stain-free imaging was completed. This technology utilizes a proprietary trihalo compound to enhance natural protein fluorescence by covalently binding to tryptophan residues with brief UV activation (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Then, the transfer was performed on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and saturated for more than 90 min with 5% skimmed milk in a Tris-Buffered Saline (TBS) 1X. HMGB1 primary antibody (1/10000, ab79823, Abcam, Paris, France) was diluted in 5% skimmed milk-TBS 1X-TWEEN®20 0.1% and incubated overnight at 4 °C. The next day, the membrane was washed three times with TBS/TWEEN®20 0.1% and incubated at room temperature with a horseradish peroxidase coupled with a secondary antibody anti-rabbit (1/10000, BI 2407, Abliance, Compiègne, France) for 90 min. The revelation was completed using an ECL Clarity kit for a western blot on the ChemiDoc™ imaging system (Bio-Rad, Marnes-la-

Coquette, France). Image Lab Software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used for quantification. Results are expressed as a mean of at least three independent experiments.

4.7. RT-PCR and Quantitative RT-PCR on Explants and Cells

After the disruption step with a Precellys homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) using ceramic beads (KT03961, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France), the total number of RNAs were extracted from the explants using RNeasy[®] RT (RN190, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). For the cells, RNA extraction was performed with NucleoSpin RNA (REF 740955.50, Macherey-Nagel, Hoerd, France), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was realized on 1 µg of RNA using a Superscript IV First-Strand-Synthesis System for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PCR experiments were performed using specific oligonucleotides (Table 1).

Table 1. Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR and RT-qPCR amplification of human genes.

Gene	Sequence 5'-3' (F: Forward, r: Reverse)	Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)
<i>hsRAGE</i>	F: TGTGCTGATCCTCCCTGAGA R: TGCAGTTGGCCCTCCTCG	139	61
<i>hs36B4</i>	F: AGGCTTTAGGTATCACCCT R: GCAGAGTTTCTCTGTGATA	219	61
<i>hsRSP17</i>	F: TGCGAGGAGATCGCCATTATC R: AAGGCTGAGACCTCAGGAAC	169	61
<i>hsMyD88</i>	F: GCAGGAGGAGGCTGAGAAGC R: CGGATCATCTCCTGCACAACT	177	66
<i>hsTIRAP</i>	F: AAGTACCAGATGCTGCAGGCC R: AGTGTCAACTGAGTGTCTGCAG	200	66
<i>hsDia-1</i>	F: AGAGCCACACTTCTTTCCATC R: TCAATCTCAATCTGGAGGTGCC	167	66
<i>hsIL6</i>	F: AATGAGGAGACTTGCCTGGTG R: AGGAACTGGATCAGGACTTTTG	143	61
<i>hsIL8</i>	F: TGATTCTGCAGCTCTGTGTG R: TCTGTGTTGGCGCAGTGTGG	154	61
<i>hsIL1β</i>	F: AATCTCCGACCACACTACAG R: TCCCATGTGTGGAAGAAGATAG	174	62
<i>hsMMP9</i>	F: ATGACGACGCCTTGGCCCG R: ATGGGCGTCTCCCTGAATGC	201	61
<i>hsMMP2</i>	F: AGCTCATCGCAGATGCCTGG R: AAGGGCCTGTGGGAGCCAG	199	61

The results were analyzed on a 2% agarose gel. Gene expression was assessed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR), which was performed using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Meylan, France). Transcript quantification was performed in duplicate on at least four independent experiments. Standard curves were used to quantify the amount of amplified transcripts. Results were normalized to the geometric mean of the human housekeeping genes RPL0 (36b4) and RPS17 (acidic ribosomal phosphoprotein P0 and ribosomal protein S17, respectively), as recommended by the MIQE guidelines [54].

4.8. Cytokine Release Assay

The release of IL1β, IL6, and IL8 in the culture media was quantified after 48 h of CSC treatment using automated multiplex immunoassays on Ella[™] (San Jose, CA, USA). Finally, cytokine concentrations were normalized to total protein concentration, and the fold change "treated/control" was reported.

4.9. Immunofluorescence

pAECs grown on collagen type I-coated coverslips in six-well plates were washed with PBS 1X before fixation with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710; can be stored at -80°C). After permeabilization in PBS 1X/FBS 10%/Triton 0.1% for more than 90 min, the primary antibody against RAGE (1/1000, ab37647, Abcam, Paris, France), HMGB1 (1/400, ab79823, Abcam, Paris, France), Myd88 (1/250, ab133739, Abcam, Paris, France), TIRAP (1/100, ab17218, Abcam, Paris, France), Diaphanous-1 (1/400, ab11173, Abcam, Paris, France), and p65 NF- κ B (1/400, 8242, Cell signaling, Saint-Cyr-L'Ecole, France) was applied overnight at 4°C . After three washes in the permeabilization buffer, the secondary antibody, anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 (1/1000, A21206, Life Technologies, Villebon-Sur-Yvette, France), was incubated for 2 h at room temperature. Slides were washed three times in PBS 1X and incubated with Hoescht (15 min, dilution in PBS 1X 1/10,000; bisBenzimide H, 33258, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Finally, slides were mounted with CitiFluor[™] Tris-MWL 4-88 (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) and examined under a Zeiss LSM800 Airyscan for cells. For the negative controls, incubation without the primary antibody was performed.

4.10. NF κ B Gene Reporter Luciferase Assay

pAECs grown at 80% confluence in six-well plates were co-transfected with 500 ng of pNF- κ B-Firefly Luciferase plasmid (Agilent) expressing luciferase under control of NF- κ B responsive elements and 50 ng of pRL-TK-Renilla-Luciferase expression vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), which allowed the normalization of the transfection efficiency. Transfections were performed using 3.75 μL of Lipofectamine 3000 (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and 2 μL of reagent P3000 (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) per well. Cells were treated with DMSO or CSC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), whether combined or not with RAP (12.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 24 h after the transfection for 48 h. Firefly and Renilla luciferase activities were then measured with a FB12 luminometer (Berthold, Thoiry, France) in the cellular extracts using the dual-luciferase reporter assay system (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), according to the manufacturer's instructions. This experiment was repeated three times (each condition in duplicate).

4.11. Gelatinase Activity Measurement

Gelatinase activity was measured on a cell culture media (1/500 diluted) using a gelatinase activity assay kit (MAK348, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA), following the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in kinetic mode at 37°C for two hours on a FlexStation microplate reader (Molecular devices, San Jose, CA, USA).

4.12. Statistical Analysis

The data expressed as the mean \pm standard error of the mean are an average of duplicates or triplicates of at least three independent experiments. Since the results did not follow normal distribution (consequence of the small N), the comparison of means was performed by non-parametric tests (Mann-Whitney t-test or one-way ANOVA Kruskal-Wallis test, followed by multiple comparison with Dunn's correction for the comparison of more than two groups) using PRISM software 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For all studies, values were considered significantly different at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***). Mean ratio (treated/control groups) values are indicated in the results part.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22158345/s1>.

Author Contributions: H.C. designed and performed the experiments and wrote the manuscript. J.D. participated in the ELLA assays, R.M.-Q. performed lactate dehydrogenase assays, and C.B. assisted in some experiments. D.G. allowed H.C. to obtain human fetal membranes from patients in the Centre Hospitalier Universitaire Estaing (Clermont-Ferrand, France). V.S. and L.B. supervised the project and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: H.C. was funded by a French ministerial grant.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Regional Ethics Committee of Clermont-Ferrand Sud-Est VI (Personal Protection Committee) (DC-2008-558).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the French bioethics law which identified the placenta and the fetal membranes as “care activity waste” until the delivery, thus no consent statement is required from the mother.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 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. [[CrossRef](#)]
- Lewis, J.; Hirschi, K.; Arroyo, J.; Bikman, B.; Kooyman, D.; Reynolds, P. Plausible Roles for RAGE in Conditions Exacerbated by Direct and Indirect (Secondhand) Smoke Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 652. [[CrossRef](#)]
- Wrześniak, M.; Kepinska, M.; Królik, M.; Milnerowicz, H. The Influence of Tobacco Smoke on Protein and Metal Levels in the Serum of Women during Pregnancy. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161342. [[CrossRef](#)]
- Witt, S.H.; Frank, J.; Gilles, M.; Lang, M.; Treutlein, J.; Streit, F.; Wolf, I.A.C.; Peus, V.; Scharnholtz, B.; Send, T.S.; et al. Impact on Birth Weight of Maternal Smoking throughout Pregnancy Mediated by DNA Methylation. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rogers, J.M. Tobacco and Pregnancy. *Reprod. Toxicol.* **2009**, *28*, 152–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- von Chamier, M.; Reyes, L.; Hayward, L.F.; Brown, M.B. Nicotine Induces Maternal and Fetal Inflammatory Responses Which Predispose Intrauterine Infection Risk in a Rat Model. *Nicotine Tob. Res.* **2021**, natb080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, Y.-H.; An, Y.-J.; Jo, S.; Lee, S.-H.; Lee, S.J.; Choi, S.-J.; Lee, K. Comparison of Volatile Organic Compounds between Cigarette Smoke Condensate (CSC) and Extract (CSE) Samples. *Environ. Health Toxicol.* **2018**, *33*, e2018012. [[CrossRef](#)]
- Polettini, J.; Richardson, L.S.; Menon, R. Oxidative Stress Induces Senescence and Sterile Inflammation in Murine Amniotic Cavity. *Placenta* **2018**, *63*, 26–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bredeson, S.; Papaconstantinou, J.; Deford, J.H.; Kechichian, T.; Syed, T.A.; Saade, G.R.; Menon, R. HMGB1 Promotes a P38MAPK Associated Non-Infectious Inflammatory Response Pathway in Human Fetal Membranes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Menon, R.; Peltier, M.R. Novel Insights into the Regulatory Role of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 in Oxidative Stress and Inflammation of Human Fetal Membranes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Menon, R.; Fortunato, S.J.; Yu, J.; Milne, G.L.; Sanchez, S.; Drobek, C.O.; Lappas, M.; Taylor, R.N. Cigarette Smoke Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Normal Term Fetal Membranes. *Placenta* **2011**, *32*, 317–322. [[CrossRef](#)]
- Rouzaire, M.; Comptour, A.; Belville, C.; Bouvier, D.; Sapin, V.; Gallot, D.; Blanchon, L. Cigarette Smoke Condensate Affects the Retinoid Pathway in Human Amnion. *Placenta* **2017**, *58*, 98–104. [[CrossRef](#)]
- Cerami, C.; Founds, H.; Nicholl, I.; Mitsuhashi, T.; Giordano, D.; Vanpatten, S.; Lee, A.; Al-Abed, Y.; Vlassara, H.; Bucala, R.; et al. Tobacco Smoke Is a Source of Toxic Reactive Glycation Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13915–13920. [[CrossRef](#)]
- Nicholl, I.D.; Bucala, R. Advanced Glycation Endproducts and Cigarette Smoking. *Cell Mol. Biol.* **1998**, *44*, 1025–1033.
- Tsai, C.-Y.; Chou, H.-C.; Chen, C.-M. Perinatal Nicotine Exposure Alters Lung Development and Induces HMGB1-RAGE Expression in Neonatal Mice. *Birth Defects Res.* **2020**, *113*, 570–578. [[CrossRef](#)]
- Railwah, C.; Lora, A.; Zahid, K.; Goldenberg, H.; Campos, M.; Wyman, A.; Jundi, B.; Ploszaj, M.; Rivas, M.; Dabo, A.; et al. Cigarette Smoke Induction of S100A9 Contributes to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L1021–L1035. [[CrossRef](#)]
- Zhang, S.-P.; Wu, Y.-W.; Wu, Z.-Z.; Liu, H.-Y.; Nie, J.-H.; Tong, J. Up-Regulation of RAGE and S100A6 in Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 259–264. [[CrossRef](#)]

20. Wood, T.T.; Winden, D.R.; Marlor, D.R.; Wright, A.J.; Jones, C.M.; Chavarria, M.; Rogers, G.D.; Reynolds, P.R. Acute Secondhand Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Is Diminished in RAGE Knockout Mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2014**, *307*, L758–L764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lee, H.; Lee, J.; Hong, S.-H.; Rahman, I.; Yang, S.-R. Inhibition of RAGE Attenuates Cigarette Smoke-Induced Lung Epithelial Cell Damage via RAGE-Mediated Nrf2/DAMP Signaling. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 684. [[CrossRef](#)]
22. Wolf, L.; Herr, C.; Niederstraßer, J.; Beisswenger, C.; Bals, R. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) Maintains Pulmonary Structure and Regulates the Response to Cigarette Smoke. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180092. [[CrossRef](#)]
23. Prasad, K.; Dhar, I.; Caspar-Bell, G. Role of Advanced Glycation End Products and Its Receptors in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Cardiovascular Disease. *Int. J. Angiol.* **2015**, *24*, 75–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lewis, J.B.; Mejia, C.; Jordan, C.; Monson, T.D.; Bodine, J.S.; Dunaway, T.M.; Egbert, K.M.; Lewis, A.L.; Wright, T.J.; Ogden, K.C.; et al. Inhibition of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Protects from Secondhand Smoke (SHS)-Induced Intrauterine Growth Restriction IUGR in Mice. *Cell Tissue Res.* **2017**, *370*, 513–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xie, J.; Méndez, J.D.; Méndez-Valenzuela, V.; Aguilar-Hernández, M.M. Cellular Signalling of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2185–2197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barbezier, N.; Tessier, F.J.; Chango, A. Receptor of advanced glycation endproducts RAGE/AGER: An integrative view for clinical applications. *Ann. Biol. Clin.* **2014**, *72*, 669–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sakaguchi, M.; Kinoshita, R.; Putranto, E.W.; Ruma, I.M.W.; Sumardika, I.W.; Youyi, C.; Tomonobu, N.; Yamamoto, K.-I.; Murata, H. Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Acta Med. Okayama* **2017**, *71*, 459–465. [[CrossRef](#)]
28. Sakaguchi, M.; Murata, H.; Yamamoto, K.; Ono, T.; Sakaguchi, Y.; Motoyama, A.; Hibino, T.; Kataoka, K.; Huh, N. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hudson, B.I.; Kalea, A.Z.; del Mar Arriero, M.; Harja, E.; Boulanger, E.; D'Agati, V.; Schmidt, A.M. Interaction of the RAGE Cytoplasmic Domain with Diaphanous-1 Is Required for Ligand-Stimulated Cellular Migration through Activation of Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34457–34468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kumar, V.; Fleming, T.; Terjung, S.; Gorzelanny, C.; Gebhardt, C.; Agrawal, R.; Mall, M.A.; Ranzinger, J.; Zeier, M.; Madhusudhan, T.; et al. Homeostatic Nuclear RAGE-ATM Interaction Is Essential for Efficient DNA Repair. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 10595–10613. [[CrossRef](#)]
31. Williams, M.A.; Mittendorf, R.; Stubblefield, P.G.; Lieberman, E.; Schoenbaum, S.C.; Monson, R.R. Cigarettes, Coffee, and Preterm Premature Rupture of the Membranes. *Am. J. Epidemiol.* **1992**, *135*, 895–903. [[CrossRef](#)]
32. England, M.; Benjamin, A.; Abenheim, H. Increased Risk of Preterm Premature Rupture of Membranes at Early Gestational Ages among Maternal Cigarette Smokers. *Am. J. Perinatol.* **2013**, *30*, 821–826. [[CrossRef](#)]
33. Shea, A.K.; Steiner, M. Cigarette Smoking during Pregnancy. *Nicotine Tob. Res.* **2008**, *10*, 267–278. [[CrossRef](#)]
34. Pouwels, S.D.; Zijlstra, G.J.; van der Toorn, M.; Hesse, L.; Gras, R.; Ten Hacken, N.H.T.; Krysko, D.V.; Vandenabeele, P.; de Vries, M.; van Oosterhout, A.J.M.; et al. Cigarette Smoke-Induced Necroptosis and DAMP Release Trigger Neutrophilic Airway Inflammation in Mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *310*, L377–L386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pouwels, S.D.; Hesse, L.; Faiz, A.; Lubbers, J.; Bodha, P.K.; ten Hacken, N.H.T.; van Oosterhout, A.J.M.; Nawijn, M.C.; Heijink, I.H. Susceptibility for Cigarette Smoke-Induced DAMP Release and DAMP-Induced Inflammation in COPD. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *311*, L881–L892. [[CrossRef](#)]
36. Sharma, A.; Kaur, S.; Sarkar, M.; Sarin, B.C.; Changotra, H. The AGE-RAGE Axis and RAGE Genetics in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2020**, *60*, 244–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Choltus, H.; Lavergne, M.; Belville, C.; Gallot, D.; Minet-Quinard, R.; Durif, J.; Blanchon, L.; Sapin, V. Occurrence of a RAGE-Mediated Inflammatory Response in Human Fetal Membranes. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Filipovich, Y.; Lu, S.-J.; Akira, S.; Hirsch, E. The Adaptor Protein MyD88 Is Essential for E Coli-Induced Preterm Delivery in Mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2009**, *200*, 93.e1–93.e8. [[CrossRef](#)]
39. Lee, Y.; Allport, V.; Sykes, A.; Lindstrom, T.; Slater, D.; Bennett, P. The Effects of Labour and of Interleukin 1 Beta upon the Expression of Nuclear Factor Kappa B Related Proteins in Human Amnion. *Mol. Hum. Reprod.* **2003**, *9*, 213–218. [[CrossRef](#)]
40. Sheller-Miller, S.; Radnaa, E.; Yoo, J.-K.; Kim, E.; Choi, K.; Kim, Y.; Kim, Y.N.; Richardson, L.; Choi, C.; Menon, R. Exosomal Delivery of NF-KB Inhibitor Delays LPS-Induced Preterm Birth and Modulates Fetal Immune Cell Profile in Mouse Models. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabd3865. [[CrossRef](#)]
41. Takbiri Osgoei, L.; Parivar, K.; Ebrahimi, M.; Mortaz, E. Nicotine Modulates the Release of Inflammatory Cytokines and Expression of TLR2, TLR4 of Cord Blood Mononuclear Cells. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *17*, 372–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cheng, Y.; Wang, D.; Wang, B.; Li, H.; Xiong, J.; Xu, S.; Chen, Q.; Tao, K.; Yang, X.; Zhu, Y.; et al. HMGB1 Translocation and Release Mediate Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation in Mice through a TLR4/MyD88-Dependent Signaling Pathway. *MBoC* **2017**, *28*, 201–209. [[CrossRef](#)]
43. Allam, V.S.R.R.; Faiz, A.; Lam, M.; Rathnayake, S.N.H.; Ditz, B.; Pouwels, S.D.; Brandsma, C.-A.; Timens, W.; Hiemstra, P.S.; Tew, G.W.; et al. RAGE and TLR4 Differentially Regulate Airway Hyperresponsiveness: Implications for COPD. *Allergy* **2020**, *76*, 1123–1135. [[CrossRef](#)]

44. Winden, D.R.; Barton, D.B.; Betteridge, B.C.; Bodine, J.S.; Jones, C.M.; Rogers, G.D.; Chavarria, M.; Wright, A.J.; Jergensen, Z.R.; Jimenez, F.R. Antenatal Exposure of Maternal Secondhand Smoke (SHS) Increases Fetal Lung Expression of RAGE and Induces RAGE-Mediated Pulmonary Inflammation. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kim, H.J.; Park, K.H.; Kim, Y.M.; Joo, E.; Ahn, K.; Shin, S. A Protein Microarray Analysis of Amniotic Fluid Proteins for the Prediction of Spontaneous Preterm Delivery in Women with Preterm Premature Rupture of Membranes at 23 to 30 Weeks of Gestation. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0244720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Romero, R.; Chaiworapongsa, T.; Espinoza, J.; Gomez, R.; Yoon, B.H.; Edwin, S.; Mazor, M.; Maymon, E.; Berry, S. Fetal Plasma MMP-9 Concentrations Are Elevated in Preterm Premature Rupture of the Membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2002**, *187*, 1125–1130. [[CrossRef](#)]
47. Ferrand, P.E.; Parry, S.; Sammel, M.; Macones, G.A.; Kuivaniemi, H.; Romero, R.; Strauss, J.F. 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. [[CrossRef](#)]
48. Macarie, R.D.; Vadana, M.; Ciortan, L.; Tucureanu, M.M.; Ciobanu, A.; Vinereanu, D.; Manduteanu, I.; Simionescu, M.; Butoi, E. The Expression of MMP-1 and MMP-9 Is up-Regulated by Smooth Muscle Cells after Their Cross-Talk with Macrophages in High Glucose Conditions. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 4366–4376. [[CrossRef](#)]
49. Yan, W.; Fan, W.; Chen, C.; Wu, Y.; Fan, Z.; Chen, J.; Chen, Z.; Chen, H. IL-15 up-Regulates the MMP-9 Expression Levels and Induces Inflammatory Infiltration of Macrophages in Polymyositis through Regulating the NF-KB Pathway. *Gene* **2016**, *591*, 137–147. [[CrossRef](#)]
50. Sindhu, S.; Al-Roub, A.; Koshy, M.; Thomas, R.; Ahmad, R. Palmitate-Induced MMP-9 Expression in the Human Monocytic Cells Is Mediated through the TLR4-MyD88 Dependent Mechanism. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 889–900. [[CrossRef](#)]
51. Dwir, D.; Giangreco, B.; Xin, L.; Tenenbaum, L.; Cabungcal, J.-H.; Steullet, P.; Goupil, A.; Cleusix, M.; Jenni, R.; Chtarto, A.; et al. MMP9/RAGE Pathway Overactivation Mediates Redox Dysregulation and Neuroinflammation, Leading to Inhibitory/Excitatory Imbalance: A Reverse Translation Study in Schizophrenia Patients. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 2889–2904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bouvier, D.; Rouzaire, M.; Marceau, G.; Prat, C.; Pereira, B.; Lemarié, R.; Deruelle, P.; Fajardy, I.; Gallot, D.; Blanchon, L.; et al. Aquaporins and Fetal Membranes From Diabetic Parturient Women: Expression Abnormalities and Regulation by Insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, E1270–E1279. [[CrossRef](#)]
53. Gilda, J.E.; Gomes, A.V. Stain-Free Total Protein Staining Is a Superior Loading Control to β -Actin for Western Blots. *Anal. Biochem.* **2013**, *440*, 186–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

III. PHENOMENES INFLAMMATOIRES ET RUPTURE DES MEMBRANES FŒTALES

Cette thèse a été également l'occasion de réaliser un état des lieux de la littérature de par l'écriture d'une revue, soulignant l'implication de nouveaux acteurs de l'inflammation au sein des membranes fœtales humaines. Les travaux réalisés durant ces trois ans, mais également les travaux précédents de Marilyne Lavergne, ont permis l'arrivée de deux acteurs de l'inflammation sur la scène des membranes fœtales : RAGE et l'inflammasome NLRP7. Il était ainsi important de faire une mise à jour des données sur rupture des membranes fœtales et voies de l'inflammation.

Publication N°3

Pathophysiological implication of Pattern Recognition Receptors in fetal membranes

rupture: RAGE and NLRP inflammasome

Hélène Choltus¹, Marilyne Lavergne¹, Coraline De Sousa Do Outeiro¹, Loïc Blanchon¹,
Vincent Sapin^{1,2}

¹ CNRS, INSERM, GReD, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

² CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, Clermont-Ferrand, France

Accepted in Biomedecines, August 2021

Review

Pathophysiological implication of pattern recognition receptors in fetal membranes rupture: RAGE and NLRP inflammasome.

Helena Choltus ¹, Marilyne Lavergne ¹, Coraline De Sousa Do Outeiro ¹, Karen Coste ¹, Corinne Belville ¹, Loïc Blanchon ¹, and Vincent Sapin ^{1,2,*}

¹ CNRS, INSERM, GRéD, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; vincent.sapin@uca.fr

² CHU de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Genetic Department, Clermont-Ferrand, France; vincent.sapin@uca.fr

* Correspondence: Vincent SAPIN, Centre de Recherche Bioclinique, 28 place Henri DUNANT, TSA 50400, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 1 (France); Tel : +33 4 73 17 81 74; vincent.sapin@uca.fr

Abstract: Preterm prelabor ruptures of fetal membranes (pPROM) are a pregnancy complication responsible for 30% of all preterm births. This pathology currently appears more as a consequence of early and uncontrolled process runaway activation, which is usually implicated in the physiologic rupture at term: inflammation. This phenomenon can be septic but also sterile. In this latter case, the inflammation depends on some specific molecules called “alarmins” or “damage-associated molecular patterns” (DAMPs) that are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), leading to a microbial-free inflammatory response. Recent data clarify how this activation works and which receptor translates this inflammatory signaling into fetal membranes (FM) to manage a successful rupture after 37 weeks of gestation. In this context, this review focused on two PRRs: the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and the NLRP7 inflammasome.

Keywords: fetal membranes; inflammation; PRR; RAGE; inflammasome; NLRP

Citation: Choltus, H.; Lavergne, M.; Blanchon, L.; Sapin, V. Pathophysiological implications of pattern recognition receptors in fetal membranes rupture: RAGE and NLRP inflammasome. *Biomedicines* **2021**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Fetal membranes: a human barrier essential to childbirth

During pregnancy, the fetus must be in a peaceful and homeostatic environment, hence being protected against external aggression so that it can grow. Fetal membranes (FM), an adjustable biological barrier, are essential to this protection.

1.1. Structure of fetal membranes

The FM, like the placenta, are extra-embryonic transient tissues expelled during delivery. The placenta is located on the surface of the uterus wall, while the FMs are attached to the placenta and cover the inner wall of the amniotic cavity containing the fetus and amniotic fluid (AF). With a surface area of around 1500 cm² and a thickness between 200 and 300 μm at term, FM interact with the placenta and maternal decidua. Together, the placenta and FM ensure materno-fetal interactions, constituting a real interface and complex barrier between the mother and her future child throughout pregnancy. Fetal membranes are composed of two layers: the amnion, which is directly in contact with the AF, and the chorion, which is attached to the maternal decidua [1–4].

1.2. A multifunctional barrier: different biological roles of FM during pregnancy

FM accomplishes several important physiological functions throughout pregnancy until parturition. First, thanks to their elastic resistance strength, they constitute a physical barrier. This is an absolute requirement for maintaining the integrity of the amniotic cavity in the semirigid uterus, while the movements of the AF, which are caused by the development of the fetus, exert permanent pressure in all directions. This resistance and elasticity of the FM are conferred mainly by the extracellular matrix of the amnion [5–7].

In addition, FMs are also involved in the regulation of AF volume and homeostasis. Indeed, they allow for bidirectional transfers of AF between the amniotic cavity and maternal circulation thanks, for example, to aquaporins [8–10].

They also constitute a barrier against infections and toxins by releasing some antimicrobial molecules (defensins, lactoferrin, elafin, etc.) [11–13]. Furthermore, it has been also described that amniotic tight junctions decrease the spread of microbes in pregnancy, whereas inflammatory mediators can disrupt this barrier, especially in the case of chorioamnionitis [14,15].

At the end of this nine-month period, this barrier breaks, and the parturition starts, opening the way for the fetus. This phenomenon, called FM rupture, is complex and requires the involvement of many molecular and cellular mechanisms, leading to progressive FM weakening (Figure 1).

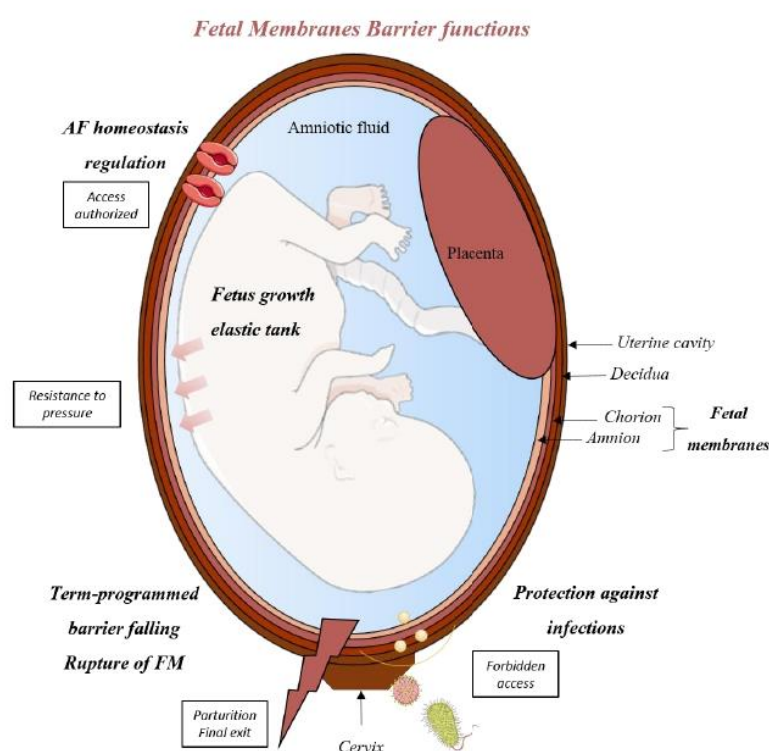


Figure 1. Physiological functions of the FM barrier. FMs are a nine-month organ required for the progress of the pregnancy. Indeed, they exercise different essential functions. First, they constitute an adjustable tank resisting internal and external pressure where the fetus can move and grow. FM also allows the amniotic fluid (AF) to achieve homeostasis by letting ions, water, and other compounds pass, notably through aquaporins. On the other hand, they physically and chemically limit the ascension of microbial agents. Finally, they are implicated in parturition by their planned and controlled rupture at term. SMART Servier Medical Art device was used from the creation of the figure.

58

59
60
61
62
63
64
65
66

67

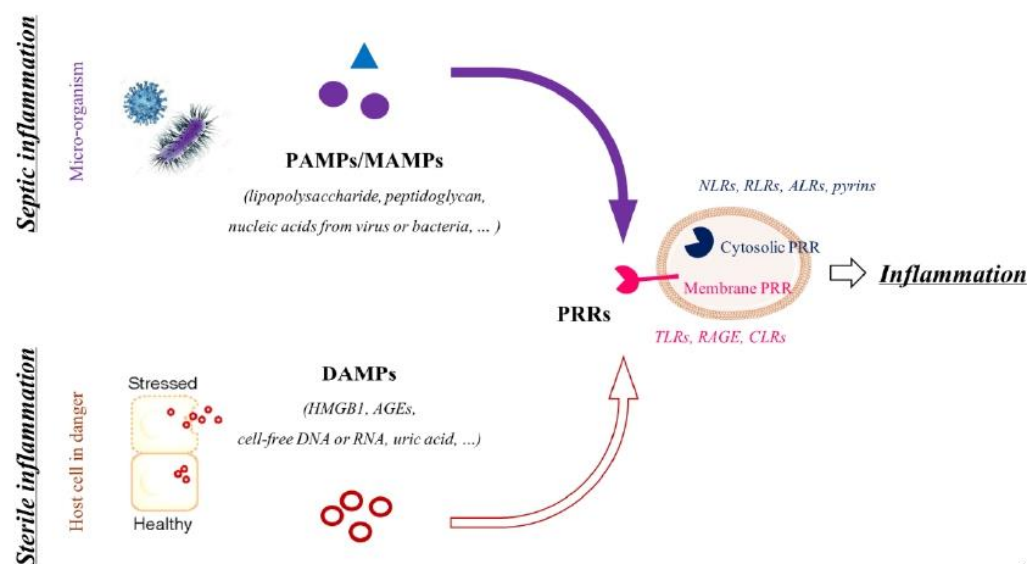
2. Inflammation or how does the FM rupture occur right on time or too early? 68

2.1 Happy ending: well-balanced inflammation for a well-prepared rupture of the FM at term 69

Most of the time, FM rupture occurs at the beginning of labor. However, in 10% of term deliveries, it happens before labor, meaning that a rupture is not limited to only being a consequence of labor contractions [16,17]. Most of time, this breakage takes place in a particular zone of the FM facing the cervix called the “zone of altered morphology” (ZAM), which is in opposition to the “zone of intact morphology” (ZIM) (we have to note that sometimes the rupture site is aside the ZAM) [18]. Anatomically, the ZAM presents a thinner structure than the ZIM because of the combination of exacerbated mechanisms in this zone, such as oxidative stress, hormone production, apoptosis, senescence, epithelio-mesenchymal transition, inflammation, and extracellular matrix (ECM) degradation [3,18–22]. In addition, these mechanisms are associated with stretching and the appearance of microfractures of the barrier, which become weaker throughout pregnancy [4,23].

Recently, more and more studies have particularly focused on the establishment and implication of the inflammation process. Indeed, several results have highlighted a higher inflammation phenomenon in the ZAM. For example, at term, chorion-derived trophoblasts from the ZAM modify their phenotype, inducing maternal immune cell activation. In addition, a transcriptome realized by the Nhan-Chang group revealed a differential expression of inflammatory genes between chorionic ZAM and ZIM [24,25]. More generally, in parallel with this ZAM tissue-specific inflammation, the AF levels of cytokines, such as IL1 β , IL6, and TNF α , are increased during labor [26,27]. Furthermore, the release of TNF α induces apoptosis in FM, and IL1 β and TNF α lead to downstream chemokine production (IL8, CXCL1, CCL2) associated with the recruitment of leukocytes toward the amnion and chorion [28]. In addition, these pro-inflammatory mediators increase the gelatinase (metalloproteases 2, 9) activity, leading to the degradation of the ECM in the FM (via the nuclear factor-kappa B (NF κ B) pathway) [22,29–32].

Thus, inflammation appears to be central in the physiological weakening of FM, and this response is set up sequentially during pregnancy. Furthermore, this end-of-pregnancy inflammation is mainly microbial free and, thus, is called sterile and results from the recognition of some specific molecules, the alarmins, or DAMPs (damage-associated molecular patterns). Several types of DAMPs (high-mobility group box 1 (HMGB1), uric acid, cell-free DNA, etc.) are released by senescent FM cells the closer the pregnancy comes to term; they spread throughout adjacent tissues as a consequence of cell apoptosis or are encapsulated in small extracellular vesicles called exosomes, amplifying both inflammation and senescence. In fact, for example, a gradual increase in the maternal plasma exosomes containing pro-inflammatory agents was discovered during mouse gestation [33]. They have been reported in gestational tissues during labor and described as responsible for the activation of various pro-inflammatory pathways, such as the p38 MAPK or NF κ B pathways [34,35]. To act as “inflammation promoters,” DAMPs are recognized by the receptors of innate immunity: the PRRs (pattern recognition receptors). It is worth noting that PAMPs/MAMPs (pathogen-associated molecular patterns/micro-organism associated molecular patterns) are recognized by the same receptors in the case of a microbial response. Two classes of PRRs have been described: the membrane PRRs and cytosolic PRRs, allowing for a recognition of a danger signal outside and inside the target cells, respectively. Among the membrane-bound PRRs are the CLRs (C-type Lectin receptors), TLRs (toll-like receptors), and, more recently, RAGE (receptor for advanced glycation end products). Alternatively, NLRs (nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors), ALRs (absent-in-melanoma (AIM)-like receptors), and the pyrin are cytosolic PRRs [36,37] (Figure 2).



118

Figure 2. Two types of inflammation. This figure distinguishes the two types of inflammation: i) the septic one implies the recognition of PAMPs/MAMPs derived from micro-organisms (viruses, bacteria, or fungi); ii) the sterile one is triggered by the recognition of DAMPs by the members of both PRRs (cytosolic or membrane-addressed). Both the recognition of PAMPs/MAMPs and DAMPs lead to a pro-inflammatory response.

119
120
121
122
123

As mentioned above, inflammation is an essential component of the physiological process of FM weakening. Nevertheless, as Paracelsus said, “The dose makes the poison” (or should we say, DAMPs make the way out). Indeed, even if this physiological well-balanced inflammation leads to a healthy birth right on time, when it is overly exacerbated or not well-regulated, it can result in preterm prelabor rupture of the FM and an unfortunate preterm birth.

124
125
126
127
128
129

2.2. preterm prelabor rupture of fetal membranes (pPROM)

130

2.2.1 Definition and consequences of the pPROM

131

In obstetrics, pPROM is defined as a rupture of the FM before the onset of labor. It can happen at any gestational age. pPROM affects 2–4% of singleton pregnancies and 7–20% of twin pregnancies [16]. This complication is responsible for one-third of preterm births (PTB) and is associated with an elevation of perinatal and maternal mortality [16,38,39]. Indeed, pPROM increases the risk of placental abruption, postpartum endometritis, and chorioamnionitis [40,41]. Such early inflammation of the placenta and FM can be caused by the rise of genital germs or by contamination following invasive medical procedures. The incidence of chorioamnionitis is directly related to the duration of the latency period between FM rupture and childbirth [42,43]. Finally, pPROM leads to a decrease in AF volume, which is potentially associated with umbilical cord prolapses or compressions. pPROM can also lead to neonatal infection, though its main outcome is PTB, whose consequences vary depending on the gestational age (developmental disorders of lungs, intestines, sensorial organs, nervous system, etc.) [44].

132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144

2.2.2 Pathophysiology of pPROM and inflammation

145

As previously described, membrane rupture results from a complex and multifactorial chain, leading to a progressive weakening of the FM. pPROM results from this same chain but in an earlier and accelerated way. We can imagine that while the FM normally takes

146
147
148

the time on the slow lane, those of mothers undergoing a pPROM burn the speed limits, arriving too early at the final destination: their decay. This pathology is described as being the consequence of a myriad of risk factors whose origin can be maternal (smoking, drug consumption, ethnic polymorphisms, nutrition), feto-utero-placental (multiple pregnancies, infection, premature labor), environmental (pollutants, lead, etc.), or iatrogenic (amniocentesis, etc.) [45–47].

Indeed, sterile or septic inflammation is considered essential in the pathogenesis of pPROM. Several inflammatory markers have been found to increase in AF, maternal blood, the placenta, and the FM in cases of pPROM [48–53]. These higher levels of pro-inflammatory cytokines have been correlated with the recruitment of leukocytes (neutrophils, monocytes, macrophages, T cells) within the AF of pPROM patients, especially those with a positive bacterial culture [49,54]. Conversely, higher levels of anti-inflammatory cytokines (IL1RA) are associated with a longer latency (>7 days) to delivery in women with pPROM [55]. Thus, many interleukins have been studied as the potential biomarkers of pPROM, such as IL6 [56–58]. If it is well known that an infectious stimulation provokes an inflammatory response, in particular at the chorion level (first target of vaginal pathogens); here, some teams have started to study sterile inflammation (potentially caused by smoking, nutritional deficiencies, pollutants, etc.) in the context of pPROM [59,60]. Indeed, its role is not negligible. A study showed that 58% of patients with sterile intra-amniotic inflammation have histological chorioamnionitis features (infiltration of polynucleated cells at the level of the fetal membranes) [61]. Moreover, higher concentrations of alarmins such as HMGB1, S100 β , heat shock protein 70, cell-free DNA, and S100 proteins have been found within AF, maternal blood, or even gestational tissues (placenta, FM) in cases of pPROM or chorioamnionitis [62–69]; these increased amounts of DAMPs, which can lead to an inflammatory stimulation by interacting with PRRs, might be the consequence of oxidative stress or senescence [70,71]. Finally, a study revealed that the *in vivo* inhibition (in a murine model) of the inflammatory pathway NF κ B causes delays in lipopolysaccharide (LPS)-induced PTB, clearly showing the importance of inflammation in parturition [72].

In the following parts of this review, special attention will be paid to the importance of the RAGE membrane receptor and to an intracytoplasmic receptor family that can form an inflammatory platform: the inflammasome.

3. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)

3.1. RAGE protein structure

Discovered in 1992 by Michael Neeper, the RAGE protein (molecular weight of about 46 kDa) is a membrane receptor belonging to the immunoglobulin superfamily and induces downstream different intracellular signals. Globally, it is expressed at low levels in all human tissue, except in the lungs, where its expression is more important [73,74]. Structurally, the full-length RAGE (fl-RAGE) is composed of three domains: an extracellular domain (itself subdivided into three parts involved in ligand recognition: V, C1, and C2), a transmembrane domain, and a cytoplasmic portion required for signal transduction by its interaction with adaptor proteins (Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), Diaphanous-1 (Dia-1), and the Toll-interleukin 1 Receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP)) [75–78].

RAGE also exists in truncated forms. Two of them are soluble: sRAGE (soluble RAGE), which is derived from a proteolytic cleavage of fl-RAGE by specific metalloproteases, and esRAGE (endogenous secretory RAGE), which is derived from one specific splicing tran-

script [79,80]. Functionally, these two forms, which lack the transmembrane and intracellular domains, act as inhibitors of signal transduction by capturing RAGE ligands in the extracellular environment before their recognition by the functional fl-RAGE. There is also an isoform named DN-RAGE (dominant negative), which is addressed to the membrane but does not have an intracellular domain. Finally, Nt-RAGE (N-terminal truncated), resulting from alternative splicing, is V-domain lacking, so it cannot bind to the usual ligands (Figure 3) [74].

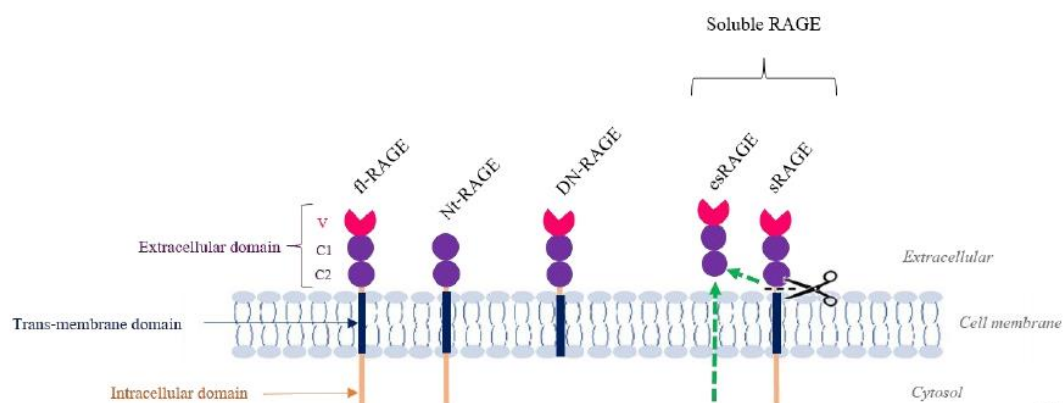


Figure 3. RAGE and its isoforms. This figure illustrates the different protein isoforms of RAGE. Only the full-length (fl-RAGE) version can exercise a complete signal transduction by first interacting with ligands with its extracellular domain (V: variable; C: constant) similar to immunoglobulins and then recruiting protein adaptors using its intracellular domain. Other isoforms, especially soluble ones (esRAGE, directly translated from a transcript, and sRAGE, resulting from an enzymatic cleavage of fl-RAGE), are implicated in the negative feedback of RAGE activity by competition. Finally, Nt-RAGE and DN-RAGE have also been briefly described in the literature.

3.2. RAGE, ligands, and signaling

Thanks to its multiple extracellular domains (V, C1, C2), RAGE can interact with a considerable panel of ligands, mainly endogenous ligands that are accumulated in tissues during aging, inflammation, and other stresses: the DAMPs are also called alarmins [81,82]. Among these ligands, RAGE can interact with the HMGB1, an S100 protein family, advanced glycation end-products (AGEs) derived from the Maillard reaction of glycation, cell-free DNA and RNA, uric acid... This diversity of ligands, which is associated with other factors such as cell type, ligand, or receptor concentration at the membrane or type of adaptors, allows RAGE to induce numerous signaling pathways, leading to various cell responses. For example, RAGE has been described in cell migration and proliferation but also in apoptosis [83,84]. A recent study also demonstrated that RAGE can induce autophagy [85]. Finally, one of the main roles of RAGE is its ability to initiate an inflammatory response [75].

3.3. RAGE and inflammation

In the literature, RAGE exhibits high levels of expression in the inflammatory lesions associated with many types of pathologies. On the other hand, blocking RAGE delays the inflammatory response [86]. For example, RAGE knockout mice are protected against inflammatory disorders (sepsis, smoking-induced lung inflammation, etc.) [87,88]. In addition, RAGE is expressed in many immune cells, and an accumulation of its ligands is often observed at inflammation sites [89–91]. The stimulation of RAGE initiates various pro-inflammatory pathways. For example, the NF κ B pathway was the first signal described as activated by AGEs [92]. This transcription factor regulates the expression of several

genes, including pro-inflammatory mediators (TNF α , IL1 β , IL6, cyclooxygenase 2, etc.) and RAGE itself, amplifying chronic inflammation [93]. Activation of RAGE by its ligands can also lead to the induction of MAP kinase signaling cascades, such as ERK, JNK, or p38-MAPK (Figure 4) [94,95].

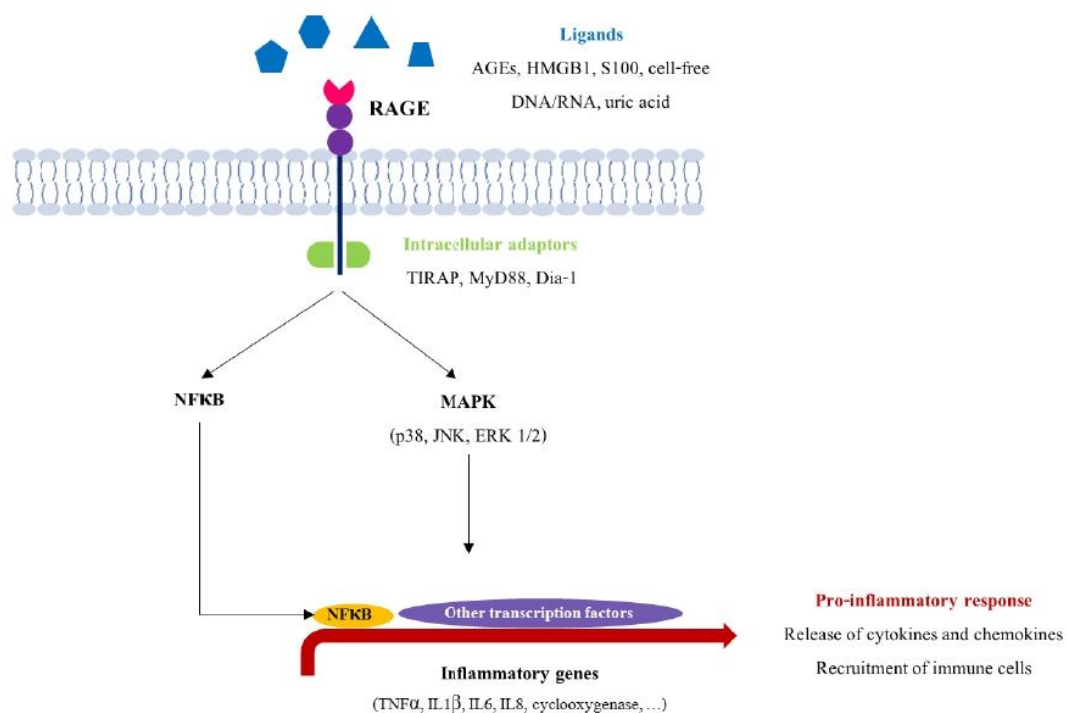


Figure 4. RAGE signaling pathway. Following the binding of its ligands, RAGE can induce different proinflammatory pathways, implicating some adaptor intracellular proteins (TIRAP, MyD88, Dia-1). This activation results in the induction of proinflammatory gene transcription (TNF α , cyclooxygenase 2, IL1 β , IL6, IL8), thus maintaining the inflammation phenomenon.

3.4. RAGE and fetal membranes rupture

Despite the well-described role of RAGE in inflammatory pathologies, only a few studies have investigated its potential implication in FM inflammation and their subsequent rupture. Romero et al. demonstrated higher AF levels of sRAGE and esRAGE in the presence of intra-amniotic inflammation and infection [96]. Nevertheless, under the same conditions, another study demonstrated that these levels are not impacted by the presence of intra-amniotic inflammation/infection, instead revealing the expression of RAGE within the amnion and chorion [97]. Later, other studies reported an increase in plasmatic esRAGE levels in pPROM but also in placental RAGE levels [63,98]. However, more recently, in 2020, another study found no significant difference in plasmatic sRAGE levels between pPROM and term rupture [99].

Concerning its ligands, DAMPs are found in AF and gestational tissues and are often dysregulated in cases of pregnancy pathologies such as pPROM. For example, overexpression of HMGB1 in the sera and placentas of mothers undergoing pPROM has been described [63,100]. In addition, a preliminary study supported the idea of using AGEs as an early (first trimester) serum marker of preterm labor and pPROM [101]. Furthermore, a direct link was demonstrated between the risk factors of pPROM (e.g., smoking) and the release or production of alarmins; for example, it has been well described that smoking induces alarmin release [102].

Nevertheless, a recent study clarified the implication of RAGE in FM weakening because of sterile inflammation [103]. Indeed, the ontogeny of the RAGE axis in FM obtained from nonpathological deliveries at term by cesarean produced the first data about the expression of its adaptors in these tissues, which is essential to RAGE activity. It was elucidated that the FM expressed RAGE and HMGB1 but also two intracellular adaptors (Dia-1 and MyD88) during the three trimesters of human pregnancy. Furthermore, the RAGE protein was identified in the amniotic epithelium, the first cells in contact with AF alarmins, and in the chorion too [103]. A comparison of the RAGE actors' expressions between the two layers of FM, but also between the ZAM (rupture zone, the weaker) and ZIM, revealed that RAGE and HMGB1 expression is significantly higher in the amnion compared with chorion. Even better, an overexpression of RAGE was found in the ZAM compared with the ZIM for the amnion (layer considered the stronger in FM) [103]. This suggests an overactivation of RAGE in the amnion around the zone of rupture, which is probably involved in its weakening. Romero et al. described an HMGB1-associated sterile inflammation on the fetal side of the FM [66]. Moreover, the overexpression of Dia-1 was revealed in amnion, whereas MyD88 was found overexpressed in chorion [103]. These differences could be considered a clue for layer-specific signaling, here depending on the recruited adaptor. Such consideration is supported by the fact that it is already well known that MyD88 is shared with TLR2/4 and TLR4 is highly expressed in the FM as well, opening the way to study the hypothesis of cooperation between RAGE and TLR4 in FM weakening [104].

In parallel, AGEs and HMGB1, which are both alarmins found to be increased in the case of pPROM, can induce the sterile inflammation of FM. Indeed, some studies have demonstrated that they induce cytokine release (IL8, IL6, TNF α , IL1 β) in the FM without a distinction between amnion and chorion [35,105]. Later, these first data were complemented by revealing that amnion and choriodecidua did not respond in the same way to the stimuli from alarmins. Both layers respond to alarmins by the release of TNF α and IL1 β , but only the amnion produced IL6 following the treatment. Above all, RAGE was found to be required in the FM layers to induce a pro-inflammatory signal after AGEs or HMGB1 exposure. Indeed, a total abortion of HMGB1-induced inflammation by the RAGE inhibitor was observed, but only partially decreased AGEs-induced inflammation [103]. These differences remind us of the complexity of RAGE activity, depending on the ligand type and ligand concentration. To conclude, recent data support the importance of RAGE engagement in FM sterile inflammation because of alarmins. Obviously, further studies are required to describe this RAGE activation in the FM, the adaptor recruitment and specificity of actions, here investigating downstream cell pathways (MAPK, NF κ B?), the type of cell responding in the tissue, and possible cooperation with other inflammation actors, such as the inflammasome platforms described below.

4. Inflammasomes

4.1. What are inflammasomes?

The first inflammasome was discovered in 2002 by the biochemist Jürg Tschopp [106]. This molecular platform can recognize, as a PRR, the DAMPs and PAMPs and induce inflammatory processes, especially pyroptosis, which is a recently described inflammation-specific cell death [107,108]. In fact, an inflammasome is an intracellular complex composed of three actors: a sensor, an effector (the pro-caspase 1), and an adaptor between the two previous parts. These inflammasomes are formed by cytosolic PRRs, such as NLRs; however, membrane PRR activation can stimulate the downstream formation of inflammasomes [109,110]. In this review, we focus on one subfamily of NLRs, the NLRPs (NLR and Pyrin domain containing), which includes 14 members: NLRP1 to NLRP14.

4.1.1 The NLRP inflammasome: the trio NLRP/ASC/pro-caspase 1

For this group, the inflammasome includes one NLRP as a sensor linked to the pro-caspase 1, here thanks to the ASC adaptor (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (CARD)). More precisely, a NLRP (except for NLRP1 and 10) is generally composed of these domains: a pyrin domain (PYD) followed by a central domain NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, TP1 proteins) involved in oligomerization; a domain associated with NACHT (NAD); and, finally, a carboxy terminal domain made of Leucine-rich repeats (LRR) [111–113]. During the assembly of the inflammasome, the NLRP interacts with the adaptor ASC because of the PYD domain of each actor. the ASC also contains a CARD domain that binds the CARD domain of pro-caspase 1 [114,115]. Caspases are divided into two classes: pro-apoptotic and pro-inflammatory caspases. Caspase 1 belongs to the second one and is included in the inflammasome as a pro-caspase 1 protein composed of three domains: CARD, p20, and p10 (Figure 5). Following such an association, inflammasomes assemble together, leading to the formation of a specific structure called specks [116–118].

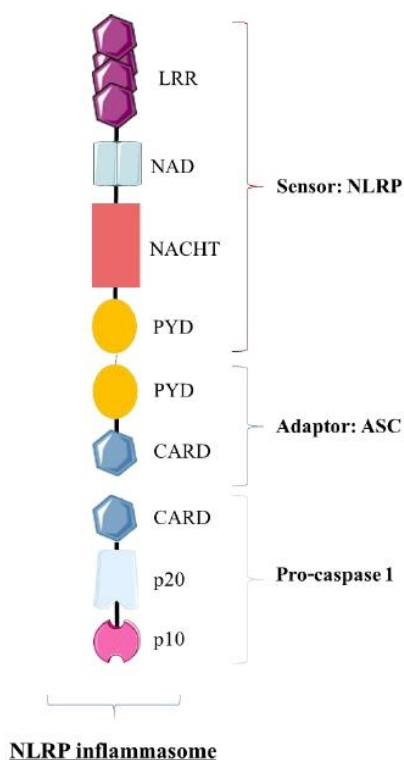


Figure 5. NLRP inflammasome structure. A NLRP inflammasome is composed of three major elements. First, there is a sensor, the receptor NLRP, which itself is generally composed of different domains: PYD (Pyrin domain), NACHT (acronym for NAIP, CIITA, HET-E, TP1), NAD (NACHT-associated domain), and LRR (Leucine-rich repeats). This LRR domain allows for an interaction with the adaptor ASC by the PYD domains. Then, ASC can recruit pro-caspase 1 thanks to the CARD (caspase recruitment domain) of each actor. In addition, pro-caspase 1 also contains a central p20 domain (including the catalytic site) and a p10 domain.

4.1.2 NLRP inflammasome activation

Based on studies about NLRP3, two activation pathways have been described. To form a functional NLRP inflammasome, the canonical pathway requires two steps: i) a priming

pro-inflammatory actor recruitment or transcription, here following DAMP/PAMP recognition by a PRR, and ii) induction of the assembly of an active multiprotein complex. Priming can allow for the transcription of NLRPs, ASC, pro-caspase 1, and pro-interleukins 18 and 1 β . Furthermore, non-transcriptional priming can occur and modulate the post-translational modifications required for inflammasome availability [119–122]. Once the inflammasome is assembled, the pro-caspase 1 is matured in caspase 1, which cleaves pro-IL18 and pro-IL1 β in active forms (triggering inflammation), and a protein named gasdermin D leads to the generation of an active N-terminal portion. Such final active portions assemble to form pores at the cell membrane, inducing pyroptosis (i.e., cell lysis) and inflammation through the consequent release of intracellular contents, including IL18, IL1 β , and inflammasomes specks, provoking an amplification of the inflammatory signal and immune cell recruitment [123–125] (Figure 6).

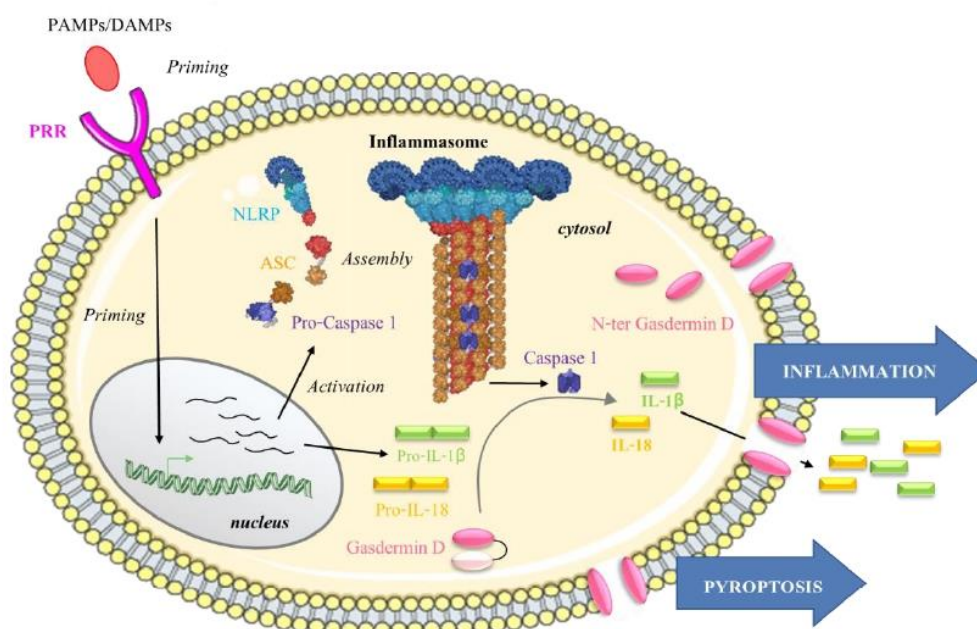


Figure 6. NLRP inflammasome activation. Following the priming step (transcriptional and/or not), the activated NLRP can form the inflammasome with ASC and pro-caspase 1. This functional NLRP inflammasome leads to the autolytic cleavage of pro-caspase 1 into caspase-1, which is the active enzyme. Downstream, caspase-1 activates the interleukins IL18 and IL1 β but also releases the N-terminal fragment of the gasdermin D from the inhibitory C-terminal fragment. Finally, a formation of pores by the N-terminal gasdermin D at the plasma membrane induces pyroptosis and propagation of the inflammatory signal [124,126,127].

Thus, regarding their inflammatory action, NLRP inflammasomes are already implicated in different pathogeneses, as is the case more often in pathological pregnancies.

4.2 NLRP Inflammasomes, FM diseases, and pPROM

Studies on the pathological implication of NLRP inflammasomes (especially NLRP3) have focused on preeclampsia, an obstetrical disease where the uric acid levels are particularly increased in the blood [128,135,136]. Indeed, uric acid has been found to provoke an ASC-dependent activation of caspase 1 and IL1 β release *in vitro*, which is associated with an overexpression of NLRP3 in human first trimester trophoblasts [137,138].

Furthermore, in the case of chorioamnionitis, a risk factor of pPROM, FM exhibits higher expression of inflammasome actors. In addition, one study demonstrated that AF from

mothers with intra-amniotic inflammation (IAI) or infection contains more important ASC levels [139,140]. These data implicate NLRP inflammasomes in septic or sterile inflammation occurring during chorioamnionitis, a disease affecting FM barrier integrity.

In preterm labor, the concentration of caspase-1 in the AF is higher if labor is associated with infection and/or IAI when compared with a situation of preterm labor without infection and/or inflammation [141]. Gasdermin D has also been detected in the AF and FM in preterm labor, suggesting that pyroptosis may be involved in preterm labor and PTB [142]. Therefore, preterm labor seems to involve inflammasomes, especially in the case of infection or IAI [143]. In addition, Motomura et al. demonstrated *in vivo* that IL1 α induces PTB through the NLRP3 inflammasome [144]. This NLRP3 implication is confirmed by Faro's team, who induced PTB in an animal model by LPS-induced IAI, a phenomenon that was reduced by the use of a specific inhibitor of NLRP3 [145].

Finally, one study shows that in pPROM, the expression of transcripts and proteins related to the inflammasome signaling pathway (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1) and NF κ B) are increased in the placenta and FM [146]. In addition, Theis et al. examined the AF in mothers undergoing pPROM. The results revealed a positive correlation between microbial burden and ASC and IL6 concentrations [147]. Recently, another study highlighted higher expression levels of NLRP3, NLRP1 inflammasomes, IL18, and IL1 β into the placenta and FM in the case of pPROM [148]. To conclude, all of these data demonstrate a clear link between NLRP inflammasomes and pPROM.

4.3 Focus on NLRP7

As detailed before, the NLRP family is composed of 14 members. Personal unpublished data identified the NLRP members expressed in the human amnion and chorion (collected at term) but also the inflammasome actors ASC and caspase-1 (Table 1).

Tissues	Transcripts		NLRPs														ASC	Caspase-1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
Term amnion	+	+	+	∅	∅	+	+	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+	+		
Term chorion	+	+	+	∅	∅	+	+	∅	+	+	∅	+	∅	+	+	+		

Table 1. Expression of the NLRP family in human FM. The mRNA expression of the 14 NLRPs, ASC, and caspase-1 was investigated by RT-qPCR in terms of human amnion and chorion. "+" indicates the presence of the transcripts, and "∅" indicates the absence of RNA expression.

In the obstetrical sphere, studies have been more focused on NLRP3, sometimes NLRP1, but some new data have recently emerged on NLRP7. In a more functional view, the NLRP7 inflammasome has been described as being involved in the activation of caspase-1 and IL1 β release following infection of THP-1 cells (monocytes cell line) by *Mycobacterium bovis*. This activation of the NLRP7 inflammasome induced cell death, which the authors suggested to be pyroptosis [149]. Another team focused on the post-translational modifications regulating NLRP7. Indeed, the NLRP7 protein is constitutively ubiquitinated and recruited to the endolysosome to be degraded. Upon stimulation by a pro-inflammatory ligand, the STAMBP (Signal transducing adaptor molecule binding protein) enzyme deubiquitinates NLRP7, preventing its degradation and allowing the formation of an active inflammasome that activates IL1 β [150]. Finally, Abi Nahed et al. recently demonstrated that the activation of the NLRP7 inflammasome in a trophoblastic cell line

induced the secretion of IL1 β but not IL18 [151]. Numerous studies have described the involvement of the NLRP7 inflammasome in some obstetrical complications, such as the recurrent hydatidiform mole (a disease characterized by an excessive trophoblastic proliferation without embryonic development), especially those related to mutations of NLRP7 [152–156]. In addition, the NLRP7 inflammasome is highly expressed by placental trophoblast cells and is deregulated in fetal growth restrictions, a disorder importantly related to abnormal placental development [151]. In addition, Tsai et al. demonstrated that NLRP7 relates to decidualization and macrophage differentiation, supporting their hypothesis of a multitasking gene implicated in endometrial hemostasis and reproductive success [157].

To conclude, NLRP7 seems important for inflammation response and pregnancy success. This is why, in the last part of this review, special emphasis will be placed on the emerging data about its implication in FM inflammation establishment.

4.4 Does NLRP7 play a role in FM rupture?

The presence of the three NLRP7 inflammasome actors (ASC, caspase 1, and NLRP7) has been characterized in the amnion and chorion but also in primary amniotic epithelial cells (AECs) that were collected from the FM of women with term deliveries. It suggests that this NLRP7 inflammasome can assemble in the FM at all stages of pregnancy [158]. According to the literature, only one ligand is known and has been used to specifically activate the NLRP7 inflammasome: fibroblast stimulating lipopeptide (FSL-1) [159]. FSL-1 is a synthetic lipopeptide derived from the lipoprotein of *Mycoplasma salivarium*, representing the N-terminal portion of the LP-44 lipoprotein of this mycoplasma [160]. It is strongly similar to another lipopeptide, MALP-2 (Macrophage-activating lipopeptide-2), which is derived from the lipoprotein of *Mycoplasma fermentans* [161]. Numerous studies have used FSL-1 on FM, amnion cells, or myometrial cells [22,162–171]; they allowed for the characterization of the signaling pathway induced by FSL-1, and they demonstrated an induction of the synthesis of pro-inflammatory mediators. The NLRP7 inflammasome, though specifically activated by this ligand, has been studied in the FM context in only one study [158].

Thus, Lavergne et al. demonstrated that AECs can form a functional NLRP7 inflammasome. More interestingly, the quantification of the expression of these three actors in the FM revealed an overexpression of ASC (in both layers of FM) at term with labor compared with term FM without labor [158]. This observation confirms the study of Gomez-Lopez et al., who described an increase of ASC/Caspase-1 complexes in the FM with labor [139]. No difference was found for NLRP7, whereas Romero et al. demonstrated an overexpression of NLRP3 protein in the FM with labor [172].

Furthermore, as previously mentioned, NLRP7 is activated by FSL-1, which is derived from *M. salivarium*, and similar to a lipoprotein from *M. fermentans*. Mycoplasmas have been studied extensively for their involvement in pPROM pathogenesis. Numerous mycoplasmas have been identified in the genital tract (*M. genitalium*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *Ureaplasma spp.*, etc.), and some of them have been found to be related to pPROM or chorioamnionitis [173–180]. Moreover, Lavergne et al. found the presence of *M. fermentans* and *M. salivarium* in healthy human FM after vaginal deliveries but also after cesarean deliveries, proving that bacteria detection was not because of contamination after crossing the genital tract. These observations imply a genital tract ascension, even in healthy carriers. However, it can be supposed that overproliferation might lead to a pathological outcome, like for the other mycoplasmas described in the literature.

In the aforementioned study, the *M. salivarium*-derived lipopeptide FSL-1 not only induced the expression of NLRP7 and caspase-1 in the AECs but also allowed the colocalization of ASC and NLRP7 around the nuclei, proving inflammasome assembly. In parallel, FSL-1 leads to an increase of IL1 β transcription but not IL18, bringing to the fore the study of Abi Nahed et al. on trophoblasts, where only an induction of IL1 β was found in response to NLRP7 inflammasome [151]. In addition, FSL-1 induces the cleavage of gasdermin D into its pyroptotic fragment. These experiments prove the importance of the NLRP family members, which are directly linked to cell death, inflammation, and DAMP release, all of which are mechanisms involved in FM rupture.

5. Conclusion

This review has summarized recent data about the implication of inflammation in FM weakening. Furthermore, two new actors seem particularly interesting to explore for their inflammatory ability: RAGE and NLRP7. Both might be overactivated in risk contexts (smoking, germs rising in excess, chorioamnionitis) and be involved in pPROM pathogenesis. More studies are required to know in detail the implication of RAGE and its adaptors, but also of NLRP inflammasome pathophysiological weakening of FM to elucidate the link between the materno-fetal exposome, the PAMP/DAMPome and pPROM.

Author Contributions: H.C wrote the manuscript with the help of M.L; L.B and V.S revised the manuscript. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

Funding: H.C was funded by a French ministerial grant. M.L was supported by Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes and the Région Auvergne Rhône-Alpes.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Thanks to Nadia Alfaidy for editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Naeye, R.L.; Peters, E.C. Causes and Consequences of Premature Rupture of Fetal Membranes. *Lancet* **1980**, *1*, 192–194, doi:10.1016/s0140-6736(80)90674-1.
- Romero, R.; Espinoza, J.; Kusanovic, J.P.; Gotsch, F.; Hassan, S.; Erez, O.; Chaiworapongsa, T.; Mazor, M. The Preterm Parturition Syndrome. *BJOG* **2006**, *113 Suppl 3*, 17–42, doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x.
- 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.
- Richardson, L.S.; Vargas, G.; Brown, T.; Ochoa, L.; Sheller-Miller, S.; Saade, G.R.; Taylor, R.N.; 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.
- Lavery, J.P.; Miller, C.E. The Viscoelastic Nature of Chorioamniotic Membranes. *Obstet Gynecol* **1977**, *50*, 467–472.
- Oyen, M.L.; Calvin, S.E.; Landers, D.V. 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.
- Verbruggen, S.W.; Oyen, M.L.; Phillips, A.T.M.; Nowlan, N.C. Function and Failure of the Fetal Membrane: Modelling the Mechanics of the Chorion and Amnion. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171588, doi:10.1371/journal.pone.0171588.

8. Prat, C.; Blanchon, L.; Borel, V.; Gallot, D.; Herbet, A.; Bouvier, D.; Marceau, G.; Sapin, V. Ontogeny of Aquaporins in Human Fetal Membranes. *Biology of Reproduction* **2012**, *86*, 48, doi:10.1095/biolreprod.111.095448. 503–504
9. Prat, C.; Bouvier, D.; Comptour, A.; Marceau, G.; Belville, C.; Clairefond, G.; Blanc, P.; Gallot, D.; Blanchon, L.; Sapin, V. All-Trans-Retinoic Acid Regulates Aquaporin-3 Expression and Related Cellular Membrane Permeability in the Human Amniotic Environment. *Placenta* **2015**, *36*, 881–887, doi:10.1016/j.placenta.2015.05.010. 505–507
10. Kobayashi, K.; Yasui, M. Cellular and Subcellular Localization of Aquaporins 1, 3, 8, and 9 in Amniotic Membranes during Pregnancy in Mice. *Cell and Tissue Research* **2010**, *342*, 307–316, doi:10.1007/s00441-010-1065-6. 508–509
11. Ashraf, H.; Font, K.; Powell, C.; Schurr, M. Antimicrobial Activity of an Amnion-Chorion Membrane to Oral Microbes. *Int J Dent* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/1269534. 510–511
12. Szukiewicz, D.; Alkhalayla, H.; Pyzlak, M.; Watroba, M.; Szewczyk, G.; Wejman, J. Human Beta-Defensin 1, 2 and 3 Production by Amniotic Epithelial Cells with Respect to Human Papillomavirus (HPV) Infection, HPV Oncogenic Potential and the Mode of Delivery. *Microb. Pathog.* **2016**, *97*, 154–165, doi:10.1016/j.micpath.2016.06.010. 512–514
13. 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. 515–516
14. Kobayashi, K.; Miwa, H.; Yasui, M. Inflammatory Mediators Weaken the Amniotic Membrane Barrier through Disruption of Tight Junctions. *J. Physiol. (Lond.)* **2010**, *588*, 4859–4869, doi:10.1113/jphysiol.2010.197764. 517–518
15. Kobayashi, K.; Kadohira, I.; Tanaka, M.; Yoshimura, Y.; Ikeda, K.; Yasui, M. Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in Human Amnion during Late Pregnancy. *Placenta* **2010**, *31*, 158–162, doi:10.1016/j.placenta.2009.11.014. 519–521
16. Caughey, A.B.; Robinson, J.N.; Norwitz, E.R. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Rev Obstet Gynecol* **2008**, *1*, 11–22. 522–523
17. Moore, R.M.; Mansour, J.M.; Redline, R.W.; Mercer, B.M.; Moore, J.J. 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. 524–526
18. El Khwad, M.; Stetzer, B.; Moore, R.M.; Kumar, D.; Mercer, B.; Arikat, S.; Redline, R.W.; Mansour, J.M.; Moore, J.J. Term Human Fetal Membranes Have a Weak Zone Overlying the Lower Uterine Pole and Cervix Before Onset of Labor. *Biology of Reproduction* **2005**, *72*, 720–726, doi:10.1095/biolreprod.104.033647. 527–529
19. 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. 530–532
20. Chai, M.; Walker, S.P.; Riley, C.; Rice, G.E.; 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*, 316146, doi:10.1155/2013/316146. 533–535
21. Colatto, B.N.; de Souza, I.F.; Schinke, L.A.A.; Noda-Nicolau, N.M.; da Silva, M.G.; Morceli, G.; Menon, R.; Poletini, J. Telomere Length and Telomerase Activity in Foetal Membranes from Term and Spontaneous Preterm Births. *Reprod Sci* **2020**, *27*, 411–417, doi:10.1007/s43032-019-00054-z. 536–538
22. Lim, R.; Barker, G.; Lappas, M. SMAD7 Regulates Proinflammatory and Prolabor Mediators in Amnion and Myometrium. *Biol Reprod* **2017**, *97*, 288–301, doi:10.1093/biolre/iox080. 539–540
23. Richardson, L.S.; Taylor, R.N.; Menon, R. Reversible EMT and MET Mediate Amnion Remodeling during Pregnancy and Labor. *Sci. Signal.* **2020**, *13*, eaay1486, doi:10.1126/scisignal.aay1486. 541–542

24. 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. *J Immunol* **2017**, *198*, 1345–1356, doi:10.4049/jimmunol.1601482. 543–545
25. Nhan-Chang, C.-L.; Romero, R.; Tarca, A.L.; Mittal, P.; Kusanovic, J.P.; Erez, O.; Mazaki-Tovi, S.; Chaiworapongsa, T.; Hotra, J.; Than, N.G.; 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.e1–41, doi:10.1016/j.ajog.2010.02.045. 546–548
26. Cox, S.M.; Casey, M.L.; MacDonald, P.C. 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. 549–550
27. Maymon, E.; Ghezzi, F.; Edwin, S.S.; Mazor, M.; Yoon, B.H.; 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. 551–553
28. Menon, R.; Lombardi, S.J.; Fortunato, S.J. TNF-Alpha Promotes Caspase Activation and Apoptosis in Human Fetal Membranes. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2002**, *19*, 201–204. 554–555
29. 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. 556–558
30. Trautman, M.S.; Dudley, D.J.; Edwin, S.S.; Collmer, D.; Mitchell, M.D. Amnion Cell Biosynthesis of Interleukin-8: Regulation by Inflammatory Cytokines. *J Cell Physiol* **1992**, *153*, 38–43, doi:10.1002/jcp.1041530107. 559–560
31. Kumar, D.; Fung, W.; Moore, R.M.; Pandey, V.; Fox, J.; Stetzer, B.; Mansour, J.M.; Mercer, B.M.; Redline, R.W.; Moore, J.J. Proinflammatory Cytokines Found in Amniotic Fluid Induce Collagen Remodeling, Apoptosis, and Biophysical Weakening of Cultured Human Fetal Membranes¹. *Biology of Reproduction* **2006**, *74*, 29–34, doi:10.1095/biolreprod.105.045328. 561–564
32. Kumar, D.; Schatz, F.; Moore, R.; Mercer, B.; Rangaswamy, N.; Mansour, J.; Lockwood, C.; Moore, J. The Effects of Thrombin and Cytokines upon the Biomechanics and Remodeling of Isolated Amnion Membrane, in Vitro. *Placenta* **2011**, *32*, 206–213, doi:10.1016/j.placenta.2011.01.006. 565–567
33. Sheller-Miller, S.; Trivedi, J.; Yellon, S.M.; Menon, R. Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy. *Sci Rep* **2019**, *9*, 608, doi:10.1038/s41598-018-37002-x. 568–569
34. Bredeson, S.; Papaconstantinou, J.; Deford, J.H.; Kechichian, T.; Syed, T.A.; Saade, G.R.; Menon, R. HMGB1 Promotes a P38MAPK Associated Non-Infectious Inflammatory Response Pathway in Human Fetal Membranes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113799, doi:10.1371/journal.pone.0113799. 570–572
35. Lappas, M.; Permezel, M.; Rice, G.E. Advanced Glycation Endproducts Mediate Pro-Inflammatory Actions in Human Gestational Tissues via Nuclear Factor- B and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2. *Journal of Endocrinology* **2007**, *193*, 269–277, doi:10.1677/JOE-06-0081. 573–575
36. Olive, C. Pattern Recognition Receptors: Sentinels in Innate Immunity and Targets of New Vaccine Adjuvants. *Expert Rev Vaccines* **2012**, *11*, 237–256, doi:10.1586/erv.11.189. 576–577
37. Hangai, S.; Kimura, Y.; Taniguchi, T.; Yanai, H. Signal Transducing Innate Receptors in Tumor Immunity. *Cancer Sci* **2021**, doi:10.1111/cas.14848. 578–579
38. Blanchon, L.; Accoceberry, M.; Belville, C.; Delabaere, A.; Prat, C.; Lemery, D.; Sapin, V.; Gallot, D. [Rupture of membranes: pathophysiology, diagnosis, consequences and management]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **2013**, *42*, 105–116, doi:10.1016/j.jgyn.2012.12.012. 580–582
39. Menon, R.; Richardson, L.S. Preterm Prelabor Rupture of the Membranes: A Disease of the Fetal Membranes. *Seminars in Perinatology* **2017**, *41*, 409–419, doi:10.1053/j.semperi.2017.07.012. 583–584

40. Furman, B.; Shoham-Vardi, I.; Bashiri, A.; Erez, O.; Mazor, M. Clinical Significance and Outcome of Preterm Prelabor Rupture of Membranes: Population-Based Study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2000**, *92*, 209–216, doi:10.1016/s0301-2115(99)00257-2. 585–587
41. Ananth, C.V.; Oyelese, Y.; Srinivas, N.; Yeo, L.; Vintzileos, A.M. Preterm Premature Rupture of Membranes, Intrauterine Infection, and Oligohydramnios: Risk Factors for Placental Abruption. *Obstet Gynecol* **2004**, *104*, 71–77, doi:10.1097/01.AOG.0000128172.71408.a0. 588–590
42. Middleton, P.; Shepherd, E.; Flenady, V.; McBain, R.D.; Crowther, C.A. Planned Early Birth versus Expectant Management (Waiting) for Prelabour Rupture of Membranes at Term (37 Weeks or More). *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *1*, CD005302, doi:10.1002/14651858.CD005302.pub3. 591–593
43. Newton, E.R. Preterm Labor, Preterm Premature Rupture of Membranes, and Chorioamnionitis. *Clin Perinatol* **2005**, *32*, 571–600, doi:10.1016/j.clp.2005.05.001. 594–595
44. Platt, M.J. Outcomes in Preterm Infants. *Public Health* **2014**, *128*, 399–403, doi:10.1016/j.puhe.2014.03.010. 596
45. Bouvier, D.; Forest, J.-C.; Blanchon, L.; Bujold, E.; Pereira, B.; Bernard, N.; Gallot, D.; Sapin, V.; Giguère, Y. Risk Factors and Outcomes of Preterm Premature Rupture of Membranes in a Cohort of 6968 Pregnant Women Prospectively Recruited. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8111987. 597–599
46. Forde, B.; Habli, M. Unique Considerations: Preterm Prelabor Rupture of Membranes in the Setting of Fetal Surgery and Higher Order Pregnancies. *Obstet Gynecol Clin North Am* **2020**, *47*, 653–669, doi:10.1016/j.ogc.2020.08.008. 600–601
47. Modi, B.P.; Teves, M.E.; Pearson, L.N.; Parikh, H.I.; Haymond-Thornburg, H.; Tucker, J.L.; Chaemsaitong, P.; Gomez-Lopez, N.; York, T.P.; 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. 602–605
48. Dorfeuille, N.; Morin, V.; Tétu, A.; Demers, S.; Laforest, G.; Gouin, K.; Piedboeuf, B.; Bujold, E. Vaginal Fluid Inflammatory Biomarkers and the Risk of Adverse Neonatal Outcomes in Women with PPRM. *Am J Perinatol* **2016**, *33*, 1003–1007, doi:10.1055/s-0036-1582130. 606–608
49. Galaz, J.; Romero, R.; Slutsky, R.; Xu, Y.; Motomura, K.; Para, R.; Pacora, P.; Panaitescu, B.; Hsu, C.-D.; Kacerovsky, M.; et al. Cellular Immune Responses in Amniotic Fluid of Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *J Perinat Med* **2020**, *48*, 222–233, doi:10.1515/jpm-2019-0395. 609–611
50. Romero, R.; Miranda, J.; Chaemsaitong, P.; Chaiworapongsa, T.; Kusanovic, J.P.; Dong, Z.; Ahmed, A.I.; Shaman, M.; Lannaman, K.; Yoon, B.H.; et al. Sterile and Microbial-Associated Intra-Amniotic Inflammation in Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **2015**, *28*, 1394–1409, doi:10.3109/14767058.2014.958463. 612–615
51. Menon, R.; Lombardi, S.J.; Fortunato, S.J. IL-18, a Product of Chorionic Decidua 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. 616–618
52. 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, doi:10.1016/s0020-7292(02)00238-2. 619–621
53. Vajrychová, M.; Stráňík, J.; Pimková, K.; Barman, M.; Kukla, R.; Zedníková, P.; Bolehovská, R.; Plíšková, L.; Hornychová, H.; Andráš, C.; et al. Comprehensive Proteomic Investigation of Infectious and Inflammatory Changes in Late Preterm Prelabour Rupture of Membranes. *Sci Rep* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-020-74756-9. 622–623

55. Ronzoni, S.; Steckle, V.; D'Souza, R.; Murphy, K.E.; Lye, S.; Shynlova, O. Cytokine Changes in Maternal Peripheral Blood Correlate With Time-to-Delivery in Pregnancies Complicated by Premature Prelabor Rupture of the Membranes. *Reprod Sci* **2019**, *26*, 1266–1276, doi:10.1177/1933719118815590. 632–634
56. Raba, G.; Kacerovsky, M.; Laudański, P. Eotaxin-2 as a Potential Marker of Preterm Premature Rupture of Membranes: A Prospective, Cohort, Multicenter Study. *Adv Clin Exp Med* **2021**, *30*, 197–202, doi:10.17219/acem/130609. 635–637
57. Seliger, G.; Bergner, M.; Haase, R.; Stepan, H.; Schleußner, E.; Zöllkau, J.; Seeger, S.; Kraus, F.B.; Hiller, G.G.R.; Wienke, A.; et al. Daily Monitoring of Vaginal Interleukin 6 as a Predictor of Intraamniotic Inflammation after Preterm Premature Rupture of Membranes - a New Method of Sampling Studied in a Prospective Multicenter Trial. *J Perinat Med* **2021**, doi:10.1515/jpm-2020-0406. 638–641
58. Li, W.; Zhao, X.; Li, S.; Chen, X.; Cui, H.; Chang, Y.; Zhang, R. Upregulation of TNF- α and IL-6 Induces Preterm Premature Rupture of Membranes by Activation of ADAMTS-9 in Embryonic Membrane Cells. *Life Sci* **2020**, *260*, 118237, doi:10.1016/j.lfs.2020.118237. 642–644
59. 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 Chorion with Lipopolysaccharides or Group B Streptococci. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 1296–1302, doi:10.1095/biolreprod.104.028621. 645–648
60. 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. 649–652
61. Romero, R.; Miranda, J.; Chaiworapongsa, T.; Korzeniewski, S.J.; Chaemsaitong, P.; Gotsch, F.; Dong, Z.; Ahmed, A.I.; Yoon, B.H.; Hassan, S.S.; et al. Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-Amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology* **2014**, *72*, 458–474, doi:10.1111/aji.12296. 653–656
62. Baumbusch, M.A.; Buhimschi, C.S.; Oliver, E.A.; Zhao, G.; Thung, S.; Rood, K.; Buhimschi, I.A. 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. 657–660
63. Yan, H.; Zhu, L.; Zhang, Z.; Li, H.; Li, P.; Wang, Y.; Leng, M. HMGB1-RAGE Signaling Pathway in PPRM. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **2018**, *57*, 211–216, doi:10.1016/j.tjog.2018.02.008. 661–662
64. Chaiworapongsa, T.; Erez, O.; Kusanovic, J.P.; Vaisbuch, E.; Mazaki-Tovi, S.; Gotsch, F.; Than, N.G.; Mittal, P.; Kim, Y.M.; Camacho, N.; et al. Amniotic Fluid Heat Shock Protein 70 Concentration in Histologic Chorioamnionitis, Term and Preterm Parturition. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2008**, *21*, 449–461, doi:10.1080/14767050802054550. 663–666
65. Friel, L.A.; Romero, R.; Edwin, S.; Nien, J.K.; Gomez, R.; Chaiworapongsa, T.; Kusanovic, J.P.; Tolosa, J.E.; Hassan, S.S.; Espinoza, J. The Calcium Binding Protein, S100B, Is Increased in the Amniotic Fluid of Women with Intra-Amniotic Infection/Inflammation and Preterm Labor with Intact or Ruptured Membranes. *J Perinat Med* **2007**, *35*, 385–393, doi:10.1515/JPM.2007.101. 667–670
66. Romero, R.; Chaiworapongsa, T.; Savasan, Z.A.; Xu, Y.; Hussein, Y.; Dong, Z.; Kusanovic, J.P.; Kim, C.J.; Hassan, S.S. Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Preterm Labor with Intact Membranes and Preterm 671–672

- PROM: A Study of the Alarmin HMGB1. *J Matern Fetal Neonatal Med* **2011**, *24*, 1444–1455, doi:10.3109/14767058.2011.591460. 673
674
67. van Boeckel, S.R.; Davidson, D.J.; Norman, J.E.; Stock, S.J. Cell-Free Fetal DNA and Spontaneous Preterm Birth. *Reproduction* **2018**, *155*, R137–R145, doi:10.1530/REP-17-0619. 675
676
68. Golubinskaya, V.; Puttonen, H.; Fyhr, I.-M.; Rydbeck, H.; Hellström, A.; Jacobsson, B.; Nilsson, H.; Mallard, C.; Sävman, K. Expression of S100A Alarmins in Cord Blood Monocytes Is Highly Associated With Chorioamnionitis and Fetal Inflammation in Preterm Infants. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01194. 677
678
679
69. Kacerovsky, M.; Vlkova, B.; Musilova, I.; Andrys, C.; Pliskova, L.; Zemlickova, H.; Stranik, J.; Halada, P.; Jacobsson, B.; Celec, P. Amniotic Fluid Cell-Free DNA in Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *Prenat Diagn* **2018**, *38*, 1086–1095, doi:10.1002/pd.5366. 680
681
682
70. Menon, R.; Behnia, F.; Poletini, J.; Saade, G.R.; Campisi, J.; Velarde, M. Placental Membrane Aging and HMGB1 Signaling Associated with Human Parturition. *Aging* **2016**, *8*, 216–230, doi:10.18632/aging.100891. 683
684
71. Padron, J.G.; Saito Reis, C.A.; Kendal-Wright, C.E. The Role of Danger Associated Molecular Patterns in Human Fetal Membrane Weakening. *Front Physiol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphys.2020.00602. 685
686
72. Sheller-Miller, S.; Radnaa, E.; Yoo, J.-K.; Kim, E.; Choi, K.; Kim, Y.; Kim, Y.N.; Richardson, L.; Choi, C.; Menon, R. Exosomal Delivery of NF-KB Inhibitor Delays LPS-Induced Preterm Birth and Modulates Fetal Immune Cell Profile in Mouse Models. *Sci Adv* **2021**, *7*, doi:10.1126/sciadv.abd3865. 687
688
689
73. Bongarzone, S.; Savickas, V.; Luzi, F.; Gee, A.D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 7213–7232, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00058. 690
691
692
74. Barbezier, N.; Tessier, F.J.; Chango, A. [Receptor of advanced glycation endproducts RAGE/AGER: an integrative view for clinical applications]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **2014**, *72*, 669–680, doi:10.1684/abc.2014.1010. 693
694
75. Kierdorf, K.; Fritz, G. RAGE Regulation and Signaling in Inflammation and Beyond. *Journal of Leukocyte Biology* **2013**, *94*, 55–68, doi:10.1189/jlb.1012519. 695
696
76. Sorci, G.; Riuzzi, F.; Giambanco, I.; Donato, R. RAGE in Tissue Homeostasis, Repair and Regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2013**, *1833*, 101–109, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.021. 697
698
77. Hudson, B.I.; Kalea, A.Z.; Del Mar Arriero, M.; Harja, E.; Boulanger, E.; D'Agati, V.; Schmidt, A.M. Interaction of the RAGE Cytoplasmic Domain with Diaphanous-1 Is Required for Ligand-Stimulated Cellular Migration through Activation of Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34457–34468, doi:10.1074/jbc.M801465200. 699
700
701
78. Sakaguchi, M.; Murata, H.; Yamamoto, K.; Ono, T.; Sakaguchi, Y.; Motoyama, A.; Hibino, T.; Kataoka, K.; Huh, N. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23132, doi:10.1371/journal.pone.0023132. 702
703
704
79. Raucci, A.; Cugusi, S.; Antonelli, A.; Barabino, S.M.; Monti, L.; Bierhaus, A.; Reiss, K.; Saftig, P.; Bianchi, M.E. A Soluble Form of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) Is Produced by Proteolytic Cleavage of the Membrane-Bound Form by the Sheddase a Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* **2008**, *22*, 3716–3727, doi:10.1096/fj.08-109033. 705
706
707
708
80. Zhang, L.; Bukulin, M.; Kojro, E.; Roth, A.; Metz, V.V.; Fahrenholz, F.; Nawroth, P.P.; Bierhaus, A.; Postina, R. Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 35507–35516, doi:10.1074/jbc.M806948200. 709
710
711
81. 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. 712
713

82. Schmidt, A.M.; Yan, S.D.; Yan, S.F.; Stern, D.M. The Biology of the Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1498*, 99–111, doi:10.1016/s0167-4889(00)00087-2. 714 715
83. Sakaguchi, M.; Kinoshita, R.; Putranto, E.W.; Ruma, I.M.W.; Sumardika, I.W.; Youyi, C.; Tomonobu, N.; Yamamoto, K.-I.; Murata, H. Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Acta Med. Okayama* **2017**, *71*, 459–465, doi:10.18926/AMO/55582. 716 717 718
84. Tsoporis, J.N.; Izhar, S.; Leong-Poi, H.; Desjardins, J.-F.; Huttunen, H.J.; Parker, T.G. S100B Interaction With the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): A Novel Receptor-Mediated Mechanism for Myocyte Apoptosis Postinfarction. *Circulation Research* **2010**, *106*, 93–101, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.195834. 719 720 721
85. Zhang, Q.; Raouf, M.; Chen, Y.; Sumi, Y.; Sursal, T.; Junger, W.; Brohi, K.; Itagaki, K.; Hauser, C.J. Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury. *Nature* **2010**, *464*, 104–107, doi:10.1038/nature08780. 722 723 724
86. Hofmann, M.A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; et al. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* **1999**, *97*, 889–901. 725 726 727
87. Xie, J.; Méndez, J.D.; Méndez-Valenzuela, V.; Aguilar-Hernández, M.M. Cellular Signalling of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *Cellular Signalling* **2013**, *25*, 2185–2197, doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.013. 728 729 730
88. Liliensiek, B.; Weigand, M.A.; Bierhaus, A.; Nicklas, W.; Kasper, M.; Hofer, S.; Plachky, J.; Gröne, H.-J.; Kurschus, F.C.; Schmidt, A.M.; et al. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Regulates Sepsis but Not the Adaptive Immune Response. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *113*, 1641–1650, doi:10.1172/JCI18704. 731 732 733
89. Chen, Y.; Akirav, E.M.; Chen, W.; Henegariu, O.; Moser, B.; Desai, D.; Shen, J.M.; Webster, J.C.; Andrews, R.C.; Mjalli, A.M.; et al. RAGE Ligation Affects T Cell Activation and Controls T Cell Differentiation. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4272–4278, doi:10.4049/jimmunol.181.6.4272. 734 735 736
90. Chuah, Y.K.; Basir, R.; Talib, H.; Tie, T.H.; Nordin, N. Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. *International Journal of Inflammation* **2013**, *2013*, 1–15, doi:10.1155/2013/403460. 737 738 739
91. Collison, K.S.; Parhar, R.S.; Saleh, S.S.; Meyer, B.F.; Kwaasi, A.A.; Hammami, M.M.; Schmidt, A.M.; Stern, D.M.; Al-Mohanna, F.A. RAGE-Mediated Neutrophil Dysfunction Is Evoked by Advanced Glycation End Products (AGEs). *J. Leukoc. Biol.* **2002**, *71*, 433–444. 740 741 742
92. Yan, S.D.; Schmidt, A.M.; Anderson, G.M.; Zhang, J.; Brett, J.; Zou, Y.S.; Pinsky, D.; Stern, D. Enhanced Cellular Oxidant Stress by the Interaction of Advanced Glycation End Products with Their Receptors/Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 9889–9897. 743 744 745
93. Li, J.; Schmidt, A.M. Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16498–16506, doi:10.1074/jbc.272.26.16498. 746 747
94. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and Alarmins: All We Need to Know about Danger. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 1–5, doi:10.1189/jlb.0306164. 748 749
95. Bopp, C.; Bierhaus, A.; Hofer, S.; Bouchon, A.; Nawroth, P.P.; Martin, E.; Weigand, M.A. Bench-to-Bedside Review: The Inflammation-Perpetuating Pattern-Recognition Receptor RAGE as a Therapeutic Target in Sepsis. *Critical Care* **2007**, *12*, 201, doi:10.1186/cc6164. 750 751 752
96. Romero, R.; Espinoza, J.; Hassan, S.; Gotsch, F.; Kusanovic, J.P.; Avila, C.; Erez, O.; Edwin, S.; Schmidt, A.M. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (SRAGE) and Endogenous Secretory RAGE (EsRAGE) in 753 754

97. Buhimschi, I.A.; Zhao, G.; Pettker, C.M.; Bahtiyar, M.O.; Magloire, L.K.; Thung, S.; Fairchild, T.; Buhimschi, C.S. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) System in Women with Intraamniotic Infection and Inflammation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2007**, *196*, 181.e1–181.e13, doi:10.1016/j.ajog.2006.09.001. 749–751
98. Rzepka, R.; Dołęgowska, B.; Salata, D.; Rajewska, A.; Budkowska, M.; Domański, L.; Kwiatkowski, S.; Mikołajek-Bedner, W.; Torbé, A. Soluble Receptors for Advanced Glycation End Products and Receptor Activator of NF- κ B Ligand Serum Levels as Markers of Premature Labor. *BMC Pregnancy and Childbirth* **2015**, *15*, 134, doi:10.1186/s12884-015-0559-3. 752–755
99. Bouvier, D.; Giguère, Y.; Blanchon, L.; Bujold, E.; Pereira, B.; Bernard, N.; Gallot, D.; Sapin, V.; Forest, J.-C. Study of SRAGE, HMGB1, AGE, and S100A8/A9 Concentrations in Plasma and in Serum-Extracted Extracellular Vesicles of Pregnant Women With Preterm Premature Rupture of Membranes. *Frontiers in Physiology* **2020**, *11*, 609, doi:10.3389/fphys.2020.00609. 756–759
100. Qiu, X.-Y.; Sun, L.; Han, X.-L.; Chang, Y.; Cheng, L.; Yin, L.-R. Alarmin High Mobility Group Box-1 in Maternal Serum as a Potential Biomarker of Chorioamnionitis-Associated Preterm Birth. *Gynecol Endocrinol* **2017**, *33*, 128–131, doi:10.1080/09513590.2016.1214260. 760–762
101. Kansu-Celik, H.; Tasci, Y.; Karakaya, B.K.; Cinar, M.; Candar, T.; Caglar, G.S. Maternal Serum Advanced Glycation End Products Level as an Early Marker for Predicting Preterm Labor/PPROM: A Prospective Preliminary Study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2019**, *32*, 2758–2762, doi:10.1080/14767058.2018.1449202. 763–765
102. Pouwels, S.D.; Hesse, L.; Faiz, A.; Lubbers, J.; Bodha, P.K.; ten Hacken, N.H.T.; van Oosterhout, A.J.M.; Nawijn, M.C.; Heijink, I.H. Susceptibility for Cigarette Smoke-Induced DAMP Release and DAMP-Induced Inflammation in COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2016**, *311*, L881–L892, doi:10.1152/ajplung.00135.2016. 766–769
103. Choltus, H.; Lavergne, M.; Belville, C.; Gallot, D.; Minet-Quinard, R.; Durif, J.; Blanchon, L.; Sapin, V. Occurrence of a RAGE-Mediated Inflammatory Response in Human Fetal Membranes. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphys.2020.00581. 770–772
104. Robertson, S.A.; Hutchinson, M.R.; Rice, K.C.; Chin, P.; Moldenhauer, L.M.; Stark, M.J.; Olson, D.M.; Keelan, J.A. Targeting Toll-like Receptor-4 to Tackle Preterm Birth and Fetal Inflammatory Injury. *Clin Transl Immunology* **2020**, *9*, doi:10.1002/cti2.1121. 773–775
105. Plazyo, O.; Romero, R.; Unkel, R.; Balancio, A.; Mial, T.N.; Xu, Y.; Dong, Z.; Hassan, S.S.; Gomez-Lopez, N. HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biology of Reproduction* **2016**, *95*, 130–130, doi:10.1095/biolreprod.116.144139. 776–778
106. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of ProIL-Beta. *Mol Cell* **2002**, *10*, 417–426, doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3. 779–781
107. Gomez, A.; Serrano, A.; Salero, E.; Tovar, A.; Amescua, G.; Galor, A.; Keane, R.W.; Pablo de Rivero Vaccari, J.; Sabater, A.L. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interferon-Gamma Induce Inflammasome-Mediated Corneal Endothelial Cell Death. *Exp Eye Res* **2021**, *207*, 108574, doi:10.1016/j.exer.2021.108574. 782–784
108. Paik, S.; Kim, J.K.; Silwal, P.; Sasakawa, C.; Jo, E.-K. An Update on the Regulatory Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell Mol Immunol* **2021**, doi:10.1038/s41423-021-00670-3. 785–786
109. de Vasconcelos, N.M.; Lamkanfi, M. Recent Insights on Inflammasomes, Gasdermin Pores, and Pyroptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2020**, *12*, doi:10.1101/cshperspect.a036392. 787–788
110. Dubois, H.; Wullaert, A.; Lamkanfi, M. General Strategies in Inflammasome Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **2016**, *397*, 1–22, doi:10.1007/978-3-319-41171-2_1. 789–790

111. 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. *Mol Hum Reprod* **2014**, *20*, 990–1001, doi:10.1093/molehr/gau060. 791–793
112. Istomin, A.Y.; 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. 794–796
113. Yeretssian, G. Effector Functions of NLRs in the Intestine: Innate Sensing, Cell Death, and Disease. *Immunol Res* **2012**, *54*, 25–36, doi:10.1007/s12026-012-8317-3. 797–798
114. Malik, A.; Kanneganti, T.-D. Inflammasome Activation and Assembly at a Glance. *J Cell Sci* **2017**, *130*, 3955–3963, doi:10.1242/jcs.207365. 799–800
115. Dick, M.S.; Sborgi, L.; Rühl, S.; Hiller, S.; Broz, P. ASC Filament Formation Serves as a Signal Amplification Mechanism for Inflammasomes. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11929, doi:10.1038/ncomms11929. 801–802
116. Pop, C.; Salvesen, G.S. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 21777–21781, doi:10.1074/jbc.R800084200. 803–804
117. Boucher, D.; Monteleone, M.; Coll, R.C.; Chen, K.W.; Ross, C.M.; Teo, J.L.; Gomez, G.A.; Holley, C.L.; Bierschenk, D.; Stacey, K.J.; et al. Caspase-1 Self-Cleavage Is an Intrinsic Mechanism to Terminate Inflammasome Activity. *J Exp Med* **2018**, *215*, 827–840, doi:10.1084/jem.20172222. 805–807
118. Kesavardhana, S.; Malireddi, R.K.S.; Kanneganti, T.-D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol* **2020**, *38*, 567–595, doi:10.1146/annurev-immunol-073119-095439. 808–809
119. Gros Lambert, M.; Py, B.F. Spotlight on the NLRP3 Inflammasome Pathway. *J Inflamm Res* **2018**, *11*, 359–374, doi:10.2147/JIR.S141220. 810–811
120. 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. 812–814
121. Juliana, C.; Fernandes-Alnemri, T.; Kang, S.; Farias, A.; Qin, F.; Alnemri, E.S. Non-Transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 36617–36622, doi:10.1074/jbc.M112.407130. 815–817
122. Kesavardhana, S.; Kanneganti, T.-D. Mechanisms Governing Inflammasome Activation, Assembly and Pyroptosis Induction. *Int Immunol* **2017**, *29*, 201–210, doi:10.1093/intimm/dxx018. 818–819
123. Evavold, C.L.; Ruan, J.; Tan, Y.; Xia, S.; Wu, H.; Kagan, J.C. 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. 820–821
124. Monteleone, M.; Stanley, A.C.; Chen, K.W.; Brown, D.L.; Bezbradica, J.S.; von Pein, J.B.; Holley, C.L.; Boucher, D.; Shakespear, M.R.; 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. 822–825
125. 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. 826–828
126. Boucher, D.; Monteleone, M.; Coll, R.C.; Chen, K.W.; Ross, C.M.; Teo, J.L.; Gomez, G.A.; Holley, C.L.; Bierschenk, D.; Stacey, K.J.; et al. Caspase-1 Self-Cleavage Is an Intrinsic Mechanism to Terminate Inflammasome Activity. *J Exp Med* **2018**, *215*, 827–840, doi:10.1084/jem.20172222. 829–831

127. Chan, A.H.; Schroder, K. Inflammasome Signaling and Regulation of Interleukin-1 Family Cytokines. *J Exp Med* **2019**, *217*, e20190314, doi:10.1084/jem.20190314. 832
833
128. Zhou, F.; Li, C.; Zhang, S.-Y. NLRP3 Inflammasome: A New Therapeutic Target for High-Risk Reproductive Disorders? *Chin Med J (Engl)* **2020**, *134*, 20–27, doi:10.1097/CM9.0000000000001214. 834
835
129. Lahooti, B.; Chhibber, T.; Bagchi, S.; Varahachalam, S.P.; Jayant, R.D. Therapeutic Role of Inflammasome Inhibitors in Neurodegenerative Disorders. *Brain Behav Immun* **2021**, *91*, 771–783, doi:10.1016/j.bbi.2020.11.004. 836
837
130. Sarmah, D.; Datta, A.; Raut, S.; Sarkar, A.; Shah, B.; Bohra, M.; Singh, U.; Jagtap, P.; Baidya, F.; Kalia, K.; et al. The Role of Inflammasomes in Atherosclerosis and Stroke Pathogenesis. *Curr Pharm Des* **2020**, *26*, 4234–4245, doi:10.2174/1381612826666200427084949. 838
839
840
131. Moloudizargari, M.; Moradkhani, F.; Asghari, N.; Fallah, M.; Asghari, M.H.; Moghadamnia, A.A.; Abdollahi, M. NLRP Inflammasome as a Key Role Player in the Pathogenesis of Environmental Toxicants. *Life Sci* **2019**, *231*, 116585, doi:10.1016/j.lfs.2019.116585. 841
842
843
132. Lee, C.; Do, H.T.T.; Her, J.; Kim, Y.; Seo, D.; Rhee, I. Inflammasome as a Promising Therapeutic Target for Cancer. *Life Sci* **2019**, *231*, 116593, doi:10.1016/j.lfs.2019.116593. 844
845
133. Soellner, L.; Kopp, K.M.; Mütze, S.; Meyer, R.; Begemann, M.; Rudnik, S.; Rath, W.; Eggermann, T.; Zerres, K. NLRP Genes and Their Role in Preeclampsia and Multi-Locus Imprinting Disorders. *J Perinat Med* **2018**, *46*, 169–173, doi:10.1515/jpm-2016-0405. 846
847
848
134. Stødle, G.S.; Silva, G.B.; Tangerås, L.H.; Gierman, L.M.; Nervik, I.; Dahlberg, U.E.; Sun, C.; Aune, M.H.; Thomsen, L.C.V.; 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. 849
850
851
135. Murthi, P.; Pinar, A.A.; Dimitriadis, E.; Samuel, C.S. Inflammasomes—A Molecular Link for Altered Immunoregulation and Inflammation Mediated Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *IJMS* **2020**, *21*, 1406, doi:10.3390/ijms21041406. 852
853
854
136. C Weel, I.; Romão-Veiga, M.; Matias, M.L.; Fioratti, E.G.; Peraçoli, J.C.; Borges, V.T.; Araujo, J.P.; Peraçoli, M.T. 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. 855
856
857
137. Mulla, M.J.; Myrtolli, K.; Potter, J.; Boeras, C.; Kavathas, P.B.; Sfakianaki, A.K.; Tadesse, S.; Norwitz, E.R.; Guller, S.; Abrahams, V.M. Uric Acid Induces Trophoblast IL-1 β 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. 858
859
860
138. Mulla, M.J.; Salmon, J.E.; Chamley, L.W.; Brosens, J.J.; Boeras, C.M.; Kavathas, P.B.; Abrahams, V.M. A Role for Uric Acid and the Nalp3 Inflammasome in Antiphospholipid Antibody-Induced IL-1 β Production by Human First Trimester Trophoblast. *PLoS One* **2013**, *8*, e65237, doi:10.1371/journal.pone.0065237. 861
862
863
139. Gomez-Lopez, N.; Romero, R.; Xu, Y.; Garcia-Flores, V.; Leng, Y.; Panaitescu, B.; Miller, D.; Abrahams, V.M.; Hassan, S.S. Inflammasome Assembly in the Chorioamniotic Membranes during Spontaneous Labor at Term. *American Journal of Reproductive Immunology* **2017**, *77*, e12648, doi:10.1111/aji.12648. 864
865
866
140. Gomez-Lopez, N.; Romero, R.; Xu, Y.; Plazyo, O.; Unkel, R.; Leng, Y.; Than, N.G.; Chaiworapongsa, T.; Panaitescu, B.; Dong, Z.; et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Preterm Labor With Acute Histologic Chorioamnionitis. *Reprod Sci* **2017**, *24*, 1382–1401, doi:10.1177/1933719116687656. 867
868
869
141. Gotsch, F.; Romero, R.; Chaiworapongsa, T.; Erez, O.; Vaisbuch, E.; Espinoza, J.; Kusanovic, J.P.; Mittal, P.; Mazaki-Tovi, S.; Kim, C.J.; 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. 870
871
872
873

142. Gomez-Lopez, N.; Romero, R.; Tarca, A.L.; Miller, D.; Panaitescu, B.; Schwenkel, G.; Gudicha, D.W.; Hassan, S.S.; 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**, *82*, e13184, doi:10.1111/aji.13184. 874–876
143. Gomez-Lopez, N.; Romero, R.; Garcia-Flores, V.; Leng, Y.; Miller, D.; Hassan, S.S.; Hsu, C.-D.; Panaitescu, B. Inhibition of the NLRP3 Inflammasome Can Prevent Sterile Intra-Amniotic Inflammation, Preterm Labor/Birth, and Adverse Neonatal Outcomes†. *Biol Reprod* **2019**, *100*, 1306–1318, doi:10.1093/biolre/iroy264. 877–879
144. Motomura, K.; Romero, R.; Garcia-Flores, V.; Leng, Y.; Xu, Y.; Galaz, J.; Slutsky, R.; Levenson, D.; Gomez-Lopez, N. The Alarmin Interleukin-1 α Causes Preterm Birth through the NLRP3 Inflammasome. *Mol Hum Reprod* **2020**, *26*, 712–726, doi:10.1093/molehr/gaaa054. 880–882
145. Faro, J.; Romero, R.; Schwenkel, G.; Garcia-Flores, V.; Arenas-Hernandez, M.; Leng, Y.; Xu, Y.; Miller, D.; Hassan, S.S.; Gomez-Lopez, N. Intra-Amniotic Inflammation Induces Preterm Birth by Activating the NLRP3 Inflammasome†. *Biol Reprod* **2019**, *100*, 1290–1305, doi:10.1093/biolre/iroy261. 883–885
146. 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**, *11*, 5745–5754. 886–888
147. Theis, K.R.; Romero, R.; Motomura, K.; Galaz, J.; Winters, A.D.; Pacora, P.; Miller, D.; Slutsky, R.; Florova, V.; Levenson, D.; et al. Microbial Burden and Inflammasome Activation in Amniotic Fluid of Patients with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *J Perinat Med* **2020**, *48*, 115–131, doi:10.1515/jpm-2019-0398. 889–891
148. Zhu, J.; Ma, C.; Luan, X.; Li, J.; Peng, F.; Huang, L. Inflammasome Components and ADAMTS4 in Premature Rupture of Membranes. *Mol Med Rep* **2021**, *23*, doi:10.3892/mmr.2020.11740. 892–893
149. Zhou, Y.; Shah, S.Z.A.; 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. 894–896
150. Bednash, J.S.; Weathington, N.; Londino, J.; Rojas, M.; Gulick, D.L.; Fort, R.; Han, S.; McKelvey, A.C.; Chen, B.B.; Mallampalli, R.K. Targeting the Deubiquitinase STAMBP Inhibits NALP7 Inflammasome Activity. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15203, doi:10.1038/ncomms15203. 897–899
151. Abi Nahed, R.; Reynaud, D.; Borg, A.J.; Traboulsi, W.; Wetzel, A.; Sapin, V.; Brouillet, S.; Dieudonné, M.N.; 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 (Berl)* **2019**, *97*, 355–367, doi:10.1007/s00109-018-01737-x. 900–903
152. Wang, R.-Y.; Li, Y.-J.; Zhen, L.; Jiang, F.; Gu, C.-M.; Li, D.-Z. Detection of Parental Contribution to Molar Genome Leads to Diagnosis of Recurrent Hydatidiform Mole in a Family with NLRP7 Variants. *Fetal Pediatr Pathol* **2020**, *1–8*, doi:10.1080/15513815.2020.1852463. 904–906
153. Rezaei, M.; Suresh, B.; Bereke, E.; Hadipour, Z.; Aguinaga, M.; Qian, J.; Bagga, R.; Fardaei, M.; Hemida, R.; Jagadeesh, S.; et al. Novel Pathogenic Variants in NLRP7, NLRP5, and PADI6 in Patients with Recurrent Hydatidiform Moles and Reproductive Failure. *Clin Genet* **2021**, doi:10.1111/cge.13941. 907–909
154. Qian, J.; Nguyen, N.M.P.; 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. *Eur J Hum Genet* **2018**, *26*, 1007–1013, doi:10.1038/s41431-018-0141-3. 910–912
155. Zhang, P.; Zhu, X.; Yu, X.; Huang, B.; Jiang, T.; Zhang, X.; Yang, H.; Qian, J. Abnormal Processing of IL-1 β in NLRP7-Mutated Monocytes in Hydatidiform Mole Patients. *Clin Exp Immunol* **2020**, *202*, 72–79, doi:10.1111/cei.13472. 913–915

156. Fallahi, J.; Razban, V.; Momtahan, M.; Akbarzadeh-Jahromi, M.; Namavar-Jahromi, B.; Anvar, Z.; Fardaei, M. A Novel Mutation in NLRP7 Related to Recurrent Hydatidiform Mole and Reproductive Failure. *Int J Fertil Steril* **2019**, *13*, 135–138, doi:10.22074/ijfs.2019.5657. 916–918
157. Tsai, P.-Y.; Chen, K.-R.; Li, Y.-C.; Kuo, P.-L. NLRP7 Is Involved in the Differentiation of the Decidual Macrophages. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20235994. 919–920
158. Lavergne, M.; Belville, C.; Choltus, H.; Gross, C.; Minet-Quinard, R.; Gallot, D.; Sapin, V.; Blanchon, L. Human Amnion Epithelial Cells (AECs) Respond to the FSL-1 Lipopeptide by Engaging the NLRP7 Inflammasome. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1645, doi:10.3389/fimmu.2020.01645. 921–923
159. Khare, S.; Dorfleutner, A.; Bryan, N.B.; Yun, C.; Radian, A.D.; 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. 924–926
160. 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. 927–930
161. Mühlradt, P.F.; 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, doi:10.1084/jem.185.11.1951. 931–933
162. Lappas, M. A20, an Essential Component of the Ubiquitin-Editing Protein Complex, Is a Negative Regulator of Inflammation in Human Myometrium and Foetal Membranes. *Mol Hum Reprod* **2017**, *23*, 628–645, doi:10.1093/molehr/gax041. 934–936
163. Lim, R.; Barker, G.; Liang, 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. 937–938
164. 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. 939–940
165. 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*, 8237087, doi:10.1155/2018/8237087. 941–942
166. 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. 943–944
167. 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-KB-Dependent Signalling. *Am J Reprod Immunol* **2014**, *71*, 401–417, doi:10.1111/aji.12229. 945–947
168. Ariza, M.-E.; Glaser, R.; Kaumaya, P.T.P.; Jones, C.; Williams, M.V. The EBV-Encoded DUTPase Activates NF-Kappa B through the TLR2 and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *J Immunol* **2009**, *182*, 851–859, doi:10.4049/jimmunol.182.2.851. 948–950
169. Lim, R.; Tran, H.T.; Liang, 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 Labor. *Biol Reprod* **2016**, *94*, 32, doi:10.1095/biolreprod.115.134726. 951–953
170. 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. 954–955

171. 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. *Reprod Fertil Dev* **2016**, *28*, 893–906, doi:10.1071/RD14315. 956–958
172. Romero, R.; Xu, Y.; Plazyo, O.; Chaemsaitong, P.; Chaiworapongsa, T.; Unkel, R.; Than, N.G.; Chiang, P.J.; Dong, Z.; Xu, Z.; et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at Term. *Am J Reprod Immunol* **2018**, *79*, e12440, doi:10.1111/aji.12440. 959–961
173. Kacerovsky, M.; Pliskova, L.; Bolehovska, R.; Musilova, I.; Hornychova, H.; Tambor, V.; Jacobsson, B. The Microbial Load with Genital Mycoplasmas Correlates with the Degree of Histologic Chorioamnionitis in Preterm PROM. *Am J Obstet Gynecol* **2011**, *205*, 213.e1–7, doi:10.1016/j.ajog.2011.04.028. 962–964
174. Kacerovský, M.; Pavlovský, M.; Tosner, J. Preterm Premature Rupture of the Membranes and Genital Mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2009**, *52*, 117–120, doi:10.14712/18059694.2016.115. 965–966
175. Paramel Jayaprakash, T.; Wagner, E.C.; van Schalkwyk, J.; Albert, A.Y.K.; Hill, J.E.; Money, D.M.; PPROM 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. 967–970
176. 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. *J Matern Fetal Neonatal Med* **2016**, *29*, 1–7, doi:10.3109/14767058.2014.984606. 971–973
177. Latino, M.A.; Botta, G.; Badino, C.; Maria, D.D.; 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. 974–976
178. Kacerovský, M.; Boudys, L. [Preterm premature rupture of membranes and Ureaplasma urealyticum]. *Ceska Gynekol* **2008**, *73*, 154–159. 977–978
179. 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. 979–982
180. Cox, C.; Saxena, N.; Watt, A.P.; Gannon, C.; McKenna, J.P.; Fairley, D.J.; Sweet, D.; Shields, M.D.; L Cosby, S.; Coyle, P.V. 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. 983–986

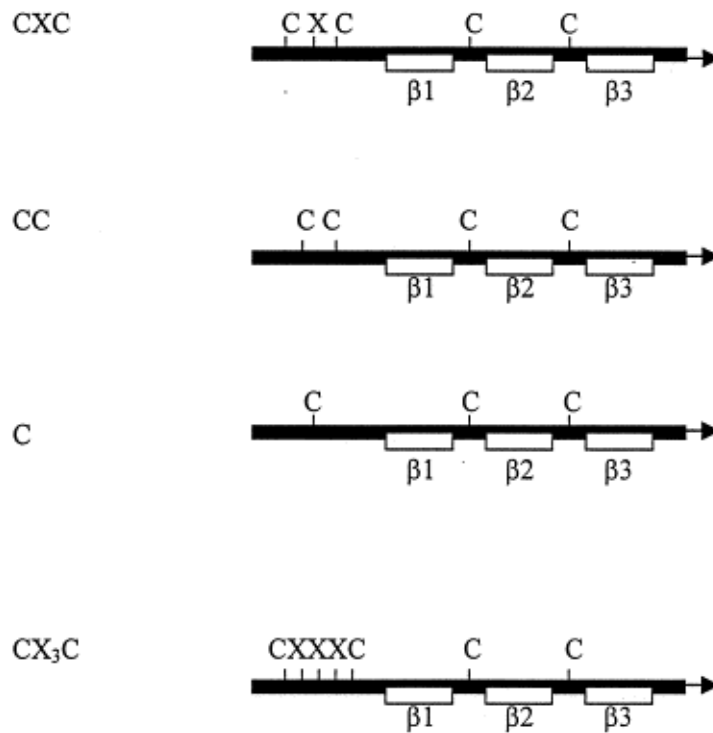


Figure 32 : Structure des chimiokines

Il existe quatre sous-familles de chimiokines. Les deux premières se distinguent structurellement par la présence ou l'absence d'un acide aminé X entre les deux résidus cystéine en N-terminal. Les deux autres sous-familles sont les CX₃CL qui comportent 3 acides aminés entre leurs deux résidus CC, puis les CL qui possèdent uniquement une cystéine (García-Velasco & Arici, 1999).

~ 4 ~

TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES : UN ACTEUR EN AVAL DE RAGE, LA CHIMIOKINE RANTES (CCL5)

Un dernier projet a été initié lors de mon travail de thèse, mais n'a pas pu faire l'objet jusqu'alors de la soumission d'une publication. Malgré, pour l'instant, l'absence de valorisation de ce travail, voici ici présentés les résultats préliminaires obtenus. Ce dernier projet a eu pour objectif de faire le lien entre l'accumulation pathologique des AGEs et la chimiokine (ou cytokine chimio-attractante) RANTES. Nous l'avons vu, nombreuses sont les études à avoir démontré une augmentation des taux sériques d'AGEs lors de plusieurs complications obstétricales telles que la prééclampsie, la RPM, et le diabète, lui-même facteur de risque décrit de la RPM. L'action des AGEs comporte notamment une composante inflammatoire au sein des membranes fœtales comme nous avons pu le voir avec les travaux précédents. Parallèlement, la surexpression de RANTES a elle aussi été remarquée lors de la prééclampsie, l'endométriose, le travail prématuré ou encore lors de chorioamniotite aiguë ainsi l'idée d'une « relation fonctionnelle » possible entre tous ces acteurs au sein des MF (Athayde *et al*, 1999).

I. Quelques notions sur les chimiokines, ces molécules qui attirent

a- Une grande famille

RANTES appartient à la grande famille des chimiokines, petites protéines solubles (8-10kDa) présentant une structure commune maintenue par deux ponts disulfure et sécrétées par divers types de cellules (cellules endothéliales et épithéliales, leucocytes, neurones). Actuellement, plus de 50 chimiokines ont été découvertes, suite à la caractérisation chimio-attractante de IL8 (CXCL8) en 1989 (Van Damme *et al*, 1989). Quatre sous-familles de chimiokines sont décrites en fonction du nombre et de l'espacement des deux premiers résidus cystéine : CXC, CC, CX3C, XC (**Figure 32**). Ces molécules exercent une action de chimiotactisme, *e.g* elles permettent de guider, d'orienter les différentes populations de cellules immunitaires (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes, basophiles, monocytes, cellules

dendritiques) sur un site de lésion en fonction de ce qui est nommé un gradient chimiotactique (Combadière *et al*, 2007). L'activité des chimiokines nécessite leur reconnaissance par des récepteurs cellulaires qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) nommés selon la sous-famille de chimiokines reconnue. Ces récepteurs, les CCR, ne sont pas la plupart du temps spécifique à une seule chimiokine (Mantovani, 1999). En effet, les chimiokines et leurs récepteurs forment un réseau d'une grande complexité. En plus d'une redondance fonctionnelle, les récepteurs peuvent former des homodimères ou des hétérodimères, modifiant potentiellement leurs propriétés (Percherancier *et al*, 2005; El-Asmar *et al*, 2005; Springael *et al*, 2005). Concernant RANTES, il est reconnu par les récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5, qui peuvent interagir chacun avec d'autres chimiokines (**Figure 33**).

b- Chimiokines et guidage cellulaire

Suite à cette liaison, comme tous les ligands de RCPG, la chimiokine va induire diverses voies intracellulaires, provoquant principalement la **réponse chimiotactique** mais aussi celles associées d'**activation des intégrines** et de **diapédèse**. Brièvement, ces deux fonctions font partie du processus global de recrutement leucocytaire, comportant 4 étapes : i) ralentissement de la vitesse du leucocyte dans la circulation sanguine grâce aux interactions (faibles) des sélectines leucocytaires ou endothéliales avec leurs ligands = phase de roulement ; ii) activation des intégrines engendrant l'arrêt total du leucocyte qui adhère fortement à l'endothélium ; iii) diapédèse endothéliale = passage intercellulaire des leucocytes entre les cellules endothéliales des capillaires sanguins ; iv) migration des leucocytes jusqu'au site d'inflammation à l'aide du gradient interstitiel de chimiotactisme (**Figure 34**) (Luster *et al*, 2005; Rot & von Andrian, 2004).

Il est à noter qu'il n'y a pas de signalisation cellulaire spécifique à une chimiokine, cependant quelques voies générales ont été décrites comme impliquées dans ces trois fonctions telles que les protéines G monomériques RhoA (Ras homolog family member A) et Rap1 (Ras-related protein 1), la protéine G hétérotrimérique Gi (α et β), les voies PI3K, MAPK, phospholipase C ou encore des protéines liant le cytosquelette (FAK : Focal Adhesion Kinase). Il est même parfois probable que la chimiokine exerce une action sans se fixer à un CCR mais en se liant directement à des composés glycosylés présents sur la surface des endothélium et dans la MEC : les glycosaminoglycanes (GAG) (Thelen, 2001).

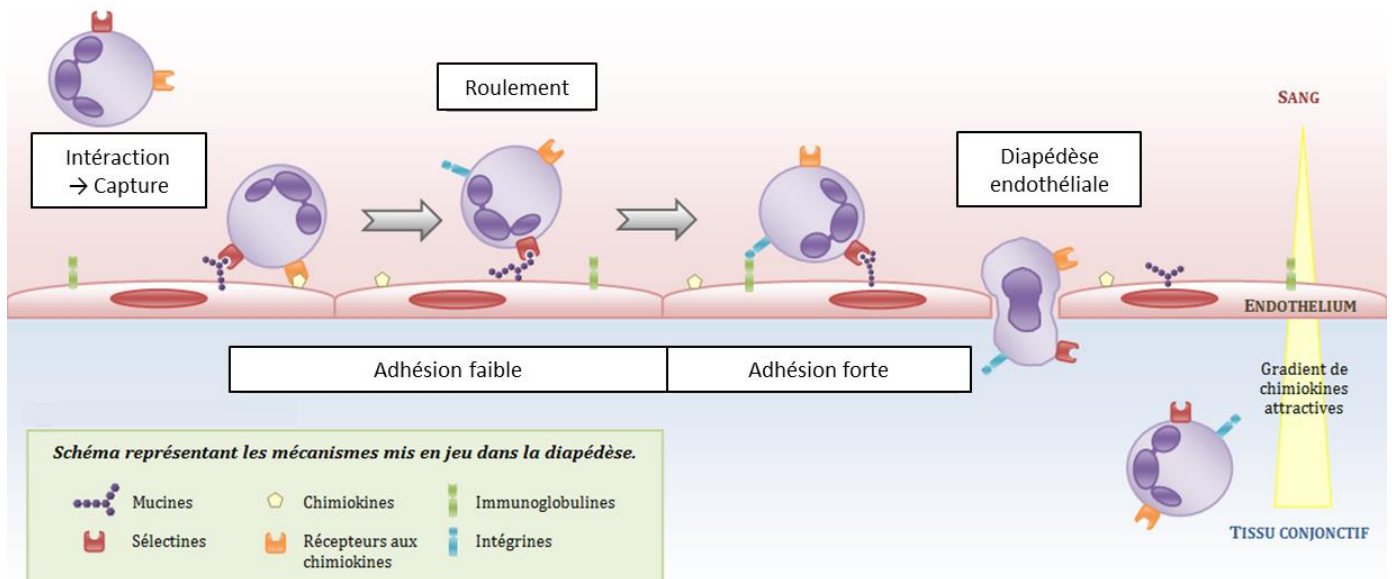


Figure 34 : Etapes majeures du recrutement leucocytaire

Lors d'une réponse inflammatoire, les cellules immunitaires se retrouvent à migrer jusqu'au site inflammatoire. Ce processus complexe comprend plusieurs étapes. Tout d'abord, le leucocyte est « capturé », *e.g* d'une part les CCR présents à la surface du leucocyte reconnaissent les chimiokines présentes sur l'endothélium, d'autre part (de la même façon), les sélectines interagissent avec les mucines. Ces interactions permettent une adhésion faible du leucocyte d'où découle son ralentissement, roulement. Ensuite, des interactions supplémentaires plus fortes ont lieu permettant l'arrêt du leucocyte : les intégrines sont activées à l'aide des chimiokines et reconnaissent à leur tour des immunoglobulines de l'endothélium (I-CAM, V-CAM). Enfin, a lieu la diapédèse, phase de transmigration du leucocyte à travers l'endothélium, guidée par le gradient de chimiokines sécrétées sur le site de l'inflammation (Adapté de <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/immunité-innée.html>).

Pour finir, à l'image de leurs parentes les cytokines, les chimiokines ont aussi un impact sur la différenciation fonctionnelle des leucocytes, par exemple pour les lymphocytes T CD4 et CD8, mais aussi pour les cellules NK, les monocytes et les cellules dendritiques.

c- Physiopathologie des chimiokines

Comme c'est le cas pour les phénomènes mis en jeu dans la préparation des membranes fœtales à la rupture, le recrutement des chimiokines doit avoir lieu au bon moment, au bon endroit, et dans leur cas, concerner les « bonnes » cellules. Les chimiokines ont été décrites dans la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires tel que l'asthme, le diabète ou d'autres encore affectant autant la peau (psoriasis, eczéma, dermatite), que les intestins (maladie de Crohn, colite), le système nerveux central (sclérose, Alzheimer). Ainsi, par exemple, la dermatite et l'asthme mettent en jeu une infiltration de lymphocytes Th2 (respectivement vers l'épiderme ou épithélium alvéolaire) tandis la maladie de Crohn implique des Th1 et des polynucléaires au niveau de l'intestin (Berghi *et al*, 2020; Luster *et al*, 2005). De plus, il est connu que le système des chimiokines peut être détourné par des virus, comme c'est le cas pour le virus d'immunodéficience humaine (VIH) qui interagit avec les CCR5 et CXCR4 afin d'infecter les lymphocytes T4 (Murphy, 2001). Enfin, par leur capacité à recruter des leucocytes (et donc à provoquer des modifications structurelles), les chimiokines sont impliquées dans plusieurs processus liés à la reproduction humaine tels que le cycle ovulatoire, l'implantation ou la parturition (maturation du col et travail) (García-Velasco & Arici, 1999; Ito *et al*, 1987). Même si la chimiokine la plus étudiée à ce jour dans ces phénomènes demeure IL8, certaines équipes se sont intéressées à RANTES.

II. RANTES et parturition

L'expression de RANTES a été établie dans plusieurs compartiments gestationnels : lait maternel, sécrétions vaginales, LA et membranes fœtales. D'ailleurs, l'étude de Athayde *et al*. a permis plusieurs observations (Athayde *et al*, 1999). Premièrement, les concentrations de RANTES au sein du LA diminuent au cours de la gestation pour finalement réaugmenter avec l'entrée en travail. Par ailleurs, fait intéressant, ces travaux démontrent que les taux amniotiques de RANTES sont plus importants en cas de naissance prématurée. Ces travaux suggèrent ainsi une implication de RANTES dans le travail, en effet RANTES permet le

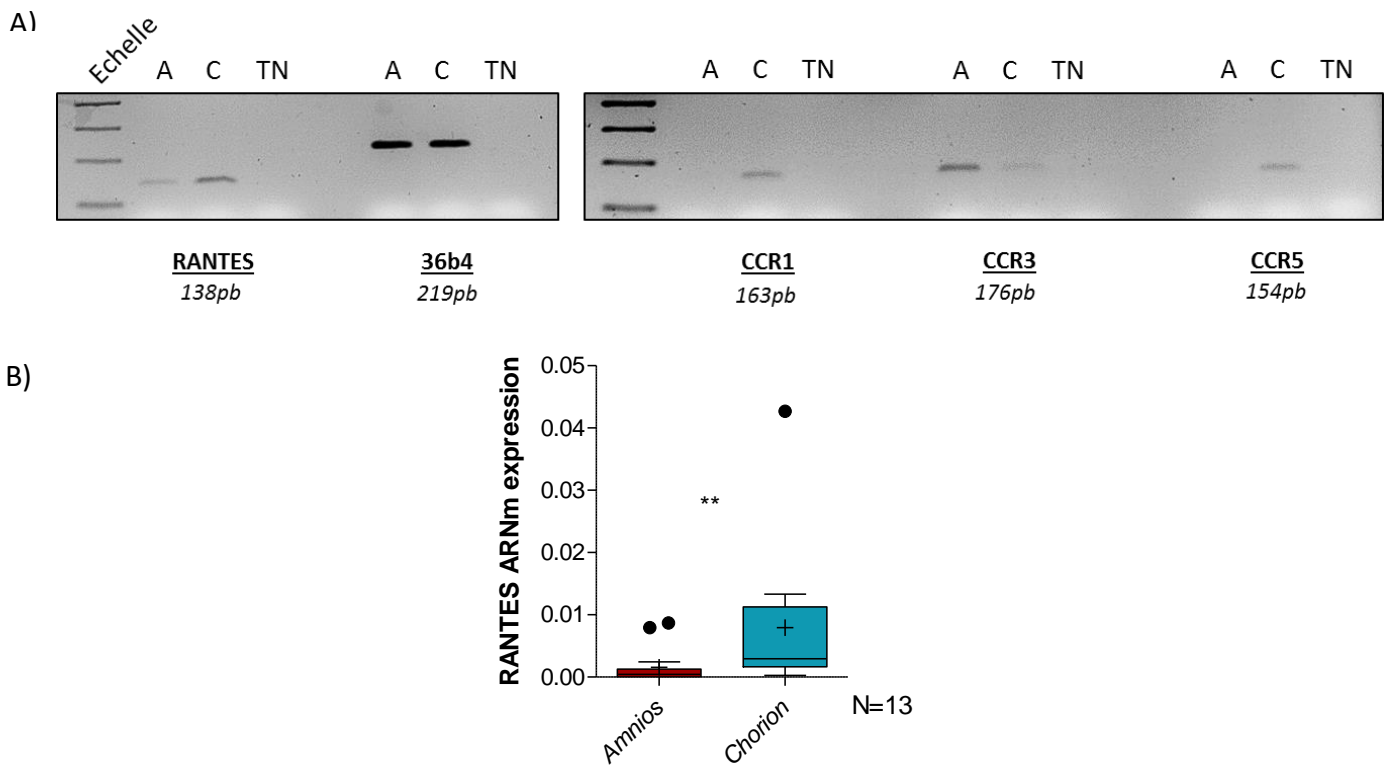


Figure 35 : Expression de RANTES et de ses récepteurs au sein des feuillets des MF

L'expression de RANTES et de ses récepteurs CCR1, 3 et 5 a été caractérisée par RT-PCR sur des échantillons d'amnios et de chorion, obtenus suite à des accouchements par césarienne à terme (A) (A = Amnios ; C= Chorion ; TN = Témoin Négatif). Sur ces mêmes échantillons, l'expression de RANTES a été quantifiée par RT-qPCR en distinguant l'amnios et le chorion (N=13) (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un T-test : ** : $p < 0.01$.

recrutement de plusieurs leucocytes dont les basophiles. Ces derniers peuvent être à l'origine de sécrétions d'histamine, molécule connue pour augmenter la libération déciduale de prostaglandines et stimuler les contractions utérines. D'autre part, en cas d'invasion microbienne de la cavité amniotique, les concentrations de RANTES sont également plus fortes et ceci est en accord avec l'augmentation de sécrétion de RANTES retrouvée lors de traitements d'explants de membranes fœtales avec du LPS (Núñez-Sánchez *et al*).

III. Objectif du projet

Il existe d'ores et déjà des évidences du rôle de RANTES dans le travail, et dans l'inflammation septique pouvant avoir lieu au sein des membranes fœtales, pouvant potentiellement causer des naissances prématurées. Cependant, nous l'avons vu, une rupture prématurée peut avoir lieu en absence d'invasion microbienne et découler d'une réponse inflammatoire stérile. Dans ce contexte, il est bon de rappeler que le diabète demeure une problématique importante durant la grossesse. En lien avec cette pathologie, les études apparaissent contradictoires, tandis que certaines démontrent une sous-expression de RANTES en cas de diabète de type I dans le sang maternel, d'autres décrivent une surexpression (toujours en cas de type I) au sein du cordon ombilical alors que d'autres ne mettent en évidence aucune différence d'expression de RANTES en cas de diabète gestationnel (Teler *et al*, 2017; Wender-Ozegowska *et al*, 2008; Han *et al*, 2019). Cependant, il est bien connu que le diabète est associé à une accumulation d'AGEs, et qu'il constitue un risque courant de pré-éclampsie et de RPM (Sisay *et al*, 2020). Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que les AGEs induisent la sécrétion de chimiokines dont RANTES au sein de trophoblastes (Konishi, 2004). Ainsi, est ce que la surexpression pathologique d'AGEs impliquée dans des complications obstétricales régule l'action de RANTES dans les MF ? Et si tel est le cas, est ce que cette modulation passe par la voie RAGE, elle-même décrite dans la pathogénèse du diabète ?

IV. Résultats préliminaires & perspectives

La première étape a été de caractériser l'expression de RANTES et des ses récepteurs (CCR1, 3, 5) au sein de l'amnios et du chorion. Dans ce cadre, des expériences de RT-PCR ont tout d'abord été menées sur des échantillons de membranes fœtales issues de césarienne à terme (**Figure 35A**). De cette façon, l'expression de RANTES dans l'amnios et le chorion a été

	Témoin	Type 1	Type 2	DG
Age gestationnel (semaines)	39,4 ± 1,0	37,1 ± 1,5 (***)	37,5 ± 1 (***)	39,4 ± 1,3 (ns)
Poids naissance enfant (g)	3336,1 ± 265,8	3365,6 ± 398,7 (ns)	3353,3 ± 401,2 (ns)	3297,9 ± 618,4 (ns)
IMC mère	21,7 ± 2,8	24,8 ± 4,3 (ns)	32,9 ± 5,9 (***)	24,5 ± 4,6 (ns)

Tableau 1 : Données cliniques de la cohorte de membranes fœtales à terme

La cohorte de membranes fœtales analysées a été divisée en quatre groupes : témoin (N=16, mères non diabétiques), diabète de type I (N=16), diabète de type II (N=15), diabète gestationnel (N=16, DG). L'analyse statistique des données cliniques ci-dessus a été réalisée par un test ANOVA, les résultats notés sur le tableau sont les comparaisons envers le groupe témoin. *** : p<0,001.

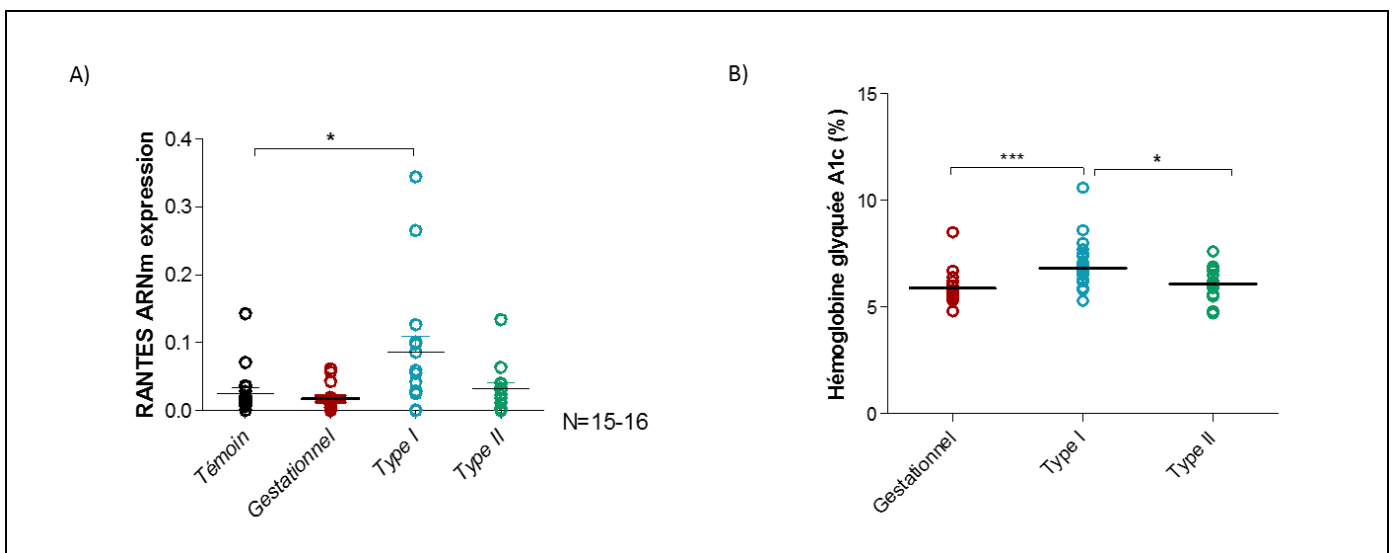


Figure 36 : Comparaison de l'expression de RANTES dans les MF selon les différents types de diabète

(A) L'expression de RANTES a été quantifiée par RT-qPCR sur une cohorte de membranes fœtales issues de mères témoins, de mères ayant développé un diabète gestationnel, de mères avec un diabète de type I ou II. (B) Les taux de d'hémoglobine glyquée ont été mesurés dans les trois groupes de diabète. L'analyse statistique des données cliniques ci-dessus a été réalisée par un test ANOVA. * : p<0,05 ; *** : p<0,001.

révélée mais aussi celle de CCR1 et CCR5 au sein du chorion, et celle de CCR3 au sein de l'amnios et du chorion. Par la suite, il a été établi par RT-qPCR, une surexpression significative de RANTES au sein du chorion par rapport à l'amnios (**Figure 35B**). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à savoir si l'expression de RANTES était modifiée chez des mères diabétiques. Pour cela, nous avons quantifié l'expression de RANTES par RT-qPCR sur une cohorte divisée en quatre groupes de mères : témoin (non diabétique) (N=16), diabète de type I (N=16), diabète de type II (N=15), diabète gestationnel (DG) (N=16) (**Tableau 1, Figure 36**). Brièvement, le diabète de type 1 (ou insulinodépendant), représentant 5 à 15 % des cas de diabète et il est diagnostiqué chez les enfants ou les jeunes adultes. Il est dû à un défaut de production d'insuline. Quant au type 2 (85 à 95% des diabètes), se déclarant chez des personnes plus âgées, il provient d'une résistance à l'insuline, provoquant une carence insulinique. Enfin, le diabète gestationnel apparaît durant la grossesse et disparaît généralement au terme de celle-ci. Il résulte également d'une résistance à l'insuline, engendrée ici par les bouleversements hormonaux de la grossesse. Les données obtenues ont révélé une surexpression significative de RANTES uniquement au sein des MF issues de mères atteintes de diabète de type 1 comparé au groupe témoin (**Figure 36A**). Parallèlement, l'analyse statistique des données cliniques ont permis de mettre en évidence que les mères atteintes de diabète « chronique » de type I ou II accouchaient plus tôt que le groupe témoin et DG (environ 2 semaines d'écart) (**Tableau 1**). Par ailleurs, comme décrit classiquement pour le diabète, le taux d'hémoglobine glyquée A1c, indicateur biologique reflet de la glycémie (normalement entre 4 et 6%), a été retrouvé plus élevé en cas de diabète de type I comparé aux type II et aux DG (**Figure 36B**). Une étude récente a démontré que RAGE présentait la capacité d'interagir avec l'hème et pourrait promouvoir un signal pro-inflammatoire (May *et al*, 2020). Ainsi, la surexpression de RANTES retrouvée dans le diabète de type I, diabète associé aux valeurs de glycémie les plus élevées pourrait suggérer un lien entre AGEs, RAGE et RANTES.

La question suivante a été de savoir si les AGEs induisent la sécrétion de RANTES par les MF dépendamment de RAGE ou non. Pour cela, des explants d'amnios et de chorion dissociés ont été traités durant 4h30 et 24h avec 500 µg/ml d'AGEs ou 200 ng/ml d'HMGB1, une autre alarmine, combiné ou non avec un traitement inhibiteur de RAGE, les SAGEs (500µg/ml). Un contrôle positif de la réactivité inflammatoire des membranes fœtales utilisées a été réalisé à

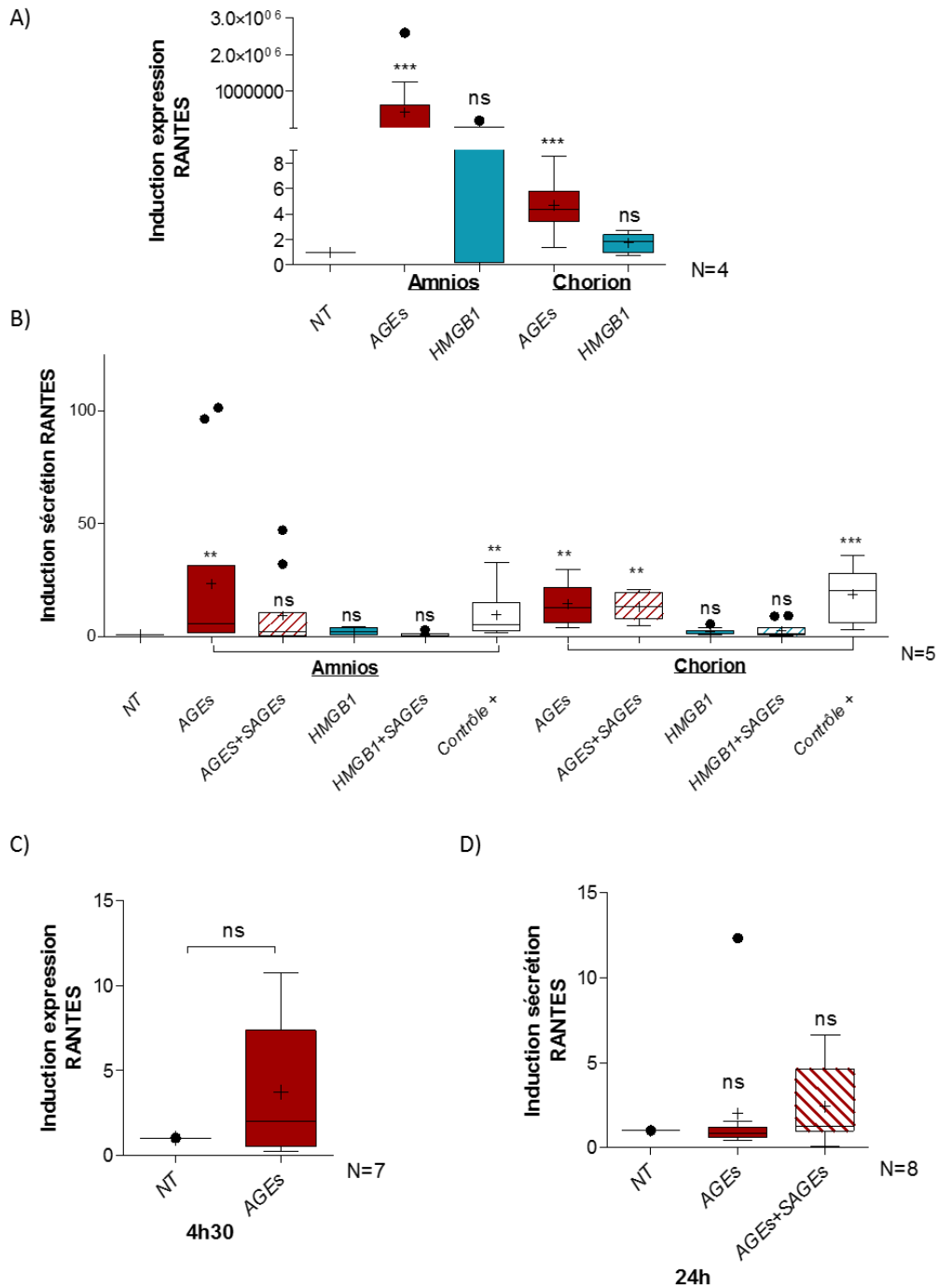


Figure 37 : Etude *in vitro* de l'effet d'une exposition des membranes fœtales aux AGEs

(A-B) Des explants d'amnios et de chorion issus de césarienne à terme de mères non diabétiques ont été récupérés et traités 4h30 ou 24h avec des AGEs (500µg/ml), du HMGB1 (200ng/ml), du LPS (contrôle +, 10µg/ml) ; combiné ou non avec un inhibiteur de RAGE, des SAGEs (500µg/ml). (C-D) De même, des cultures primaires d'amniocytes ont été exposées à des AGEs (100µg/ml) +/- des SAGEs (100µg/ml). Après 4h30 de traitement, une quantification des transcrits de RANTES a été réalisée par RT-qPCR (A-C). Puis post-24h de traitement, la sécrétion de RANTES par les explants a été dosée par technologie Luminex (B-D). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism, en utilisant un test ANOVA (A-B-D) ou un t-test (C). ns : non significatif ; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

l'aide d'un traitement par LPS (10µg/ml). A l'issue du traitement, une quantification de l'expression de RANTES (post 4h30) a été réalisée par RT-qPCR ainsi qu'une mesure du relargage de la chimiokine (post 24h) par les explants vers le milieu de culture par technologie Luminex (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Milliplex MAP Kit (Merck Millipore, Molsheim, France) (**Figure 37**). Une normalisation a été effectuée par un rapport aux protéines totales, puis la condition traitée a été rapportée sur le non traité. Les résultats obtenus ont démontré que seulement les AGEs (et pas HMGB1, alarmine moins décrite dans le diabète) provoquaient une induction de la transcription de RANTES et ce uniquement dans l'amnios et non dans le chorion. Par ailleurs, les dosages de RANTES ont permis d'établir là encore uniquement un effet inducteur pour les AGEs, aussi bien au sein de l'amnios que du chorion. Cependant, l'action inhibitrice de la voie RAGE par les SAGEs ne s'est révélée que pour l'amnios, où l'induction de sécrétion de RANTES par les AGEs est complètement abrogée par les SAGEs. Ces résultats démontrent une probable réponse différentielle des deux feuillets et tendrait à prouver que les AGEs stimulent la production de RANTES au sein de l'amnios de façon RAGE-dépendante. Afin d'avoir une approche plus ciblée, il était important de savoir quel type cellulaire de l'amnios répondait à cette exposition, les amniocytes ou les fibroblastes.

En utilisant des amniocytes et similairement aux expériences sur explants, nous avons procédé à un traitement avec des AGEs durant 4h30 ou 24h, en adaptant la concentration à 100µg/ml, combiné là encore aux SAGEs (100µg/ml). Tout d'abord des expériences de RT-qPCR (à 4h30) n'ont révélé aucun effet inducteur des AGEs sur la transcription de RANTES (**Figure 38A**). Ensuite, un dosage par technologie ELLA (Protein Simple™) a permis de mesurer la libération de RANTES à 24h par les amniocytes dans le milieu de culture. Cependant, là encore aucune induction par les AGEs n'a été observée (**Figure 38B**). Ces résultats préliminaires ne confortent pas l'hypothèse que les AGEs modulent la production de RANTES par les amniocytes. Pour la suite, il apparaît essentiel de répéter ces expériences en améliorant leur désign (effet cinétique, effet dose). Par ailleurs, l'hypothèse d'un impact des AGEs ciblant préférentiellement les fibroblastes se pose. Ainsi, j'ai pu commencer la culture de fibroblastes primaires, issus là encore de césarienne programmée à terme. La maîtrise de ce protocole (adapté de Diaz-Prado et al.) combinant l'utilisation de collagénase, de DNase et de trypsine reste à améliorer, le rendement de cellules étant très faible (Díaz-Prado *et al*, 2010).

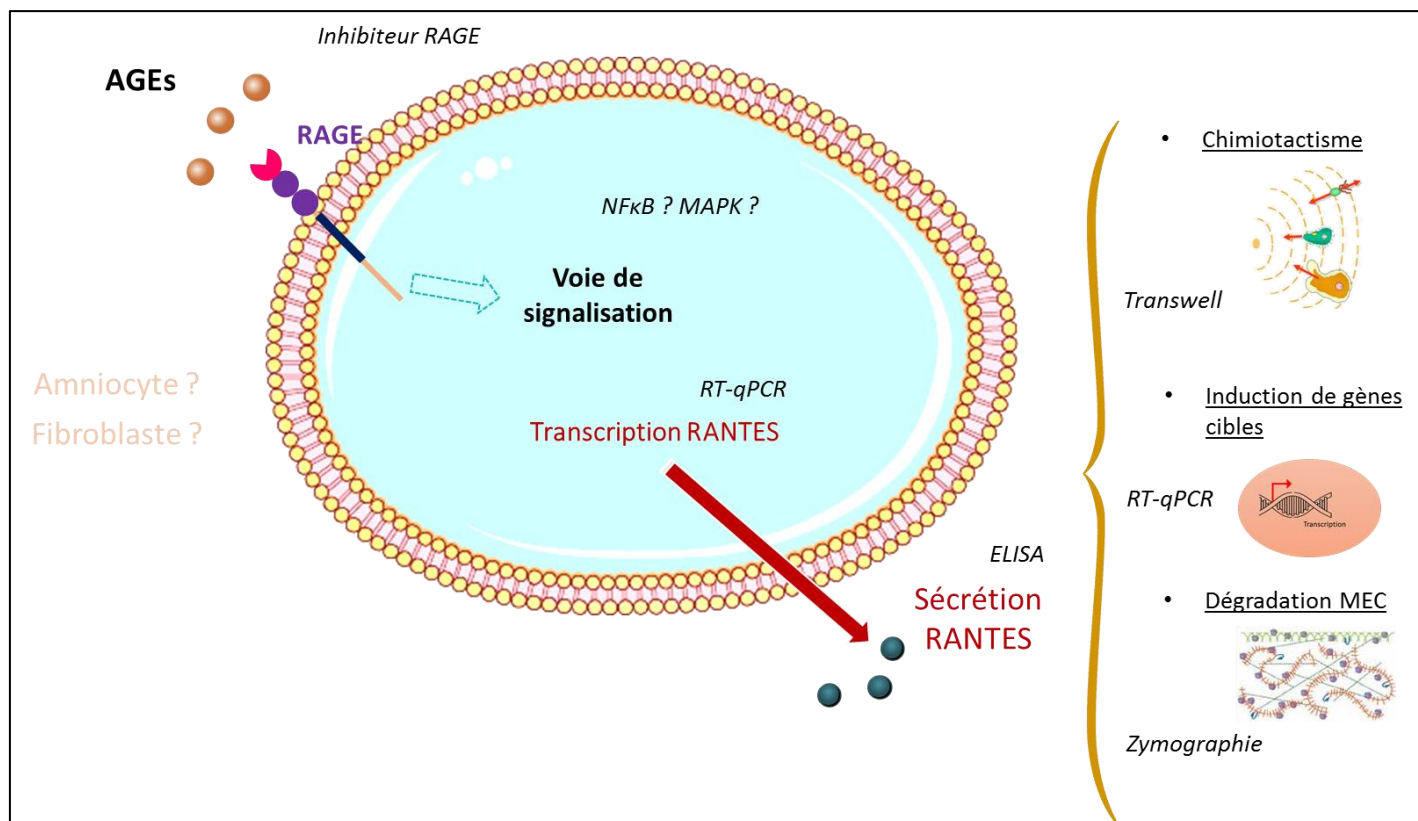


Figure 38 : Hypothèse d'action du projet Triade AGEs – RAGE – RANTES au sein de membranes fœtales

L'accumulation des AGEs chez les mères diabétiques (de type I) conduit à une surexpression de RANTES au sein des membranes fœtales. Les résultats préliminaires ont démontré que les AGEs induisaient la production de RANTES, au sein de l'amnios, à travers le récepteur RAGE. Le projet a pour objectifs complémentaires (après l'obtention de résultats préliminaires) d'identifier quel type cellulaire de l'amnios répond (amniocyte ou fibroblaste). Par la suite, le but est de caractériser la voie de signalisation impliquée dans l'induction de RANTES. Enfin, nous souhaitons décrire les effets chimiotactiques de RANTES sur le recrutement de polynucléaires par système de transwell, mais aussi étudier la modulation de ses gènes cibles (intégrines et métalloprotéases) et la place de cette chimokine dans la dégradation de la MEC (par zymographie). Au final, nous pourrions avoir un aperçu global de l'activité de RANTES dans la fragilisation des MF.

La suite de ce projet, ciblant une utilisation des fibroblastes, cellules mésenchymateuses stromales nécessitera donc plusieurs étapes. Il sera tout d'abord essentiel de procéder à l'ontogénèse des acteurs de l'axe RAGE (RAGE et ses adaptateurs) et de RANTES (et ses CCR) au sein de ces cellules. Par la suite et si les résultats obtenus démontrent un impact des AGEs sur la production de RANTES, plusieurs questions se poseraient. La première serait de savoir quelle voie de signalisation induite par RAGE active le relargage de RANTES au sein de l'amnios. L'analyse du promoteur du gène codant RANTES (par Genomatix) révèle notamment des éléments de réponse correspondant à ceux du facteur de transcription NFκB mais aussi de AP-1, acteur généralement activé par les voies MAPK. Enfin, il sera judicieux d'étudier quelle réponse cellulaire est induite par ce relargage de RANTES en réponse aux AGEs. Dans ce cadre, il est prévu d'étudier les changements d'expression des gènes cibles connus de RANTES tels que celui de MMP9, protéine impliquée dans la dégradation de la MEC, mais aussi ceux des intégrines, facteurs essentiels du recrutement leucocytaire. L'action de ces voies sera aussi caractérisée par l'étude de la dégradation de la MEC par zymographie. Enfin, de par la fonction primaire de RANTES, son pouvoir chimiotactique sera étudié par système de transwell, permettant d'évaluer l'effet de milieux conditionnés (provenant de traitements AGEs, combinées ou non avec des inhibiteurs de RAGE et de la voie de signalisation identifiée au préalable) sur le recrutement de polynucléaires (**Figure 38**).

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'enrichir les connaissances disponibles sur les mécanismes inflammatoires ayant lieu au sein des MF humaines dépendant d'un des récepteurs de l'immunité, RAGE. 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.

Depuis plusieurs années, l'équipe du Pr. Sapin étudie l'acteur RAGE au sein de trois modèles de fragilisation et d'inflammation épithéliale, que ce soit au niveau pulmonaire dans le cadre de Syndrome de Détresse Respiratoire Aigü (SDRA), au niveau cornéen lors de blessures ou du syndrome d'œil sec, mais surtout dans le cadre de rupture des MF. RAGE est en effet ubiquitairement exprimé dans l'organisme, mais surtout ses taux d'expression sont généralement retrouvés augmentés en cas de déséquilibre inflammatoire (Lin *et al*, 2009; Teissier & Boulanger, 2019). RAGE est rattaché à la grande famille de récepteurs de l'immunité innée, les PRR, capable d'enclencher une réponse pro-inflammatoire suite à la reconnaissance de signaux de danger stériles (DAMPs) ou microbiens (PAMPs). Or, le compartiment utéro-placentaire représente une réserve physiopathologique, croissante au cours de la grossesse, de DAMPs voire de PAMPs (Nadeau-Vallée *et al*, 2016). Ainsi, ces molécules vont continuellement être reconnues par leurs récepteurs exprimés au sein des tissus gestationnels, aboutissant à leur fragilisation progressive et à la formation de la ZAM pour ce qui est des MF. Il apparaissait ainsi nécessaire de mieux comprendre quels récepteurs pouvaient être à l'origine de la transduction de ce signal de « danger » aussi bien dans le cas physiologique de la rupture que dans son cas pathologique.

I- Ontogénèse des acteurs de l'axe RAGE, inflammation RAGE-dépendante au sein des membranes fœtales humaines, ZAM une zone suractive ?

Contrairement aux TLRs, peu d'études se sont penchées sur la place de RAGE dans la physiopathologie de la rupture des MF, bien que ses ligands (partagés et spécifiques) soient retrouvés de façon augmentée et que la synthèse des formes solubles antagonistes de ce récepteur (sRAGE et esRAGE) soit modifiée en cas de RPM et autres troubles de la grossesse. L'expression (transcriptionnelle et protéique) de RAGE avait été quantifiée dans des échantillons de placentas (démontrant sa surexpression en cas de RPM), dans le sang du cordon ombilical et le sang maternel (Yan *et al*, 2018). Mais aussi, des expériences

d'immunomarquage avait identifié la présence de la protéine RAGE au sein de membranes fœtales saines et prééclamptiques (Baumbusch *et al*, 2016; Oliver *et al*, 2011). Plusieurs études avaient démontré également que les taux de transcription de RAGE étaient induits au sein des MF après traitement avec des DAMPs (HMGB1, S100A12) (Plazyo *et al*, 2016; Buhimschi *et al*, 2007). Cependant, jusqu'à présent, aucune donnée n'était disponible sur les potentielles différences d'expression de RAGE entre amnios et chorion, entre ZIM et ZAM, et surtout aucune étude n'avait démontré l'implication de RAGE dans la réponse inflammatoire déclenchée par les DAMPs au sein des MF. Enfin, il est désormais bien connu que l'activation de cascades pro-inflammatoires par RAGE nécessite le recrutement de protéines intracellulaires, les adaptateurs Dia-1, MyD88, et TIRAP. Malgré de nombreuses publications sur MyD88 et TIRAP, là encore aucune quantification d'expression n'avait été réalisée dans les conditions précitées. Quant à Dia-1, aucune information n'était disponible dans la sphère placentaire.

Ce travail a ainsi permis de révéler l'expression de RAGE mais aussi de ses adaptateurs MyD88, Dia-1 et TIRAP dans des explants humains d'amnios et de chorion dissociés, provenant du premier, deuxième ou troisième trimestre, ou encore d'accouchements à terme par voie basse ou césarienne. Par ailleurs, à l'aide d'expériences de RT-qPCR et de Western-Blot, la première partie de cette thèse a permis d'identifier une surexpression de RAGE au sein de l'amnios par rapport au chorion, mais aussi au sein de ZAM par rapport à ZIM. Ces résultats supportent ainsi l'hypothèse d'une inflammation amniotique augmentée au niveau de la zone de rupture, découlant de la potentielle suractivité de RAGE dans cette zone. La ZAM, comme décrit précédemment, est le siège d'une apoptose plus importante, d'un stress oxydant moins combattu, d'une quantité plus importante de molécules SASP (tous sources de DAMPs) et d'une surexpression de gènes inflammatoires (Chai *et al*, 2012, 2013; El Khwad *et al*, 2005; Reti *et al*, 2007; Nhan-Chang *et al*, 2010; Menon *et al*, 2016b). Il est ainsi possible de supposer que la concentration des composés du LA n'est pas constamment homogène, et qu'une concentration plus forte se situe au niveau de la zone supra-cervicale, déjà sensibilisée par un transcriptome inflammatoire prononcé. Tout ceci s'ajoute à la surexpression de RAGE dans son feuillet amniotique ; feuillet décrit comme le « feuillet résistant » en comparaison au chorion, feuillet que nous pouvons imaginer comme celui ayant un rôle plus décisif dans le

timing de la rupture physiologique et prématurée des MF au vu de la chronologie des événements. L'implication de l'axe RAGE au niveau amniotique a été confortée par les expressions de Dia-1 et HMGB1 plus fortes dans l'amnios comparées au chorion. Quant à la surexpression chorionique de MyD88, il est important de souligner sa non-exclusivité par rapport à RAGE. En effet, l'activation de TLR4 par les DAMPs/PAMPs conduit également au recrutement de MyD88. Des données non publiées de l'équipe ont d'ailleurs identifié une surexpression de TLR4 dans le chorion par rapport à l'amnios, ce qui pourrait laisser imaginer (au moins) deux acteurs impliqués dans l'inflammation des MF : l'axe RAGE-Dia-1 au niveau de l'amnios et l'axe TLR4-MyD88 au niveau du chorion dans un modèle qui pourrait être qualifié du coup de « feuillet spécifique ». La suite des expériences menées a démontré pour la première fois l'engagement de RAGE dans la réponse inflammatoire à des DAMPs (AGEs et HMGB1) au sein de l'amnios et du chorion, menant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$). Il est à noter que cette inflammation était seulement partiellement abolie suite à l'inhibition de RAGE, suggérant là encore la participation d'autres acteurs moléculaires. En effet, il serait intéressant de mener d'autres investigations pour mieux comprendre le dialogue entre TLR4 et RAGE, tous deux récepteurs membranaires activés par des ligands communs, recrutant des adaptateurs semblables et induisant des voies inflammatoires similaires. TLR4 est généralement décrit dans des processus inflammatoires infectieux, tandis que RAGE, dans des contextes stériles. Pourtant, il a été décrit des affinités similaires de RAGE pour HMGB1 et le LPS sur son domaine V ($K_d=6\text{nM}$ pour HMGB1 vs 2 et 35nM pour le LPS en fonction du site) (Yamamoto *et al*, 2011; Teissier & Boulanger, 2019). En effet, le rôle de RAGE dans la réponse inflammatoire à une exposition au LPS a déjà été démontrée dans différents modèles (Nair *et al*, 2021; Wang *et al*, 2020, 2017; Izushi *et al*, 2016; Wang *et al*, 2014; Drake & Scott, 2019). A côté de cela, HMGB1, S100A8/A9, autres ligands partagés de TLR4 et RAGE, affichent une meilleure affinité envers RAGE que TLR4 (respectivement $5\text{-}10\text{nM}$ vs $1,5\text{-}22\mu\text{M}$ et $\approx 34\text{ nM}$ vs $1,5\text{-}2,5\cdot 10^{-8}\text{ M}$). Il apparaît dans la littérature, qu'en fonction des conditions physiopathologiques (concentrations du ligand, du récepteur, type cellulaire, ...), le ligand se fixerait préférentiellement sur un des récepteurs, cependant le facteur permettant ce « choix » reste à ce jour inconnu (Ibrahim *et al*, 2013). En ce sens et pour appuyer cette hypothèse, une étude récente réalisée *in vitro* sur des cellules endothéliales a d'ailleurs démontré que le silencing de RAGE menait à la diminution de l'expression de TLR4 et des adaptateurs MyD88 et TIRAP (Ramya *et al*, 2021). Pour conclure,

cette première partie a démontré la fonctionnalité et la capacité de RAGE à induire de l'inflammation au sein de l'amnios et du chorion en réponse à des alarmines naturellement présentes dans le LA, et retrouvées augmentées en cas de RPM (Yan *et al*, 2018; Bouvier *et al*, 2020). D'autres expériences seront nécessaires pour établir les partenaires de RAGE dans la fragilisation des MF mais également pour identifier les cascades cellulaires impliquées, en fonction du feuillet, en fonction de l'alarmine, en fonction de l'adaptateur recruté. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les gènes cibles de la voie RAGE activés au sein des membranes fœtales exposées aux alarmines par exemple en réalisant un transcriptome.

Après l'obtention de ces résultats en condition physiologique de la rupture, la suite de ce travail a permis de démontrer le recrutement et l'activation de la voie RAGE dans les MF par des composés exogènes, facteurs de risque de la RPM : la fumée de cigarette.

II- Tabagisme maternel et RAGE : comment les MF se fragilisent prématurément.

Du fait de sa forte expression pulmonaire, l'implication de RAGE a souvent été étudiée dans l'inflammation créée par le tabagisme au niveau de cet organe, par exemple dans la physiopathologie de la BPCO (Bronchopneumopathie Chronique Obstructive) (Reynolds *et al*, 2011; Wolf *et al*, 2017; Chen *et al*, 2014a). En France, 24% des femmes sont fumeuses et 16% le sont toujours au troisième trimestre de grossesse (chiffres de 2018). Or, la composition du tabac affiche de nombreux toxiques qui peuvent traverser la barrière placentaire et se retrouver alors dans le LA, directement en contact avec les MF, notamment l'amnios. Nous l'avons décrit auparavant, la fumée de cigarette va induire une réponse de danger en induisant un relargage extracellulaire de DAMPs tel que HMGB1, mais également en accélérant les réactions de glycation et menant à la formation d'AGEs (van Waateringe *et al*, 2017; Le *et al*, 2020; Cheng *et al*, 2017; Heijink *et al*, 2015; Bredeson *et al*, 2014; Pouwels *et al*, 2016). Il était ainsi logique d'étudier l'activation de RAGE au sein de MF exposées à du tabac. Il est à noter que nous avons choisi pour ce travail de modéliser le tabagisme par du CSC, composé de la phase particulaire de la fumée de cigarette. Il est donc important de garder à l'esprit que les expériences réalisées durant cette thèse n'ont pas pris en compte la phase volatile de la fumée de cigarette, modélisable par le CSE. Il apparaît ici essentiel d'envisager pour de futures études de combiner les deux traitements *in vitro*.

Les résultats obtenus ont permis tout d'abord d'identifier la sensibilité de l'amnios au CSC, en opposition au chorion. En effet, le CSC induit de la souffrance cellulaire mais également une réponse de danger *via* la sécrétion d'alarmines uniquement dans l'amnios. Ici, seul HMGB1 a été étudié, car étant un des principaux ligands de RAGE et surtout dont la surexpression est déjà décrite comme associée à la RPM. Par ailleurs, sa forte expression basale nucléaire permet une quantification protéique plus aisée.

Cependant, un screening de toutes les alarmines relarguées par les MF en réponse au tabac serait intéressant, notamment des AGEs et du binôme S100A8/A9 (Kim *et al*, 2020). Ainsi, nous avons pris le parti de focaliser ce travail sur les cellules épithéliales amniotiques (AECs), première couche cellulaire en contact avec le LA pendant 9 mois et qui « baigne » donc dans des substances potentiellement délétères. Cependant comment expliquer l'absence de souffrance cellulaire et de sécrétion d'HMGB1 du côté chorion ? Une hypothèse est que le chorion relargue justement d'autres alarmines, ou que plus épais, la pénétration du tissu par le CSC est moindre en comparaison de l'amnios. On peut cependant rappeler ici que dans les travaux précédents de cette thèse, aux mêmes doses d'AGEs et HMGB1, une sécrétion de médiateurs inflammatoires avait lieu dans les deux feuillets (Choltus *et al*, 2020). Par ailleurs, des données non publiées de RT-qPCR ont quantifié la transcription de plusieurs cytokines (IL6, IL8, IL1 β , TNF α , RANTES, MCP1) au sein du chorion après 24h de traitement CSC également, et n'ont pas révélé d'induction significative, obtenue pourtant avec le contrôle positif réalisé (LPS). *In vivo*, l'hypothèse peut être émise que l'amnios est plus exposé aux composés tabagiques du LA que le chorion, et que l'action délétère de ces derniers sur la fragilisation et le timing de la rupture des MF passe par leur action sur le feuillet le plus résistant, qui se trouve être aussi celui plus réactif car surexprimant RAGE.

Les résultats *in vitro* ont non seulement permis de retrouver la souffrance cellulaire et la translocation extracellulaire de HMGB1 dans les AECs mais aussi d'identifier l'activation de la voie inflammatoire RAGE-NF κ B par le CSC. Cette voie connue de l'inflammation est d'ailleurs associée au déclenchement du travail mais aussi à l'induction de différentes cytokines et chimiokines telles que IL1 β , IL6 et IL8, ces deux dernières ayant fait l'objet d'études sur des marqueurs prédictifs de la RPM (Lindstrom & Bennett, 2005; Li *et al*, 2020; Gupta *et al*, 2020; Jia, 2014; Kacerovsky *et al*, 2015a; Jung *et al*, 2017; Liu *et al*, 2017). Or les expériences réalisées ont démontré une induction de la transcription et de la sécrétion de ces trois cytokines suite

à une exposition au tabac, induction diminuée pour IL1 et abolie pour IL6 et 8 en cas d'inhibition compétitive de RAGE. Ces résultats démontrent ainsi clairement l'implication pathologique de RAGE dans la fragilisation prématurée de MF tabagiques de part cette augmentation de l'inflammation. Par ailleurs, ce phénomène est aussi associé dans la littérature à de la dégradation de la MEC. La surexpression de la gélatinase MMP9 est couramment connue pour être associée à la RPM, par exemple dans le plasma foetal (Romero *et al*, 2002). Par ailleurs, des polymorphismes du gène *mmp9*, à l'origine d'une expression accrue, sont associés à un risque accru de RPM dans la population afro-américaine (Ferrand *et al*, 2002). Enfin, IL6 et IL8 ont déjà été décrites pour induire les sécrétions de MMP9 mais aussi de la gélatinase MMP2 au sein d'AECs (Mano *et al*, 2009). En accord avec la littérature, nos derniers résultats ont révélé une induction RAGE-dépendante de la transcription de MMP9 et de l'activité gélatinase globale par le CSC au sein des AECs (résultats qui devront être complétés par la réalisation de zymogrammes pour dissocier l'activité de différentes MMP (Exemple : 2 et 9)). Pour conclure, le CSC semble conduire à la fragilisation prématurée des MF en exacerbant les mécanismes physiologiques de la rupture à terme, comme l'inflammation et la dégradation de la MEC, mais surtout RAGE apparaît comme central dans cette suractivation néfaste. Cette étude pourrait être complétée en évaluant l'impact RAGE-CSC sur les autres mécanismes de la rupture tels que le stress oxydant et la sénescence (où le CSE a déjà été décrit comme inducteur), la sécrétions d'hormones, l'apoptose (Poletini *et al*, 2018; Jin *et al*, 2018a). Par ailleurs, la diminution partielle de la sécrétion de IL1 β trahit l'implication d'autres récepteurs, là encore soulevant la question du partenariat TLR4-RAGE.

III- Autres limites techniques, intérêts thérapeutiques et perspectives à long terme de l'étude

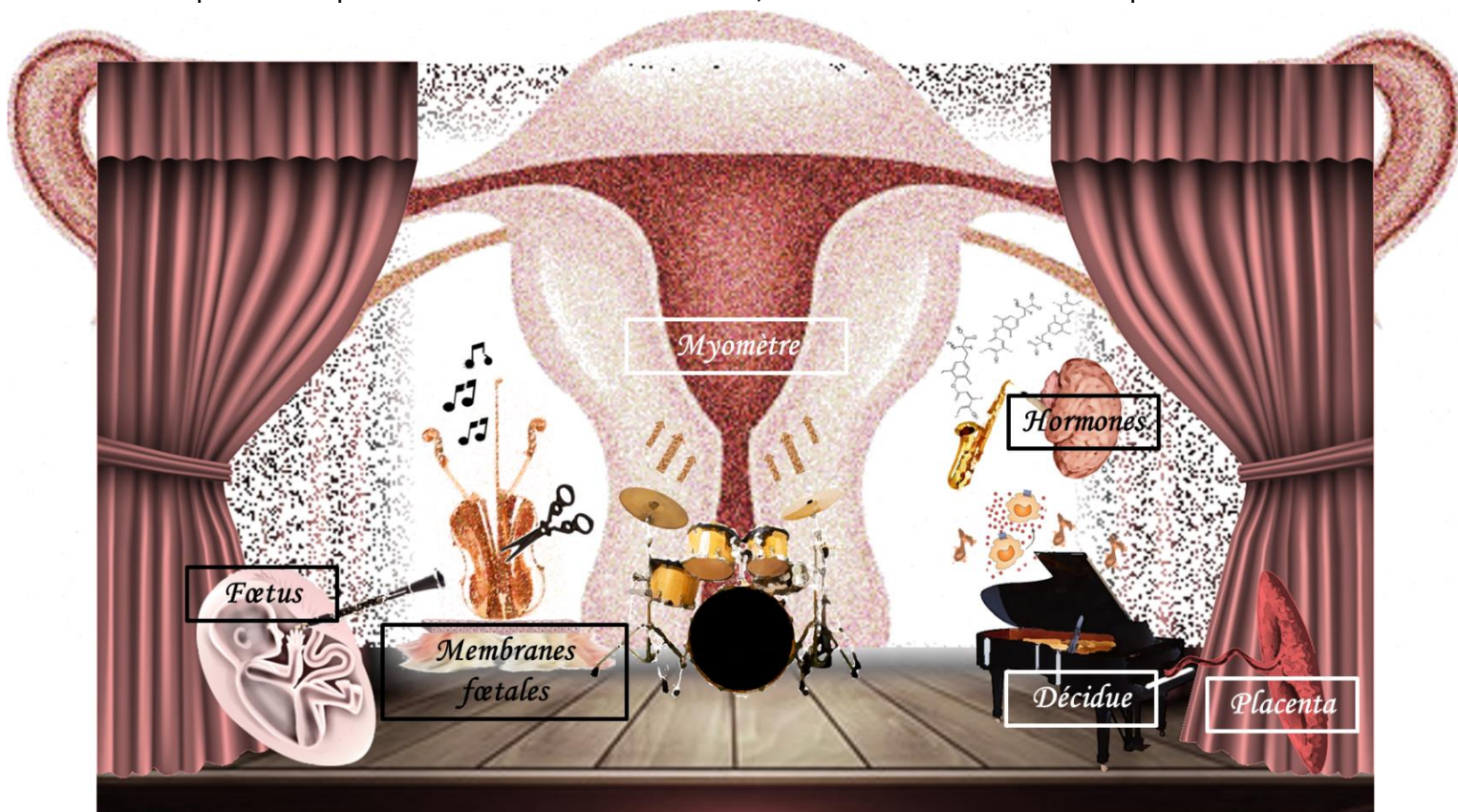
Plusieurs limites techniques ont été rencontrées au cours de ce travail. La première limite technique concerne le nombre de membranes foetales disponibles et répondant à nos critères de sélection (par exemple : membranes foetales issues d'accouchements à terme par césariennes prévues, grossesse singleton 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, pas de tabac, IMC<30). Cependant des biais persistent toujours, par

exemple au niveau du tabagisme, est ce que la mère était fumeuse avant ? Est-ce que son partenaire est fumeur et l'expose à du tabagisme passif ? Autre écueil, au niveau de l'IMC, même si nous avons fixé la limite à 30, valeur repère de l'obésité, une variabilité était tout de même présente au sein des patientes, or le surpoids est associé à un état inflammatoire chronique. Enfin, nous l'avons dit, certaines ethnies expriment des polymorphismes risques de la RPM, et aucune information n'est connue concernant ce paramètre. Autres biais possible, est ce que tous les composés du CSC sont retrouvés *in vivo* dans le LA, cela à été confirmé par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse pour la nicotine, l'acétone, le benzène, toluène, styrène, butan-2-one, composés de Maillard, tous associés au tabagisme, mais *quid* des autres, et des concentrations des métabolites (Minet-Quinard et al., publication en préparation de l'équipe). Ensuite, le CSC est produit à partir de cigarettes standardisées, est ce que leur combustion mène aux mêmes produits que d'autres marques de cigarettes ? Il faut ainsi garder à l'esprit que travailler sur modèle humain permet une moins bonne maîtrise des paramètres (d'où l'importance d'affiner les critères de sélection) et sera toujours accompagné d'une variabilité plus importante que sur des lignées cellulaires commercialisées ou sur modèles animaux, mais reste le meilleur modèle, à mon avis, pour se rapprocher de la réalité physiologique.

Pour conclure, ce travail a permis de révéler l'implication de RAGE dans la fragilisation physiopathologique des MF. Cette démonstration a permis de mieux caractériser les phénomènes inflammatoires ayant lieu au sein des MF dans des contextes physiologiques et pathologiques, dans le but, *in fine*, de développer des thérapies préventives (par l'établissement de biomarqueurs par exemple) ou curatives de pathologies obstétricales. A l'image de l'étude de Wakabayashi *et al.* avec un anticorps anti-IL6, on peut imaginer la prochaine étape en induisant une RPM *in vivo* par du tabagisme dans un modèle murin et tester différents inhibiteurs spécifiques de RAGE afin d'évaluer l'effet sur le timing de la rupture et de la naissance (Wakabayashi *et al*, 2013).

Epilogue

Depuis des siècles, la naissance d'un être humain a toujours été source de questionnements, d'hypothèses et de mythes plus ou moins farfelus. Les impressionnants progrès scientifiques ont permis progressivement de voir de plus en plus clair. Ici, les travaux de cette thèse, ou plus globalement l'équipe du Pr. Sapin, ont pour but de mieux comprendre la physiopathologie de la rupture des membranes fœtales, en se focalisant sur certains acteurs moléculaires de l'inflammation tels que RAGE, NLRP, ... Cependant, ces travaux ne sont qu'une pierre, qui assemblée à celles existantes et aux futures, permettra peut-être un jour de saisir comment un évènement physiologique devient pathologique chez certaines personnes et pas d'autres, comment l'éviter, comment le prévoir à l'avance, mais peut être que ces nouvelles découvertes révéleront d'autres questions ou que les progrès futurs donneront tort à ces nouvelles découvertes. Même si les connaissances sont exponentielles, comme le disait Socrate, « Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien ». Finalement, on peut imaginer la parturition comme un immense orchestre composé de nombreux musiciens jouant tous ensemble la même partition en harmonie, ni trop fort, ni trop rapide. Si l'un d'eux échoue (myomètre, décidue, hormones, placenta, membranes fœtales ou autres), le bon déroulement de la naissance est compromis. Ici, on peut imaginer que si les membranes fœtales sont une harpe et l'inflammation une des cordes, RAGE n'est qu'une fibre de cette corde. Mais pour contredire Socrate, si au niveau individuel nous ne pouvons être certains de rien, au niveau collectif, avec l'ensemble des chercheurs, médecins, ingénieurs, techniciens etc nous pouvons espérer décrire les fibres des cordes, mais aussi les musiciens et la partition.



Annexes

Participation aux congrès

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

- **14 et 15 Octobre 2020 (deuxième année de Thèse) :**

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

A Clermont-Ferrand (France)

Communication orale « Symphony or cacophonia of fetal membranes rupture: RAGE and sterile inflammation »

- **5 au 9 Juillet 2021 (troisième année de Thèse) :**

Congrès de la Society For Reproductive Investigation (SRI)

A Boston (Etats-Unis)

Présentation d'un e-poster « Cigarette Smoke Condensate induces RAGE-dependent sterile inflammation in human Amniotic Epithelial Cells »

- **6 et 7 Septembre 2021 (troisième année de Thèse) :**

Groupe de la francophonie Placentaire (GfP)

A Nantes (France)

Communication orale « Cigarette & récepteur RAGE : des effets pro-inflammatoires délétères sur la rupture des membranes fœtales »

Participations à des publications en tant que co-auteur

Article 1 :

“Advanced Glycation End Products and Receptor (RAGE) Promote Wound Healing of Human Corneal Epithelial Cells “

Auteurs : Christelle Gross, Corinne Belville, Marilyne Lavergne, **Hélène Choltus**, Matthieu Jabaudon, Raïko Blondonnet, Jean-Michel Constantin, Frédéric Chiambaretta, Loïc Blanchon, Vincent Sapin

Publié dans *Investigative ophthalmology & visual science* en Mars 2020

DOI : 10.1167/iovs.61.3.14

Abstract

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 nuclear factor (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 small interfering RNA treatments.

Results: AGEs treatment at a dose of 100 μ g/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- κ B pathway and positively regulated the expression of the target gene, connexin 43, at both the mRNA and protein levels.

Conclusions: 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- κ B pathway and induction of connexin 43 expression.

Article 2

“The receptor for advanced glycation end-products enhances lung epithelial wound repair: An *in vitro* study”

Auteurs : Ruoyang Zhai, Raiko Blondonnet, Ebrahim Ebrahimi, Corinne Belville, Jules Audard, Christelle Gross, **Helena Choltus**, Fanny Henrioux, Jean-Michel Constantin, Bruno Pereira, Loic Blanchon, Vincent Sapin, Matthieu Jabaudon

Publié dans *Experimental Cell Research* en Juin 2020

DOI : 10.1016/j.yexcr.2020.112030

Abstract

Re-epithelialization of the alveolar surface is a key process of lung alveolar epithelial barrier repair after acute lung injury. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) pathway plays key roles in lung homeostasis, and its involvement in wound repair has been already reported in human bronchial epithelial cells. However, its effects on lung alveolar epithelial repair after injury remain unknown. We investigated whether RAGE stimulation with its ligands high-mobility group box 1 protein (HMGB1) or advanced glycation end-products (AGEs), alone or associated with RAGE inhibition using RAGE antagonist peptide, affects *in vitro* wound healing in human alveolar epithelial A549 cells. We further asked whether these effects could be associated with changes in cell proliferation and migration. We found that treatment of A549 cells with HMGB1 or AGEs promotes RAGE-dependent wound healing after a scratch assay. In addition, both RAGE ligands increased cell proliferation in a RAGE-dependent manner. Treatment with HMGB1 increased migration of alveolar epithelial cells at 12 h, independently of RAGE, whereas AGEs stimulated migration as measured 48 h after injury in a RAGE-dependent manner. Taken together, these results suggest that RAGE pathway is involved in lung alveolar epithelial wound repair, possibly through enhanced cell migration and proliferation.

Article 3

“Human Amnion Epithelial Cells (AECs) Respond to the FSL-1 Lipopeptide by Engaging the NLRP7 Inflammasome”

Marilyne Lavergne, Corinne Belville, **Hélène Choltus**, Christelle Gross, Régine Minet-Quinard, Denis Gallot, Vincent Sapin and Loïc Blanchon

Publié dans *Frontiers in Immunology* en Juillet 2020

DOI : 10.3389/fimmu.2020.01645

Abstract

Context and Objectives: Inflammation is the leading mechanism involved in both physiological and pathological rupture of fetal membranes. Our aim was to obtain a better characterization of the inflammasome-dependent inflammation processes in these tissues, with a particular focus on the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor, pyrin domain containing protein 7 (NLRP7) inflammasome.

Methods: The presence of NLRP7 inflammasome actors [NLRP7, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC), and caspase-1] was confirmed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in human amnion and choriondecidua at the three trimesters and at term. The protein concentrations were then determined by enzyme-linked immunosorbent assay in term tissues, with or without labor. The presence of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in human fetal membranes was investigated using a PCR approach. Human amnion epithelial cells (AECs) were treated for 4 or 20 h with fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1), a *M. salivarium*-derived ligand. Transcripts and proteins quantity was then measured by RT-quantitative PCR and Western blotting, respectively. NLRP7 and ASC colocalization was confirmed by immunofluorescence. Western blots allowed analysis of pro-caspase-1 and gasdermin D cleavage.

Results: NLRP7, ASC, and caspase-1 transcripts were expressed in both sheets of human fetal membranes during all pregnancy stages, but only ASC protein expression was increased with labor. In addition, *M. salivarium* and *M. fermentans* were detected for the first time in human fetal membranes. NLRP7 and caspase-1 transcripts, as well as NLRP7, ASC, and pro-caspase-1 protein levels, were increased in FSL-1-treated AECs. The NLRP7 inflammasome assembled

around the nucleus, and pro-caspase-1 and gasdermin D were cleaved into their mature forms after FSL-1 stimulation.

Conclusion: Two new mycoplasmas, *M. salivarium* and *M. fermentans*, were identified in human fetal membranes, and a lipopeptide derived from *M. salivarium* was found to induce NLRP7 inflammasome formation in AECs.

Article 4 (en soumission)

“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

Abstract

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.

Références bibliographiques

- Agarwal A, Gupta S & Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28
- Amsalem H, Kwan M, Hazan A, Zhang J, Jones RL, Whittle W, Kingdom JCP, Croy BA, Lye SJ & Dunk CE (2014) Identification of a Novel Neutrophil Population: Proangiogenic Granulocytes in Second-Trimester Human Decidua. *The Journal of Immunology* 193: 3070–3079
- Ananth CV, Oyelese Y, Srinivas N, Yeo L & Vintzileos AM (2004) Preterm premature rupture of membranes, intrauterine infection, and oligohydramnios: risk factors for placental abruption. *Obstet Gynecol* 104: 71–77
- Andersson S, Minjarez D, Yost NP & Word RA (2008) Estrogen and progesterone metabolism in the cervix during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2366–2374
- Andersson U, Ottestad W & Tracey KJ (2020) Extracellular HMGB1: a therapeutic target in severe pulmonary inflammation including COVID-19? *Mol Med* 26: 42
- Andersson U, Yang H & Harris H (2018) Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 22: 263–277
- Andres RL & Day M-C (2000) Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Seminars in Neonatology* 5: 231–241
- Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W & Lee TH (2001) Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 41: 1524–1530
- Arikat S, Novince RW, Mercer BM, Kumar D, Fox JM, Mansour JM & Moore JJ (2006) Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required. *Am J Obstet Gynecol* 194: 211–217
- Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Araneda H & Yoon BH (1999) A role for the novel cytokine RANTES in pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 181: 989–994
- Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Yoon BH & Edwin SS (2000) Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 182: 135–141
- Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Gröne H-J, *et al* (2009) Biglycan, a Danger Signal That Activates the NLRP3 Inflammasome via Toll-like and P2X Receptors. *J Biol Chem* 284: 24035–24048
- Baghurst PA, Robertson EF, Oldfield RK, King BM, McMichael AJ, Vimpani GV & Wigg NR (1991) Lead in the placenta, membranes, and umbilical cord in relation to pregnancy outcome in a lead-smelter community. *Environ Health Perspect* 90: 315–32

- Bainbridge SA & Roberts JM (2008) Uric Acid as a Pathogenic Factor in Preeclampsia. *Placenta* 29: S67–S72
- Bainbridge SA, Roberts JM, von Versen-Höynck F, Koch J, Edmunds L & Hubel CA (2009a) Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C440–C450
- Bainbridge SA, von Versen-Höynck F & Roberts JM (2009b) Uric Acid Inhibits Placental System A Amino Acid Uptake. *Placenta* 30: 195–200
- Bakker WW, Donker RB, Timmer A, van Pampus MG, van Son WJ, Aarnoudse JG, van Goor H, Niezen-Koning KE, Navis G, Borghuis T, *et al* (2007) Plasma hemopexin activity in pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 26: 227–239
- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4: 540–550
- Barbezier N, Tessier FJ & Chango A (2014) [Receptor of advanced glycation endproducts RAGE/AGER: an integrative view for clinical applications]. *Ann Biol Clin (Paris)* 72: 669–680
- Bastek JA, Brown AG, Foreman MN, McShea MA, Anglim LM, Adamczak JE & Elovitz MA (2012) The soluble receptor for advanced glycation end products can prospectively identify patients at greatest risk for preterm birth. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 25: 1762–1768
- Baumbusch MA, Buhimschi CS, Oliver EA, Zhao G, Thung S, Rood K & Buhimschi IA (2016) 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* 81: 82–87
- Beck V, Lewi P, Gucciardo L & Devlieger R (2012) Preterm prelabor rupture of membranes and fetal survival after minimally invasive fetal surgery: a systematic review of the literature. *Fetal Diagn Ther* 31: 1–9
- Behnia F, Sheller S & Menon R (2016) Mechanistic Differences Leading to Infectious and Sterile Inflammation. *Am J Reprod Immunol* 75: 505–518
- Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, Saade GR & Menon R (2015) Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213: 359.e1-359.e16
- Benirschke K, Kaufmann P & Baergen RN (2006) Pathology of the human placenta New York: Springer
- Berghi NO, Dumitru M, Vrinceanu D, Ciuluvica RC, Simioniuc-Petrescu A, Caragheorghopol R, Tucureanu C, Cornateanu RS & Giurcaneanu C (2020) Relationship between chemokines and T lymphocytes in the context of respiratory allergies (Review). *Exp Ther Med* 20: 2352–2360

- Bhide VM & Tenenbaum HC (2020) Treatment of Gingival Fenestration With a Double Pedicle Flap Approach and Dehydrated Amnion-Chorion Membrane: A Case Report. *Clin Adv Periodontics*
- Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81: 1–5
- Bianchi R, Adami C, Giambanco I & Donato R (2007) S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol* 81: 108–118
- Blanchon L, Accoceberry M, Belville C, Delabaere A, Prat C, Lemery D, Sapin V & Gallot D (2013) [Rupture of membranes: pathophysiology, diagnosis, consequences and management]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 42: 105–116
- Blanks AM & Thornton S (2003) The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 110 Suppl 20: 46–51
- Blanks AM, Vatish M, Allen MJ, Ladds G, de Wit NCJ, Slater DM & Thornton S (2003) Paracrine oxytocin and estradiol demonstrate a spatial increase in human intrauterine tissues with labor. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3392–3400
- Blondonnet R, Audard J, Belville C, Clairefond G, Lutz J, Bouvier D, Roszyk L, Gross C, Lavergne M, Fournet M, *et al* (2017) RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice. *Sci Rep* 7: 7208
- van Boeckel SR, Davidson DJ, Norman JE & Stock SJ (2018) Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth. *Reproduction* 155: R137–R145
- Bogic LV, Brace RA & Cheung CY (2001) Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 22: 265–275
- Bongarzone S, Savickas V, Luzi F & Gee AD (2017a) Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry* 60: 7213–7232
- Bongarzone S, Savickas V, Luzi F & Gee AD (2017b) Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry* 60: 7213–7232
- Borgida AF, Mills AA, Feldman DM, Rodis JF & Egan JF (2000) Outcome of pregnancies complicated by ruptured membranes after genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 183: 937–939
- Boulanger E, Dequiedt P & Wautier JL (2002) [Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?]. *Nephrologie* 23: 351–359
- Bourne GL (1960) The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 79: 1070–1073

- Bouvier D, Forest J-C, Blanchon L, Bujold E, Pereira B, Bernard N, Gallot D, Sapin V & Giguère Y (2019) Risk Factors and Outcomes of Preterm Premature Rupture of Membranes in a Cohort of 6968 Pregnant Women Prospectively Recruited. *J Clin Med* 8
- Bouvier D, Giguère Y, Blanchon L, Bujold E, Pereira B, Bernard N, Gallot D, Sapin V & Forest J-C (2020) Study of sRAGE, HMGB1, AGE, and S100A8/A9 Concentrations in Plasma and in Serum-Extracted Extracellular Vesicles of Pregnant Women With Preterm Premature Rupture of Membranes. *Frontiers in Physiology* 11: 609
- Boyapati RK, Dorward DA, Tamborska A, Kalla R, Ventham NT, Doherty MK, Whitfield PD, Gray M, Loane J, Rossi AG, *et al* (2018) Mitochondrial DNA Is a Pro-Inflammatory Damage-Associated Molecular Pattern Released During Active IBD. *Inflamm Bowel Dis* 24: 2113–2122
- Brace RA (1997) Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 40: 280–289
- Bredeson S, Papaconstantinou J, Deford JH, Kechichian T, Syed TA, Saade GR & Menon R (2014) HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS ONE* 9: e113799
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C & Shaw A (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143: 1699–1712
- Brien M-E, Baker B, Duval C, Gaudreault V, Jones RL & Girard S (2019) Alarmins at the maternal-fetal interface: involvement of inflammation in placental dysfunction and pregnancy complications 1. *Can J Physiol Pharmacol* 97: 206–212
- Bryant-Greenwood GD, Kern A, Yamamoto SY, Sadowsky DW & Novy MJ (2007) Relaxin and the Human Fetal Membranes. *Reproductive Sciences* 14: 42–45
- Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY, Sadowsky DW, Gravett MG & Novy MJ (2009) Relaxin stimulates interleukin-6 and interleukin-8 secretion from the extraplacental chorionic cytotrophoblast. *Placenta* 30: 599–606
- Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP & Saed GM (2004) 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* 191: 1678–1687
- Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CM, Bahtiyar MO, Magloire LK, Thung S, Fairchild T & Buhimschi CS (2007) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196: 181.e1-181.e13
- Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN & Jauniaux E (2002) Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 2954–2959

- Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan L-J & Zhao B (2016) Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36: 483–495
- Canzoneri BJ, Feng L, Grotegut CA, Bentley RC, Heine RP & Murtha AP (2013) The chorion layer of fetal membranes is prematurely destroyed in women with preterm premature rupture of the membranes. *Reprod Sci* 20: 1246–1254
- Carlson BM (2018) Human Embryology and Developmental Biology E-Book Elsevier Health Sciences
- Casanueva E, Ripoll C, Tolentino M, Morales RM, Pfeffer F, Vilchis P & Vadillo-Ortega F (2005) Vitamin C supplementation to prevent premature rupture of the chorioamniotic membranes: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 81: 859–863
- Castillo-Castrejon M, Meraz-Cruz N, Gomez-Lopez N, Flores-Pliego A, Beltrán-Montoya J, Viveros-Alcaráz M & Vadillo-Ortega F (2014) Chorionic cells from term human pregnancies show distinctive functional properties related to the induction of labor. *Am J Reprod Immunol* 71: 86–93
- Caughey AB, Robinson JN & Norwitz ER (2008) Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol* 1: 11–22
- Chai M, Barker G, Menon R & Lappas M (2012) Increased oxidative stress in human fetal membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries. *Placenta* 33: 604–610
- Chai M, Walker SP, Riley C, Rice GE, Permezel M & Lappas M (2013) Effect of supracervical apposition and spontaneous labour on apoptosis and matrix metalloproteinases in human fetal membranes. *Biomed Res Int* 2013: 316146
- Chaiworapongsa T, Erez O, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Than NG, Mittal P, Kim YM, Camacho N, *et al* (2008) Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21: 449–461
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W & Lye SJ (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 21: 514–550
- Challis JRG, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, Gibb W, Patel FA, Whittle WL & Newnham JP (2002) Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 124: 1–17
- Chang J, Tracy TF, Carr SR, Sorrells DL & Luks FI (2006) Port insertion and removal techniques to minimize premature rupture of the membranes in endoscopic fetal surgery. *J Pediatr Surg* 41: 905–909
- Chapman S, Mick M, Hall P, Mejia C, Sue S, Abdul Wase B, Nguyen MA, Whisenant EC, Wilcox SH, Winden D, *et al* (2017) Cigarette smoke extract induces oral squamous cell carcinoma cell invasion in a receptor for advanced glycation end-products-dependent manner. *European Journal of Oral Sciences*

- Charles D & Edwards WR (1981) Infectious complications of cervical cerclage. *Am J Obstet Gynecol* 141: 1065–1071
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, *et al* (2003a) The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198: 1507–1515
- Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, Sachs UJH, Isordia-Salas I, Pixley RA, Nawroth PP, Colman RW & Preissner KT (2003b) High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 278: 45375–45381
- Chebotareva N, Bobkova I & Shilov E (2017) Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress Chaperones* 22: 319–343
- Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, Hao L & Hiramatsu Y (2006) Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta* 27: 225–233
- Cheknev SB, Vostrova EI, Apresova MA, Piskovskaya LS & Vostrov AV (2015) [Deceleration of bacterial growth in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* cultures in the presence of copper and zinc cations]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 9–17
- Chen GY & Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10: 826–837
- Chen L, Wang T, Guo L, Shen Y, Yang T, Wan C, Liao Z, Xu D & Wen F (2014a) Overexpression of RAGE contributes to cigarette smoke-induced nitric oxide generation in COPD. *Lung* 192: 267–275
- Chen R-C, Yi P-P, Zhou R-R, Xiao M-F, Huang Z-B, Tang D-L, Huang Y & Fan X-G (2014b) The role of HMGB1-RAGE axis in migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Cell Biochem* 390: 271–280
- Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, *et al* (2008) RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol* 181: 4272–4278
- Chen Y-Y, Chen C-P, Sun F-J & Chen C-Y (2019) Factors associated with neonatal outcomes in preterm prelabor rupture of membranes after cervical cerclage. *Int J Gynaecol Obstet* 147: 382–388
- Cheng Y, Wang D, Wang B, Li H, Xiong J, Xu S, Chen Q, Tao K, Yang X, Zhu Y, *et al* (2017) HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway. *MBoC* 28: 201–209

- Cheung CY, Li S, Chen D & Brace RA (2010) Regulation of caveolin-1 expression and phosphorylation by VEGF in ovine amnion cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif)* 17: 1112–1119
- Chhipa AS, Borse SP, Baksi R, Lalotra S & Nivsarkar M (2019) Targeting receptors of advanced glycation end products (RAGE): Preventing diabetes induced cancer and diabetic complications. *Pathol Res Pract* 215: 152643
- Chibbar R, Miller FD & Mitchell BF (1993) Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. *J Clin Invest* 91: 185–192
- Chibbar R, Wong S, Miller FD & Mitchell BF (1995) Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human chorio-decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 567–572
- Choltus H, Lavergne M, Belville C, Gallot D, Minet-Quinard R, Durif J, Blanchon L & Sapin V (2020) Occurrence of a RAGE-Mediated Inflammatory Response in Human Fetal Membranes. *Front Physiol* 11
- Chou DKH, Zhang J, Smith FI, McCaffery P & Jungalwala FB (2004) Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphoterin and sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration. *J Neurochem* 90: 1389–1401
- Chowdhury B, David AL, Thrasivoulou C, Becker DL, Bader DL & Chowdhury TT (2014) Tensile strain increased COX-2 expression and PGE2 release leading to weakening of the human amniotic membrane. *Placenta* 35: 1057–1064
- Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH & Nordin N (2013) Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. *International Journal of Inflammation* 2013: 1–15
- Colatto BN, de Souza IF, Schinke LAA, Noda-Nicolau NM, da Silva MG, Morceli G, Menon R & Poletti J (2020) Telomere Length and Telomerase Activity in Foetal Membranes from Term and Spontaneous Preterm Births. *Reprod Sci* 27: 411–417
- Colleoni F, Lattuada D, Garretto A, Massari M, Mandò C, Somigliana E & Cetin I (2010) Maternal blood mitochondrial DNA content during normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 203: 365.e1-365.e6
- Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, Schmidt AM, Stern DM & Al-Mohanna FA (2002) RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol* 71: 433–444
- Combadière B, Combadière C & Deterre P (2007) Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. *Med Sci (Paris)* 23: 173–179
- Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW & Mendelson CR (2003) A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize

- progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9518–9523
- Connolly AM, Katz VL, Bash KL, McMahon MJ & Hansen WF (1997) Trauma and pregnancy. *Am J Perinatol* 14: 331–336
- Cox SM, Casey ML & MacDonald PC (1997) Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Hum Reprod Update* 3: 517–527
- Dahlmann M, Okhrimenko A, Marcinkowski P, Osterland M, Herrmann P, Smith J, Heizmann CW, Schlag PM & Stein U (2014) RAGE mediates S100A4-induced cell motility via MAPK/ERK and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 5: 3220–3233
- Dale PO, Tanbo T, Bendvold E & Moe N (1989) Duration of the latency period in preterm premature rupture of the membranes. Maternal and neonatal consequences of expectant management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 30: 257–262
- Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CWV, Heizmann CW & Chazin WJ (2007) The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry* 46: 6957–6970
- Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ & Blanco FJ (2010) Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. *Tissue Engineering Part C: Methods* 17: 49–59
- DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K & Martel-Pelletier J (1995) Coordinate regulation of matrix metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol Suppl* 43: 123–128
- Dietrich M, Block G, Norkus EP, Hudes M, Traber MG, Cross CE & Packer L (2003) Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 77: 160–166
- Donato R (2007) RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* 7: 711–724
- Dorfeuille N, Morin V, Tétu A, Demers S, Laforest G, Gouin K, Piedboeuf B & Bujold E (2016) Vaginal Fluid Inflammatory Biomarkers and the Risk of Adverse Neonatal Outcomes in Women with PPRM. *Am J Perinatol* 33: 1003–1007
- Drake L & Scott P (2019) Investigation into RAGE as a biomarker of the LPS-induced murine model of neuroinflammation. *Journal of Nuclear Medicine* 60: 480–480
- Duong TD & Erickson CA (2004) MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev Dyn* 229: 42–53

- Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M & Menon R (2016) Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod* 22: 143–157
- Eddie LW, Cameron IT, Leeton JF, Healy DL & Renou P (1990) Ovarian relaxin is not essential for dilatation of cervix. *Lancet* 336: 243
- Ekpu VU & Brown AK (2015) The Economic Impact of Smoking and of Reducing Smoking Prevalence: Review of Evidence. *Tobacco Use Insights* 8: TUI.S15628
- El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, Redline RW, Mansour JM & Moore JJ (2005) Term Human Fetal Membranes Have a Weak Zone Overlying the Lower Uterine Pole and Cervix Before Onset of Labor¹. *Biology of Reproduction* 72: 720–726
- El-Asmar L, Springael J-Y, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G & Parmentier M (2005) Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol* 67: 460–469
- El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F & Raghupathy R (2004) Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 52: 45–52
- Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J & Kämmerer U (2007) Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 58: 129–137
- England M, Benjamin A & Abenhaim H (2013) Increased Risk of Preterm Premature Rupture of Membranes at Early Gestational Ages among Maternal Cigarette Smokers. *American Journal of Perinatology* 30: 821–826
- Faas MM & De Vos P (2018) Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 69: 125–133
- Farhan SS & Hussain SA (2019) Advanced glycation end products (AGEs) and their soluble receptors (sRAGE) as early predictors of reno-vascular complications in patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 13: 2457–2461
- Fatchiyah F, Hardiyanti F & Widodo N (2015) Selective Inhibition on RAGE-binding AGEs Required by Bioactive Peptide Alpha-S2 Casein Protein from Goat Ethawah Breed Milk: Study of Biological Modeling. *Acta Inform Med* 23: 90–96
- Ferrand PE, Parry S, Sammel M, Macones GA, Kuivaniemi H, Romero R & Strauss JF (2002) 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* 8: 494–501

- Ferrari F, Facchinetti F, Saade G & Menon R (2016) Placental telomere shortening in stillbirth: a sign of premature senescence? *J Matern Fetal Neonatal Med* 29: 1283–1288
- Fishman SL, Sonmez H, Basman C, Singh V & Poretsky L (2018) The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. *Mol Med* 24: 59
- Fortunato SJ, Menon R, Bryant C & Lombardi SJ (2000) Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 182: 1468–1476
- Fortunato SJ, Menon R & Lombardi SJ (1999) MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 27: 362–368
- Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV & Schaefer L (2013) Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J* 280: 2165–2179
- Friel LA, Romero R, Edwin S, Nien JK, Gomez R, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Tolosa JE, Hassan SS & Espinoza J (2007) The calcium binding protein, S100B, is increased in the amniotic fluid of women with intra-amniotic infection/inflammation and preterm labor with intact or ruptured membranes. *J Perinat Med* 35: 385–393
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS & Fernström MJ (1982) Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 215: 1396–1398
- Fuchs AR, Romero R, Keefe D, Parra M, Oyarzun E & Behnke E (1991) Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1515–1523
- Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, Sammel M, Macones G, Kuivaniemi H, Romero R & Strauss JF (2002) A Single Nucleotide Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Promoter Influences Amnion Cell MMP-1 Expression and Risk for Preterm Premature Rupture of the Fetal Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6296–6302
- Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri A, Erez O & Mazor M (2000) Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 209–216
- Galaz J, Romero R, Slutsky R, Xu Y, Motomura K, Para R, Pacora P, Panaitescu B, Hsu C-D, Kacerovsky M, *et al* (2020) Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm prelabor rupture of membranes. *J Perinat Med* 48: 222–233
- Galazka K, Wicherek L, Pitynski K, Kijowski J, Zajac K, Bednarek W, Dutsch-Wicherek M, Rytlewski K, Kalinka J, Basta A, *et al* (2009) Changes in the subpopulation of CD25+ CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in decidua with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in the subpopulation of suppressive B7-H4 macrophages—a preliminary report. *Am J Reprod Immunol* 61: 136–146

- Garamvölgyi Z, Prohászka Z, Rigó J, Kecskeméti A & Molvarec A (2015) Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Cell Stress Chaperones* 20: 575–581
- García-Velasco JA & Arici A (1999) Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril* 71: 983–993
- Gautieri A, Passini FS, Silván U, Guizar-Sicairos M, Carimati G, Volpi P, Moretti M, Schoenhuber H, Redaelli A, Berli M, *et al* (2017) Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol* 59: 95–108
- Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Lituania M, Marras M, Bruschetti M, Bruschetti P, Frulio R, Michetti F, Petraglia F, *et al* (2006) High maternal blood S100B concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and intraventricular hemorrhage. *Clin Chem* 52: 819–826
- George RB, Kalich J, Yonish B & Murtha AP (2008) Apoptosis in the chorion of fetal membranes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 25: 29–32
- Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Parížek A, Zima T & Kalousová M (2010) Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy. *Clin Biochem* 43: 442–446
- Getahun D, Strickland D, Ananth CV, Fassett MJ, Sacks DA, Kirby RS & Jacobsen SJ (2010) Recurrence of preterm premature rupture of membranes in relation to interval between pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 202: 570.e1–6
- Giannakou M, Saltiki K, Mantzou E, Loukari E, Philippou G, Terzidis K, Lili K, Stavrianos C, Kyprianou M & Alevizaki M (2017) RAGE polymorphisms and oxidative stress levels in Hashimoto's thyroiditis. *European Journal of Clinical Investigation* 47: 341–347
- Girard S, Heazell AEP, Derricott H, Allan SM, Sibley CP, Abrahams VM & Jones RL (2014) Circulating cytokines and alarmins associated with placental inflammation in high-risk pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 72: 422–434
- Gomez-Lopez N, Romero R, Leng Y, Xu Y, Slutsky R, Levenson D, Pacora P, Jung E, Panaitescu B & Hsu C-D (2019) The origin of amniotic fluid monocytes/macrophages in women with intra-amniotic inflammation or infection. *J Perinat Med* 47: 822–840
- Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Miller D, Leng Y, Panaitescu B, Silva P, Faro J, Alhousseini A, Gill N, *et al* (2018) The immunophenotype of amniotic fluid leukocytes in normal and complicated pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology* 79: e12827
- Goodwin TM (1999) A role for estriol in human labor, term and preterm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180: S208–S213
- Gross C, Belville C, Lavergne M, Choltus H, Jabaudon M, Blondonnet R, Constantin J-M, Chiambaretta F, Blanchon L & Sapin V (2020) Advanced Glycation End Products and

Receptor (RAGE) Promote Wound Healing of Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61

- Guarino M, Tosoni A & Nebuloni M (2009) Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology* 40: 1365–1376
- Guedes-Martins L, Matos L, Soares A, Silva E & Almeida H (2013) AGEs, contributors to placental bed vascular changes leading to preeclampsia. *Free Radical Research* 47: 70–80
- Guinn DA, Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW, Thom E & Romero R (1995) Risk factors for the development of preterm premature rupture of the membranes after arrest of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 173: 1310–1315
- Günther V, Alkatout I, Stein A, Maass N, Strauss A & Voigt M (2020) Impact of smoking and fetal gender on preterm delivery. *J Dev Orig Health Dis*: 1–6
- Gupta S, Gaikwad HS, Nath B & Batra A (2020) Can vitamin C and interleukin 6 levels predict preterm premature rupture of membranes: evaluating possibilities in North Indian population. *Obstet Gynecol Sci* 63: 432–439
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Semerci N, Basar M, Buchwalder LF, Buhimschi CS, Buhimschi IA, Arcuri F, Larsen K, Huang JS, *et al* (2015) Mechanisms of chorioamnionitis-associated preterm birth: interleukin-1 β inhibits progesterone receptor expression in decidual cells. *J Pathol* 237: 423–434
- Hadley CB, Main DM & Gabbe SG (1990) Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol* 7: 374–379
- Hájek Z, Germanová A, Koucký M, Zima T, Kopecký P, Vítkova M, Pařízek A & Kalousová M (2008) Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study. *Journal of Perinatal Medicine* 36
- Hamza A, Herr D, Solomayer EF & Meyberg-Solomayer G (2013) Polyhydramnios: Causes, Diagnosis and Therapy. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde* 73: 1241–1246
- Han S, Yang H, Han Y & Zhang H (2019) Genes and transcription factors related to the adverse effects of maternal type I diabetes mellitus on fetal development. *Mol Cell Probes* 43: 64–71
- Harirah HM, Borahay MA, Zaman W, Ahmed MS & Hankins GD (2012) Increased Apoptosis in Chorionic Trophoblasts of Human Fetal Membranes with Labor at Term. *Int J Clin Med* 3: 136–142
- Harsem NK, Braekke K, Torjussen T, Hanssen K & Staff AC (2008) Advanced Glycation End Products in Pregnancies Complicated with Diabetes Mellitus or Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 27: 374–386

- Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, ten Hacken NHT, van Oosterhout AJM, Nawijn MC & van der Toorn M (2015) Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils triggers proinflammatory mediator release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52: 554–562
- Hernandez-Segura A, Nehme J & Demaria M (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28: 436–453
- Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, Emond J, Clynes R & Schmidt AM (2007) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol* 82: 204–212
- Hirsch L, Borovich A, Gabbay-Benziv R, Maimon-Cohen M, Aviram A, Yogev Y & Ashwal E (2017) Can we predict successful cervical ripening with prostaglandin E2 vaginal inserts? *Arch Gynecol Obstet* 295: 343–349
- Higa K, Shimmura S, Shimazaki J & Tsubota K (2005) Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 24: 206–212
- Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB & Dey SK (2010) Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest* 120: 803–815
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, *et al* (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889–901
- Holmgren PA & Olofsson JI (1997) Preterm premature rupture of membranes and the associated risk for placental abruption. Inverse correlation to gestational length. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76: 743–747
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S & Nitecki D (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270: 25752–25761
- Hsieh H-L, Schäfer BW, Weigle B & Heizmann CW (2004) S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 949–959
- Hsieh LT-H, Nastase M-V, Zeng-Brouwers J, Iozzo RV & Schaefer L (2014) Soluble biglycan as a biomarker of inflammatory renal diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 0: 223–235
- Huang H, Chen H-W, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, Ding Q, Loughran P, Beer-Stolz D, Billiar TR, *et al* (2013) Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol* 191: 2665–2679

- Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, Liao X, Billiar T, Xu J, Esmon CT, *et al* (2011) Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology* 54: 999–1008
- Huang S, Xia W, Li Y, Zhang B, Zhou A, Zheng T, Qian Z, Huang Z, Lu S, Chen Z, *et al* (2017) Association between maternal urinary chromium and premature rupture of membranes in the Healthy Baby Cohort study in China. *Environ Pollut* 230: 53–60
- Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ & Schmidt AM (2008a) Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J* 22: 1572–1580
- Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V & Schmidt AM (2008b) Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 283: 34457–34468
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS & Grant PJ (2001) Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50: 1505–1511
- Husslein P (1984) [The importance of oxytocin and prostaglandins to the mechanism of labor in humans]. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 155: 1–32
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R & Rauvala H (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275: 40096–40105
- Iannuzzi C, Irace G & Sirangelo I (2014) Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation. *Front Mol Biosci* 1: 9
- Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S & Sukkar MB (2013) RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Molecular Immunology* 56: 739–744
- Ichiki T, Koga T, Okuno T, Saeki K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sakaguchi M & Yokomizo T (2016) Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FASEB J* 30: 1811–1822
- Ito A, Hiro D, Sakyo K & Mori Y (1987) The role of leukocyte factors on uterine cervical ripening and dilation. *Biol Reprod* 37: 511–517
- Ito A, Nakamura T, Uchiyama T, Hirose K, Hirakawa S, Sasaguri Y & Mori Y (1994) Stimulation of the biosynthesis of interleukin 8 by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in cultured human chorionic cells. *Biol Pharm Bull* 17: 1463–1467
- Izushi Y, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Wake H, Takata K, Yoshino T, Takahashi HK, Mori S & Nishibori M (2016) Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products

- attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Pharmacol Sci* 130: 226–234
- Jacobs SO, Sheller-Miller S, Richardson LS, Urrabaz-Garza R, Radnaa E & Menon R (2020) Characterizing the Immune Cell Population in the Human Fetal Membrane. *American Journal of Reproductive Immunology*
- Jangde N, Ray R & Rai V (2020) RAGE and its ligands: from pathogenesis to therapeutics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 0: 1–21
- Janzen C, Sen S, Lei MYY, Gagliardi de Assumpcao M, Challis J & Chaudhuri G (2017) The Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Membrane Rupture. *J Clin Endocrinol Metab* 102: 1261–1269
- Jia X (2014) Value of amniotic fluid IL-8 and Annexin A2 in prediction of preterm delivery in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Reprod Med* 59: 154–160
- Jin J, Richardson L, Sheller-Miller S, Zhong N & Menon R (2018a) Oxidative stress induces p38MAPK-dependent senescence in the feto-maternal interface cells. *Placenta* 67: 15–23
- Jin S, Xia W, Jiang Y, Sun X, Huang S, Zhang B, Zhou A, Zheng T, Xu S & Li Y (2018b) Urinary vanadium concentration in relation to premature rupture of membranes: A birth cohort study. *Chemosphere* 210: 1035–1041
- Jones CW, Gambala C, Esteves KC, Wallace M, Schlesinger R, O'Quinn M, Kidd L, Theall KP & Drury SS (2017) Differences in placental telomere length suggest a link between racial disparities in birth outcomes and cellular aging. *Am J Obstet Gynecol* 216: 294.e1–294.e8
- Jung EY, Park KH, Han BR, Cho S-H & Ryu A (2017) Measurement of Interleukin 8 in Cervicovaginal Fluid in Women With Preterm Premature Rupture of Membranes: A Comparison of Amniotic Fluid Samples. *Reprod Sci* 24: 142–147
- Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, Drahosova M, Hornychova H, Janku P, Prochazka M, Simetka O & Andrys C (2015a) Cervical fluid IL-6 and IL-8 levels in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28: 134–140
- Kacerovsky M, Tothova L, Menon R, Vlkova B, Musilova I, Hornychova H, Prochazka M & Celec P (2015b) Amniotic fluid markers of oxidative stress in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28: 1250–1259
- Kalea AZ, Schmidt AM & Hudson BI (2009) RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci* 116: 621–637
- Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan X-G, Yan Z, *et al* (2014) HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* 40: 1–116

- Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, Bierhaus A, Lotze MT & Zeh HJ (2010) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ* 17: 666–676
- Kansu-Celik H, Tasci Y, Karakaya BK, Cinar M, Candar T & Caglar GS (2019) Maternal serum advanced glycation end products level as an early marker for predicting preterm labor/PPROM: a prospective preliminary study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 32: 2758–2762
- Kanyshkova TG, Buneva VN & Nevinsky GA (2001) Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry Mosc* 66: 1–7
- Kazama H, Ricci J-E, Herndon JM, Hoppe G, Green DR & Ferguson TA (2008) Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 29: 21–32
- Khatun T, Ansari AA, Hamid I, Gupta RS & Ahmad MdP (2017) Oligohydramnios and Fetal Outcome: A Review. *Med Phoenix* 1: 23–30
- Kibel M, Barrett J, Tward C, Pittini A, Kahn M & Melamed N (2017) The natural history of preterm premature rupture of membranes in twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 30: 1829–1835
- Kim HJ, Park KH, Kim YM, Joo E, Ahn K & Shin S (2020) A protein microarray analysis of amniotic fluid proteins for the prediction of spontaneous preterm delivery in women with preterm premature rupture of membranes at 23 to 30 weeks of gestation. *PLoS One* 15: e0244720
- Kim S, Takahashi H, Lin W-W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J-L & Karin M (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457: 102–106
- King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD & Challis JRG (2007) Expression of Natural Antimicrobials by Human Placenta and Fetal Membranes. *Placenta* 28: 161–169
- Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Ulbjerg N & Madsen H (2001) Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94: 224–229
- Ko S-Y, Ko H-A, Shieh T-M, Chang W-C, Chen H-I, Chang S-S & Lin I-H (2014) Cell Migration Is Regulated by AGE-RAGE Interaction in Human Oral Cancer Cells In Vitro. *PLoS One* 9
- Koay ES, Too CK, Greenwood FC & Bryant-Greenwood GD (1983) Relaxin stimulates collagenase and plasminogen activator secretion by dispersed human amnion and chorion cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 1332–1334

- Kobayashi K, Miwa H & Yasui M (2010) Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol (Lond)* 588: 4859–4869
- Kobayashi K & Yasui M (2010) Cellular and subcellular localization of aquaporins 1, 3, 8, and 9 in amniotic membranes during pregnancy in mice. *Cell and Tissue Research* 342: 307–316
- Kokkinos MI (2009) A novel role for ac-FOX-O1 in fetal membrane rupture. *Reprod Sci* 16: 625–626
- Konishi H (2004) Advanced glycation end products induce secretion of chemokines and apoptosis in human first trimester trophoblasts. *Human Reproduction* 19: 2156–2162
- Kota SK, Gayatri K, Jammula S, Kota SK, Krishna SVS, Meher LK & Modi KD (2013) Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab* 17: 50–59
- Krysiak K, Dobrowolski D, Wylegala E & Lyssek-Boron A (2020) Amniotic Membrane as a Main Component in Treatments Supporting Healing and Patch Grafts in Corneal Melting and Perforations. *J Ophthalmol* 2020: 4238919
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN & Vandenabeele P (2011) Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 32: 157–164
- Kumagai K, Otsuki Y, Ito Y, Shibata MA, Abe H & Ueki M (2001) Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Mol Hum Reprod* 7: 681–689
- Lallar M, Anam Ul Haq null & Nandal R (2015) Perinatal Outcome in Idiopathic Polyhydramnios. *J Obstet Gynaecol India* 65: 310–314
- Lappas M, Lim R, Riley C, Menon R & Permezel M (2010) Expression and localisation of FoxO3 and FoxO4 in human placenta and fetal membranes. *Placenta* 31: 1043–1050
- Lappas M, Lim R, Riley C, Rice GE & Permezel M (2009) Localisation and expression of FoxO1 proteins in human gestational tissues. *Placenta* 30: 256–262
- Lappas M, Permezel M & Rice GE (2003) N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1723–1729
- Larsen WJ, Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH, Alexandre H & Milaire J (2017) Embryologie humaine de Larsen
- Lavery JP & Miller CE (1977) The viscoelastic nature of chorioamniotic membranes. *Obstet Gynecol* 50: 467–472

- Lazar L, Rigó J, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z & Molvarec A (2009) Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. *BMC Med Genet* 10: 120
- Le Y, Wang Y, Zhou L, Xiong J, Tian J, Yang X, Gai X & Sun Y (2020) Cigarette smoke-induced HMGB1 translocation and release contribute to migration and NF- κ B activation through inducing autophagy in lung macrophages. *J Cell Mol Med* 24: 1319–1331
- Leak RK (2014) Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal* 8: 293–310
- Leclerc E, Fritz G, Vetter SW & Heizmann CW (2009) Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793: 993–1007
- Lee J, Taneja V & Vassallo R (2012) Cigarette Smoking and Inflammation. *J Dent Res* 91: 142–149
- Lei H, Li X, Jing B, Xu H & Wu Y (2017) Human S100A7 Induces Mature Interleukin1 α Expression by RAGE-p38 MAPK-Calpain1 Pathway in Psoriasis. *PLoS ONE* 12: e0169788
- Levine M & Violet P-C (2017) Breaking down, starting up: can a vitamin C-enriched gelatin supplement before exercise increase collagen synthesis? *Am J Clin Nutr* 105: 5–7
- Lewis J, Hirschi K, Arroyo J, Bikman B, Kooyman D & Reynolds P (2017a) Plausible Roles for RAGE in Conditions Exacerbated by Direct and Indirect (Secondhand) Smoke Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 652
- Lewis JB, Mejia C, Jordan C, Monson TD, Bodine JS, Dunaway TM, Egbert KM, Lewis AL, Wright TJ, Ogden KC, *et al* (2017b) Inhibition of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) protects from secondhand smoke (SHS)-induced intrauterine growth restriction IUGR in mice. *Cell and Tissue Research* 370: 513–521
- Li J & Schmidt AM (1997) Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272: 16498–16506
- Li S & Yang H (2019) Relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 32: 2783–2789
- Li W & Challis JRG (2005) 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 6569–6574
- Li W, Unlagedik E, Bocking AD & Challis JRG (2007) The role of prostaglandins in the mechanism of lipopolysaccharide-induced proMMP9 secretion from human placenta and fetal membrane cells. *Biol Reprod* 76: 654–659

- Li W, Zhao X, Li S, Chen X, Cui H, Chang Y & Zhang R (2020) Upregulation of TNF- α and IL-6 induces preterm premature rupture of membranes by activation of ADAMTS-9 in embryonic membrane cells. *Life Sci* 260: 118237
- Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gröne H-J, Kurschus FC, Schmidt AM, *et al* (2004) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *Journal of Clinical Investigation* 113: 1641–1650
- Lim R, Barker G & Lappas M (2017) SMAD7 regulates proinflammatory and prolabor mediators in amnion and myometrium. *Biol Reprod* 97: 288–301
- Lin L, Park S & Lakatta EG (2009) RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 1403–1413
- Lindstrom TM & Bennett PR (2005) The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction* 130: 569–581
- Linn S, Schoenbaum SC, Monson RR, Rosner B, Stubblefield PG & Ryan KJ (1983) The relationship between induced abortion and outcome of subsequent pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 146: 136–140
- Liu T, Zhang L, Joo D & Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2: 17023
- Longini M, Perrone S, Vezzosi P, Marzocchi B, Kenanidis A, Centini G, Rosignoli L & Buonocore G (2007) Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. *Clin Biochem* 40: 793–797
- Lorenz E, Muhlebach MS, Tessier PA, Alexis NE, Duncan Hite R, Seeds MC, Peden DB & Meredith W (2008) Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir Med* 102: 567–573
- Luck W, Nau H, Hansen R & Steldinger R (1985) Extent of Nicotine and Cotinine Transfer to the Human Fetus, Placenta and Amniotic Fluid of Smoking Mothers. *Dev Pharmacol Ther* 8: 384–395
- Luster AD, Alon R & von Andrian UH (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6: 1182–1190
- Maeda A & Fadeel B (2014) Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis* 5: e1312
- Maehara K, Kanayama N, Maradny EE, Uezato T, Fujita M & Terao T (1996) 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* 70: 191–196
- de Magalhães JP & Passos JF (2018) Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev* 170: 2–9

- Malak TM & Bell SC (1994) Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 375–386
- Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, Raucci A, Sanvito F, Doglioni C, Nawroth PP, *et al* (2008) Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol* 180: 2270–2275
- Mano Y, Shibata K, Sumigama S, Hayakawa H, Ino K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A & Kikkawa F (2009) Tocilizumab inhibits interleukin-6-mediated matrix metalloproteinase-2 and -9 secretions from human amnion cells in preterm premature rupture of membranes. *Gynecol Obstet Invest* 68: 145–153
- Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20: 254–257
- Maradny EE, Kanayama N, Halim A, Maehara K & Terao T (1996) Stretching of fetal membranes increases the concentration of interleukin-8 and collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* 174: 843–849
- Marcellin L, Schmitz T, Messaoudene M, Chader D, Parizot C, Jacques S, Delaire J, Gogusev J, Schmitt A, Lesaffre C, *et al* (2017) Immune Modifications in Fetal Membranes Overlying the Cervix Precede Parturition in Humans. *J Immunol* 198: 1345–1356
- Marinoni E, Frigiola A, Gazzolo D, Greco P, Vimercati A, Moscarini M, Abella R & Di Iorio R (2010) S100 beta protein is increased in fetuses with neural tube defect. *Front Biosci (Elite Ed)* 2: 47–51
- Marković S, Bogdanović G & Cerovac A (2020) Premature and preterm premature rupture of membranes in adolescent compared to adult pregnancy. *Med Glas (Zenica)* 17
- Marrs C, Chesmore K, Menon R & Williams S (2018) Maternal human telomerase reverse transcriptase variants are associated with preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *PLoS ONE* 13: e0195963
- Martin LF, Moço NP, de Lima MD, Polettini J, Miot HA, Corrêa CR, Menon R & da Silva MG (2017) Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery. *BMC Pregnancy Childbirth* 17: 376
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237–241
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991–1045
- Matzinger P (2002) The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296: 301–305

- May O, Yatime L, Merle NS, Delguste F, Howsam M, Daugan MV, Paul-Constant C, Billamboz M, Ghinet A, Lancel S, *et al* (2020) The receptor for advanced glycation end products is a sensor for cell-free heme. *FEBS J*
- Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R & Romero R (1999) The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 181: 1142–1148
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F & Yoon BH (2000a) Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 183: 914–920
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Athayde N, Edwin S & Yoon BH (2000b) Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 183: 94–99
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim JC, Yoon BH, Menon R, *et al* (2001) A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *J Perinat Med* 29: 308–316
- McHugh D & Gil J (2018a) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* 217: 65–77
- McHugh D & Gil J (2018b) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of Cell Biology* 217: 65–77
- McLaren J, Malak TM & Bell SC (1999) Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* 14: 237–241
- McLaughlin J & Devoe LD (2017) Current Status of Prostaglandins for Cervical Ripening. *J Reprod Med* 62: 221–228
- Méhats C, Schmitz T, Marcellin L & Breuiller-Fouché M (2011a) Biochimie de la rupture des membranes fœtales. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 39: 365–369
- Menon R (2019) Initiation of human parturition: signaling from senescent fetal tissues via extracellular vesicle mediated paracrine mechanism. *Obstet Gynecol Sci* 62: 199–211
- Menon R, Behnia F, Polettini J, Saade GR, Campisi J & Velarde M (2016a) Placental membrane aging and HMGB1 signaling associated with human parturition. *Aging* 8: 216–230
- Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettini J, Syed TA, Fortunato SJ, Saade GR, Papaconstantinou J & Taylor RN (2014) Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol* 184: 1740–1751

- Menon R, Boldogh I, Urrabaz-Garza R, Polettini J, Syed TA, Saade GR, Papaconstantinou J & Taylor RN (2013) Senescence of primary amniotic cells via oxidative DNA damage. *PLoS ONE* 8: e83416
- Menon R, Bonney EA, Condon J, Mesiano S & Taylor RN (2016b) Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: redundancy and synergy in human parturition. *Hum Reprod Update* 22: 535–560
- Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, Lappas M & Taylor RN (2011) Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. *Placenta* 32: 317–322
- Menon R, Lombardi SJ & Fortunato SJ (2001) 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* 18: 276–284
- Menon R, Lombardi SJ & Fortunato SJ (2002) TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet* 19: 201–204
- Menon R & Richardson LS (2017a) Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Seminars in Perinatology* 41: 409–419
- Menon R & Richardson LS (2017b) Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Seminars in Perinatology* 41: 409–419
- Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ & Taylor RN (2012) Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS ONE* 7: e31136
- Mercer BM (2003) Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 101: 178–193
- Mercer BM, Crocker LG, Pierce WF & Sibai BM (1993) Clinical characteristics and outcome of twin gestation complicated by preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1467–1473
- Mesiano S, Chan E-C, Fitter JT, Kwek K, Yeo G & Smith R (2002) Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2924–2930
- Mesiano S, Wang Y & Norwitz ER (2011) Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci* 18: 6–19
- Michalczyk M, Celewicz A, Celewicz M, Woźniakowska-Gondek P & Rzepka R (2020) The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Mediators of Inflammation* 2020: 1–9
- Middleton P, Shepherd E, Flenady V, McBain RD & Crowther CA (2017) Planned early birth versus expectant management (waiting) for prelabour rupture of membranes at term (37 weeks or more). *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD005302

- Mitchell MD, Romero RJ, Edwin SS & Trautman MS (1995) Prostaglandins and parturition. *Reprod Fertil Dev* 7: 623–632
- Modi BP, Parikh HI, Teves ME, Kulkarni R, Liyu J, Romero R, York TP & Strauss JF (2018) Discovery of rare ancestry-specific variants in the fetal genome that confer risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM) and preterm birth. *BMC Medical Genetics* 19
- Modi BP, Teves ME, Pearson LN, Parikh HI, Haymond-Thornburg H, Tucker JL, Chaemsaitong P, Gomez-Lopez N, York TP, Romero R, *et al* (2017) 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* 5: 720–729
- Molvarec A, Tamási L, Losonczy G, Madách K, Prohászka Z & Rigó J (2010) Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones* 15: 237–247
- Monboisse JC, Braquet P, Randoux A & Borel JP (1983) Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 32: 53–58
- Moore JJ, Dubyak GR, Moore RM & Vander Kooy D (1988) Oxytocin activates the inositol-phospholipid-protein kinase-C system and stimulates prostaglandin production in human amnion cells. *Endocrinology* 123: 1771–1777
- Moores J (2013) Vitamin C: a wound healing perspective. *Br J Community Nurs* Suppl: S6, S8-11
- Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, Gretz N, Spieker T, Zeng-Brouwers J, Pfeilschifter J, Young MF, Schaefer RM & Schaefer L (2010) The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest* 120: 4251–4272
- Moutquin J-M (2003) Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG* 110 Suppl 20: 30–33
- Muraine M, Gueudry J, Toubreau D, Gardea E, Verspyck E, Menguy E & Brasseur G (2006) Intérêt des greffes de membranes amniotiques dans les pathologies oculaires de surface. *Journal Français d'Ophtalmologie* 29: 1070–1083
- Murphy DJ & MacKenzie IZ (1995) The mortality and morbidity associated with umbilical cord prolapse. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 826–830
- Murphy PM (2001) Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol* 2: 116–122
- Murtha AP, Auten R & Herbert WNP (2002) Apoptosis in the chorion laeve of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 10: 93–96

- Musilova I, Tothova L, Menon R, Vlkova B, Celec P, Hornychova H, Kutova R, Andrys C, Stepan M & Kacerovsky M (2016) Umbilical cord blood markers of oxidative stress in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 29: 1900–1910
- Muter J, Lucas ES, Chan Y-W, Brighton PJ, Moore JD, Lacey L, Quenby S, Lam EW-F & Brosens JJ (2015) The clock protein period 2 synchronizes mitotic expansion and decidual transformation of human endometrial stromal cells. *FASEB J* 29: 1603–1614
- Myatt L (2010) Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31 Suppl: S66-69
- Myles TD, Espinoza R, Meyer W, Bieniarz A & Nguyen T (1998) Effects of smoking, alcohol, and drugs of abuse on the outcome of 'expectantly' managed cases of preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Med* 7: 157–161
- Nabet C, Lelong N, Ancel P-Y, Saurel-Cubizolles M-J & Kaminski M (2007) Smoking during pregnancy according to obstetric complications and parity: results of the EUROPOP study. *Eur J Epidemiol* 22: 715–721
- Nadeau HCG, Subramaniam A & Andrews WW (2016) Infection and preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 21: 100–105
- Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien M-È, Duval C, Chemtob S & Girard S (2016) Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction* 152: R277–R292
- Naef RW, Allbert JR, Ross EL, Weber BM, Martin RW & Morrison JC (1998) Premature rupture of membranes at 34 to 37 weeks' gestation: aggressive versus conservative management. *Am J Obstet Gynecol* 178: 126–130
- Naeye RL & Peters EC (1980) Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. *Lancet* 1: 192–194
- Nair M, Jagadeeshan S, Katselis G, Luan X, Momeni Z, Henao-Romero N, Chumala P, Tam JS, Yamamoto Y, Ianowski JP, *et al* (2021) Lipopolysaccharides induce a RAGE-mediated sensitization of sensory neurons and fluid hypersecretion in the upper airways. *Sci Rep* 11: 8336
- Nair RR, Khanna A & Singh K (2013) Role of inflammatory proteins S100A8 and S100A9 in pathophysiology of recurrent early pregnancy loss. *Placenta* 34: 824–827
- Nastase MV, Young MF & Schaefer L (2012) Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem* 60: 963–975
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D & Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267: 14998–15004
- Neerhof MG, MacGregor SN, Retzky SS & Sullivan TP (1989) Cocaine abuse during pregnancy: peripartum prevalence and perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 161: 633–638

- Newton ER (2005) Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 32: 571–600
- Newton ER, Prihoda TJ & Gibbs RS (1989) Logistic regression analysis of risk factors for intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 73: 571–575
- 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* (2010) Characterization of the transcriptome of chorioamniotic membranes at the site of rupture in spontaneous labor at term. *Am J Obstet Gynecol* 202: 462.e1–41
- Nicholl ID & Bucala R (1998) Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44: 1025–1033
- Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB & Bucala R (1998) Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med* 4: 594–601
- Norwitz ER, Bonney EA, Snegovskikh VV, Williams MA, Phillippe M, Park JS & Abrahams VM (2015) Molecular Regulation of Parturition: The Role of the Decidual Clock. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5
- Notsu M, Kanazawa I, Takeno A, Yokomoto-Umakoshi M, Tanaka K-I, Yamaguchi T & Sugimoto T (2017) Advanced Glycation End Product 3 (AGE3) Increases Apoptosis and the Expression of Sclerostin by Stimulating TGF- β Expression and Secretion in Osteocyte-Like MLO-Y4-A2 Cells. *Calcif Tissue Int* 100: 402–411
- Núñez-Sánchez E, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, González-Ibarra L, Cisneros J, Olmos-Ortiz A, Quesada-Reyna B, Granados-Cepeda M & Zaga-Clavellina V Prolactin modifies the in vitro LPS-induced chemotactic capabilities in human fetal membranes at the term of gestation. *American Journal of Reproductive Immunology* n/a: e13413
- Ocviyanti D & Wahono WT (2018) Risk Factors for Neonatal Sepsis in Pregnant Women with Premature Rupture of the Membrane. *J Pregnancy* 2018: 4823404
- Oliver EA, Buhimschi CS, Dulay AT, Baumbusch MA, Abdel-Razeq SS, Lee SY, Zhao G, Jing S, Pettker CM & Buhimschi IA (2011) Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products System in Women with Severe Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: 689–698
- Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, *et al* (2007) A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 26: 1129–1139
- Ota K, Yamagishi S, Kim M, Dambaeva S, Gilman-Sachs A, Beaman K & Kwak-Kim J (2014) Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in recurrent pregnancy losses (RPL): possible participation of RAGE in RPL. *Fertil Steril* 102: 782–789

- Oyen ML, Calvin SE & Landers DV (2006) Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol* 195: 510–515
- Padron JG, Saito Reis CA & Kendal-Wright CE (2020) The Role of Danger Associated Molecular Patterns in Human Fetal Membrane Weakening. *Front Physiol* 11
- Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D & Goldsmith LT (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* 142: 3405–3413
- Park H, Adsit FG & Boyington JC (2010) The 1.5 Å crystal structure of human receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ectodomains reveals unique features determining ligand binding. *J Biol Chem* 285: 40762–40770
- Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH & Romero R (2003) Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* 31: 12–22
- Parry S & Strauss JF (1998) Premature Rupture of the Fetal Membranes. *New England Journal of Medicine* 338: 663–670
- Pasquier J-C & Doret M (2008) Les membranes fœtales : développement embryologique, structure et physiopathologie de la rupture prématurée avant terme. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 37: 579–588
- Pearce C & Martin SR (2016) Trauma and Considerations Unique to Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 43: 791–808
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M & Heveker N (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280: 9895–9903
- Pereira G, Bell ML, Lee HJ, Koutrakis P & Belanger K (2014) Sources of fine particulate matter and risk of preterm birth in Connecticut, 2000–2006: a longitudinal study. *Environ Health Perspect* 122: 1117–1122
- Pergialiotis V, Prodromidou A, Pappa E, Vlachos GD, Perrea DN & Papantoniou N (2016) An evaluation of calprotectin as serum marker of preeclampsia: a systematic review of observational studies. *Inflamm Res* 65: 95–102
- Petersen LK, Helmig R, Oxlund H, Vogel I & Uldbjerg N (1994) Relaxin (hRLX-2)-induced weakening of human fetal membranes in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 57: 123–128
- Phillips RJ, Fortier MA & López Bernal A (2014) Prostaglandin pathway gene expression in human placenta, amnion and choriondecidua is differentially affected by preterm and term labour and by uterine inflammation. *BMC Pregnancy Childbirth* 14: 241

- Pisetsky DS (2014) The Translocation of Nuclear Molecules During Inflammation and Cell Death. *Antioxid Redox Signal* 20: 1117–1125
- Platt MJ (2014) Outcomes in preterm infants. *Public Health* 128: 399–403
- Plazyo O, Romero R, Unkel R, Balancio A, Mial TN, Xu Y, Dong Z, Hassan SS & Gomez-Lopez N (2016) HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biology of Reproduction* 95: 130–130
- Poirier J, Poirier I, Baudet J & Benhaiem Sigaux N (1993) Embryologie humaine Paris: Maloine
- Polettini J, Dutta EH, Behnia F, Saade GR, Torloni MR & Menon R (2015) Aging of intrauterine tissues in spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes: A systematic review of the literature. *Placenta* 36: 969–973
- Polettini J, Richardson LS & Menon R (2018) Oxidative stress induces senescence and sterile inflammation in murine amniotic cavity. *Placenta* 63: 26–31
- Pouwels SD, Zijlstra GJ, van der Toorn M, Hesse L, Gras R, Ten Hacken NHT, Krysko DV, Vandenabeele P, de Vries M, van Oosterhout AJM, *et al* (2016) Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L377-386
- Prat C, Blanchon L, Borel V, Gallot D, Herbet A, Bouvier D, Marceau G & Sapin V (2012) Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes. *Biology of Reproduction* 86: 48
- Preissner KT & Herwald H (2017) Extracellular nucleic acids in immunity and cardiovascular responses: between alert and disease. *Thromb Haemost* 117: 1272–1282
- Pullerits R, Brisslert M, Jonsson I-M & Tarkowski A (2006) Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum* 54: 3898–3907
- Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Huston JM, Miller E, *et al* (2006) Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med* 203: 1637–1642
- Queisser MA, Kouri FM, Königshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O & Preissner KT (2008) Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 337–345
- R M, K M, J B, Mv N, J Z-B, Jg T, P L, J P, Rm S, Rv I, *et al* (2011) Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal* 4: ra75–ra75
- Raba G, Kacerovsky M & Laudański P (2021) Eotaxin-2 as a potential marker of preterm premature rupture of membranes: A prospective, cohort, multicenter study. *Adv Clin Exp Med* 30: 197–202

- Radisky ES & Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 201–212
- Ramya R, Coral K & Bharathidevi SR (2021) RAGE silencing deters CML-AGE induced inflammation and TLR4 expression in endothelial cells. *Exp Eye Res* 206: 108519
- Rani SG, Sepuru KM & Yu C (2014) Interaction of S100A13 with C2 domain of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochim Biophys Acta* 1844: 1718–1728
- Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P & Bianchi ME (2008) A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22: 3716–3727
- Rauci A, Di Maggio S, Scavello F, D'Ambrosio A, Bianchi ME & Capogrossi MC (2019) The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update. *Cell Mol Life Sci* 76: 211–229
- Reti NG, Lappas M, Riley C, Wlodek ME, Permezel M, Walker S & Rice GE (2007) Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196: 484.e1-484.e10
- Reyes L, Wolfe B & Golos T (2017) Hofbauer Cells: Placental Macrophages of Fetal Origin. *Results Probl Cell Differ* 62: 45–60
- Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG, Sturrock A, Huecksteadt T & Hoidal JR (2008) RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294: L1094–L1101
- Reynolds PR, Kasteler SD, Schmitt RE & Hoidal JR (2011) Receptor for Advanced Glycation End-Products Signals through Ras during Tobacco Smoke-Induced Pulmonary Inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45: 411–418
- Richardson LS, Vargas G, Brown T, Ochoa L, Sheller-Miller S, Saade GR, Taylor RN & Menon R (2017) Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. *Am J Pathol* 187: 2821–2830
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VFJ, Marchand-Adam S, Crestani B, *et al* (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 774–783
- Riuzzi F, Sorci G & Donato R (2006) The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation in vivo. *J Biol Chem* 281: 8242–8253

- Riuzzi F, Sorci G & Donato R (2007) RAGE expression in rhabdomyosarcoma cells results in myogenic differentiation and reduced proliferation, migration, invasiveness, and tumor growth. *Am J Pathol* 171: 947–961
- Robinson AB, Johnson KD, Bennion BG & Reynolds PR (2012) RAGE signaling by alveolar macrophages influences tobacco smoke-induced inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 302: L1192–L1199
- Rogers JM (2009) Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol* 28: 152–160
- Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon BH, Edwin S, Mazor M, Maymon E & Berry S (2002) Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 187: 1125–1130
- Romero R, Espinoza J, Hassan S, Gotsch F, Kusanovic JP, Avila C, Erez O, Edwin S & Schmidt AM (2008) Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *Journal of Perinatal Medicine* 36
- Romero R, Miranda J, Chaemsathong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, Ahmed AI, Shaman M, Lannaman K, Yoon BH, *et al* (2015) Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 28: 1394–1409
- Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsathong P, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Yoon BH, Hassan SS, *et al* (2014a) Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology* 72: 458–474
- Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsathong P, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Yoon BH, Hassan SS, *et al* (2014b) Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *Am J Reprod Immunol* 72: 458–474
- Romero R, Munoz H, Gomez R, Parra M, Polanco M, Valverde V, Hasbun J, Garrido J, Ghezzi F, Mazor M, *et al* (1996) Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54: 187–191
- Rong LL, Trojaborg W, Qu W, Kostov K, Yan SD, Gooch C, Szabolcs M, Hays AP & Schmidt AM (2004a) Antagonism of RAGE suppresses peripheral nerve regeneration. *FASEB J* 18: 1812–1817
- Rong LL, Yan S-F, Wendt T, Hans D, Pachydaki S, Bucciarelli LG, Adebayo A, Qu W, Lu Y, Kostov K, *et al* (2004b) RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways. *FASEB J* 18: 1818–1825
- Ronzoni S, Steckle V, D’Souza R, Murphy KE, Lye S & Shynlova O (2019) Cytokine Changes in Maternal Peripheral Blood Correlate With Time-to-Delivery in Pregnancies

Complicated by Premature Prelabor Rupture of the Membranes. *Reprod Sci* 26: 1266–1276

- Rot A & von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22: 891–928
- Ruan BH, Li X, Winkler AR, Cunningham KM, Kuai J, Greco RM, Nocka KH, Fitz LJ, Wright JF, Pittman DD, *et al* (2010) Complement C3a, CpG oligos, and DNA/C3a complex stimulate IFN- α production in a receptor for advanced glycation end product-dependent manner. *J Immunol* 185: 4213–4222
- Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A & Guller S (1998) Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 660–666
- Rzepka R, Dołęgowska B, Sałata D, Rajewska A, Budkowska M, Domański L, Kwiatkowski S, Mikołajek-Bedner W & Torbé A (2015) Soluble receptors for advanced glycation end products and receptor activator of NF- κ B ligand serum levels as markers of premature labor. *BMC Pregnancy and Childbirth* 15: 134
- Sağol S, Sağol O, Ozkal S & Asena U (2002) Role of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* 47: 809–815
- Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IMW, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto K, Kinoshita R, *et al* (2014) DNAX-activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 289: 23389–23402
- Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K & Huh N (2011) TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE* 6: e23132
- Sakatani S, Yamada K, Homma C, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H & Hirase H (2009) Deletion of RAGE Causes Hyperactivity and Increased Sensitivity to Auditory Stimuli in Mice. *PLoS One* 4
- Sanborn BM (2000) Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J Soc Gynecol Investig* 7: 4–11
- Sanders NT, Dutson DJ, Durrant JW, Lewis JB, Wilcox SH, Winden DR, Arroyo JA, Bikman BT & Reynolds PR (2017) Cigarette smoke extract (CSE) induces RAGE-mediated inflammation in the Ca9-22 gingival carcinoma epithelial cell line. *Archives of Oral Biology* 80: 95–100
- Santillan AAM, Garduño JCB & Ponce MAD de L (2018) Uric Acid in Pregnancy: New Concepts. *Uric Acid in Chronic Kidney Disease* 192: 110–115

- Santos S, Voerman E, Amiano P, Barros H, Beilin LJ, Bergström A, Charles M-A, Chatzi L, Chevrier C, Chrousos GP, *et al* (2019) Impact of maternal body mass index and gestational weight gain on pregnancy complications: an individual participant data meta-analysis of European, North American and Australian cohorts. *BJOG* 126: 984–995
- Sarzynska-Nowacka U, Kosinski P & Wielgos M (2019) Is there a future for cell-free fetal dna tests in screening for preeclampsia? *Ginekol Pol* 90: 55–60
- Sayed Ahmed WA & Hamdy MA (2018) Optimal management of umbilical cord prolapse. *Int J Womens Health* 10: 459–465
- Scaffidi P, Misteli T & Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191–195
- Schaefer L (2014) Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem* 289: 35237–35245
- Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser H-J, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, *et al* (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 115: 2223–2233
- Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M & Stern D (1996) RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45 Suppl 3: S77-80
- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W & Claus M (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267: 14987–14997
- Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R & Stern D (1993) Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 91: 2155–2168
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF & Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498: 99–111
- Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Fischer RL & Khoo CS (1993) Low zinc intake during pregnancy: its association with preterm and very preterm delivery. *Am J Epidemiol* 137: 1115–1124
- Selejan S-R, Linz D, Tatu A-M, Hohl M, Speer T, Ewen S, Mahfoud F, Kindermann I, Zamyatkin O, Kazakov A, *et al* (2018) Sympathoadrenergic suppression improves heart function by upregulating the ratio of sRAGE/RAGE in hypertension with metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 122: 34–46

- Seliger G, Bergner M, Haase R, Stepan H, Schleußner E, Zöllkau J, Seeger S, Kraus FB, Hiller GGR, Wienke A, *et al* (2021) Daily monitoring of vaginal interleukin 6 as a predictor of intraamniotic inflammation after preterm premature rupture of membranes - a new method of sampling studied in a prospective multicenter trial. *J Perinat Med*
- Seo K, McGregor JA & French JI (1992) Preterm birth is associated with increased risk of maternal and neonatal infection. *Obstet Gynecol* 79: 75–80
- Serratos IN, Castellanos P, Pastor N, Millán-Pacheco C, Rembao D, Pérez-Montfort R, Cabrera N, Reyes-Espinosa F, Díaz-Garrido P, López-Macay A, *et al* (2015) Modeling the interaction between quinolinate and the receptor for advanced glycation end products (RAGE): relevance for early neuropathological processes. *PLoS ONE* 10: e0120221
- Shea AK & Steiner M (2008) Cigarette smoking during pregnancy. *Nicotine Tob Res* 10: 267–278
- Sheller-Miller S, Trivedi J, Yellon SM & Menon R (2019) Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy. *Sci Rep* 9: 608
- Shen TT, DeFranco EA, Stamilio DM, Chang JJ & Muglia LJ (2008) A population-based study of race-specific risk for preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 199: 373.e1–7
- Shen Y, Guo D, Weng L, Wang S, Ma Z, Yang Y, Wang P, Wang J & Cai Z (2017) Tumor-derived exosomes educate dendritic cells to promote tumor metastasis via HSP72/HSP105-TLR2/TLR4 pathway. *Oncoimmunology* 6
- Shirasuna K, Seno K, Ohtsu A, Shiratsuki S, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Nagayama S, Iwata H & Kuwayama T (2016) AGEs and HMGB1 Increase Inflammatory Cytokine Production from Human Placental Cells, Resulting in an Enhancement of Monocyte Migration. *Am J Reprod Immunol* 75: 557–568
- Shobokshi A & Shaarawy M (2002) Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynaecol Obstet* 79: 209–215
- Silverman null & Wojtowycz null (1998) Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns* 5: 181
- Singh R, Barden A, Mori T & Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129–146
- Sisay M, Edessa D, Ali T, Mekuria AN & Gebrie A (2020) The relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 15: e0240382
- Somens N, Brum PO, de Miranda Ramos V, Gasparotto J, Zanotto-Filho A, Rostirolla DC, da Silva Morrone M, Moreira JCF & Pens Gelain D (2017) Extracellular HSP70 Activates

- ERK1/2, NF- κ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 42: 2507–2522
- Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, Bistoni F, Donato R & Romani L (2011) The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog* 7: e1001315
- Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Tubaro C, Bianchi R, Giambanco I & Donato R (2013a) S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem* 4: 1–12
- Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I & Donato R (2013b) RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833: 101–109
- Sorkun HC, Bir F, Akbulut M, Divrikli U, Erken G, Demirhan H, Duzcan E, Elci L, Celik I & Yozgatli U (2007) The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. *Toxicology* 238: 15–22
- Springael J-Y, Urizar E & Parmentier M (2005) Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 611–623
- Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H & Freeze HH (2002) N-Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem* 80: 998–1008
- Srikrishna G, Nayak J, Weigle B, Temme A, Foell D, Hazelwood L, Olsson A, Volkmann N, Hanein D & Freeze HH (2010) Carboxylated N-glycans on RAGE promote S100A12 binding and signaling. *J Cell Biochem* 110: 645–659
- Standring S ed. (2016) *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice* Forty-first edition. New York: Elsevier Limited
- Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC & Weinberg RA (2003) Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 33: 492–496
- Stirling KM, Hussain N, Sanders MM & Campbell W (2016) Association between maternal genital mycoplasma colonization and histologic chorioamnionitis in preterm births. *J Neonatal Perinatal Med* 9: 201–209
- Su Y-N, Zhao D-Y, Li Y-H, Yu T-Q, Sun H, Wu X-Y, Zhou X-Q & Li J (2020) Human amniotic membrane allograft, a novel treatment for chronic diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Int Wound J*
- Szukiewicz D, Alkhalayla H, Pyzlak M, Watroba M, Szewczyk G & Wejman J (2016) Human beta-defensin 1, 2 and 3 production by amniotic epithelial cells with respect to human papillomavirus (HPV) infection, HPV oncogenic potential and the mode of delivery. *Microb Pathog* 97: 154–165

- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, *et al* (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405: 354–360
- Tang D, Kang R, Cheh C-W, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, Benschop R, Sparvero LJ, Amoscato AA, Tracey KJ, *et al* (2010a) HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 29: 5299–5310
- Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C-W, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, *et al* (2010b) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* 190: 881–892
- Tang D, Loze MT, Zeh HJ & Kang R (2010c) The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment. *Autophagy* 6: 1181–1183
- Teissier T & Boulanger É (2019) The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology*
- Teler J, Tarnowski M, Safranow K, Maciejewska A, Sawczuk M, Dziedziejko V, Sluczanowska-Glabowska S & Pawlik A (2017) CCL2, CCL5, IL4 and IL15 Gene Polymorphisms in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Horm Metab Res* 49: 10–15
- Tesarova P, Zima T, Kubena AA & Kalousova M (2017) Polymorphisms of the receptor for advanced glycation end products and glyoxalase I and long-term outcome in patients with breast cancer. *Tumor Biology* 39: 101042831770290
- Tessier FJ & Niquet C (2007) [The metabolic, nutritional and toxicological consequences of ingested dietary Maillard reaction products: a literature review]. *J Soc Biol* 201: 199–207
- Thelen M (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2: 129–134
- Thorpe SR & Baynes JW (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids* 25: 275–281
- Thurik FF, Lamain-de Ruitter M, Javadi A, Kwee A, Woortmeijer H, Page-Christiaens GCML, Franx A, van der Schoot CE & Koster MPH (2016) Absolute first trimester cell-free DNA levels and their associations with adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn* 36: 1104–1111
- Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, *et al* (2007) Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8: 487–496
- Ticha J & Wright C (2016) Rapid detection of toxic compounds in tobacco smoke condensates using high-resolution ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Methods* 8: 6388–6397

- Tjugum J & Norström A (1985) The influence of prostaglandin E2 and oxytocin on the incorporation of [3H]proline and [3H]glucosamine in the human amnion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 19: 137–143
- Torchin H & Ancel P-Y (2016) [Epidemiology and risk factors of preterm birth]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 45: 1213–1230
- Tran TT, Groben P & Pisetsky DS (2008) The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers* 13: 184–200
- Trautman MS, Dudley DJ, Edwin SS, Collmer D & Mitchell MD (1992) Amnion cell biosynthesis of interleukin-8: regulation by inflammatory cytokines. *J Cell Physiol* 153: 38–43
- Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N & Okada Y (2000) Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* 95: 851–855
- Ulug U, Goldman S, Ben-Shlomo I & Shalev E (2001) Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin. *Mol Hum Reprod* 7: 1187–1193
- Usta IM, Mercer BM & Sibai BM (1999) Current obstetrical practice and umbilical cord prolapse. *Am J Perinatol* 16: 479–484
- Vacca P, Montaldo E, Vitale C, Croxatto D, Moretta L & Mingari MC (2015) MSC and innate immune cell interactions: A lesson from human decidua. *Immunology letters* 168: 170–174
- Vadillo Ortega F, Arechevaleta F & Beltrán Montoya J (1998) [Apoptosis and extracellular matrix degradation in chorio-amnion during labor and premature membrane rupture]. *Ginecol Obstet Mex* 66: 202–207
- Vadillo Ortega F, Pfeffer Burak F, Bermejo Martínez ML, Hernández Miranda MA, Beltrán Montoya J, Tejero Barrera E & Casanueva y López E (1995) [Dietetic factors and premature rupture of fetal membranes. Effect of vitamin C on collagen degradation in the chorioamnion]. *Ginecol Obstet Mex* 63: 158–162
- Van Damme J, Decock B, Conings R, Lenaerts JP, Opdenakker G & Billiau A (1989) The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur J Immunol* 19: 1189–1194
- Vannuccini S, Bocchi C, Severi FM, Challis JR & Petraglia F (2016) Endocrinology of human parturition. *Annales d'Endocrinologie* 77: 105–113
- Vargas-Reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG & Allaker RP (2012) Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 40: 135–139
- Vénéreau E, Ceriotti C & Bianchi ME (2015) DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 6: 422

- Verbruggen SW, Oyen ML, Phillips ATM & Nowlan NC (2017) Function and failure of the fetal membrane: Modelling the mechanics of the chorion and amnion. *PLoS ONE* 12: e0171588
- Vigeh M, Yokoyama K, Shinohara A, Afshinrokh M & Yunesian M (2010) Early pregnancy blood lead levels and the risk of premature rupture of the membranes. *Reprod Toxicol* 30: 477–480
- Vince GS, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL & Redman CWG (1990) Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *Journal of Immunological Methods* 132: 181–189
- Vinturache AE, Gyamfi-Bannerman C, Hwang J, Mysorekar IU, Jacobsson B, & Preterm Birth International Collaborative (PREBIC) (2016) Maternal microbiome - A pathway to preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 21: 94–99
- Vlassara H, Brownlee M & Cerami A (1985) High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5588–5592
- Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT & Cerami A (1995) Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1: 634–646
- van Waateringe RP, Mook-Kanamori MJ, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Lutgers HL, Suhre K, El-Din Selim MM, Mook-Kanamori DO, *et al* (2017) The association between various smoking behaviors, cotinine biomarkers and skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation. *PLoS One* 12
- Wakabayashi A, Sawada K, Nakayama M, Toda A, Kimoto A, Mabuchi S, Kinose Y, Nakamura K, Takahashi K, Kurachi H, *et al* (2013) Targeting interleukin-6 receptor inhibits preterm delivery induced by inflammation. *Mol Hum Reprod* 19: 718–726
- Wallace ME, Grantz KL, Liu D, Zhu Y, Kim SS & Mendola P (2016) Exposure to Ambient Air Pollution and Premature Rupture of Membranes. *Am J Epidemiol* 183: 1114–1121
- Wang G, Liu L, Zhang Y, Han D, Liu J, Xu J, Xie X, Wu Y, Zhang D, Ke R, *et al* (2014) Activation of PPAR γ attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibition of HMGB1-RAGE levels. *Eur J Pharmacol* 726: 27–32
- Wang H, Ogawa M, Wood JR, Bartolomei MS, Sammel MD, Kusanovic JP, Walsh SW, Romero R & Strauss JF (2008) Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet* 17: 1087–1096
- Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Ferrand PE, Kuivaniemi H, Tromp G, Halder I, Shriver MD, Romero R, *et al* (2004) Functionally significant SNP MMP8 promoter

- haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Hum Mol Genet* 13: 2659–2669
- Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Kuivaniemi H, Tromp G, Argyropoulos G, Halder I, Shriver MD, Romero R, *et al* (2006) 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* 103: 13463–13467
- Wang J, Li R, Peng Z, Hu B, Rao X & Li J (2020) HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- κ B signaling pathways. *Int J Mol Med* 45: 61–80
- Wang L, Wu J, Guo X, Huang X & Huang Q (2017) RAGE Plays a Role in LPS-Induced NF- κ B Activation and Endothelial Hyperpermeability. *Sensors (Basel)* 17
- Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA & Ross MG (2001) 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* 185: 1226–1231
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM & Wautier JL (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E685-694
- Wei W, Lampe L, Park S, Vangara BS, Waldo GS, Cabantous S, Subaran SS, Yang D, Lakatta EG & Lin L (2012) Disulfide Bonds within the C2 Domain of RAGE Play Key Roles in Its Dimerization and Biogenesis. *PLOS ONE* 7: e50736
- Weiss G (2000) Endocrinology of Parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4421–4425
- Weiyuan Z & Li W (1998) 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* 26: 491–494
- Wender-Ozegowska E, Michalowska-Wender G, Zawiejska A, Pietryga M, Brazert J & Wender M (2008) Concentration of chemokines in peripheral blood in first trimester of diabetic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87: 14–19
- Wilson MJ, Lindquist JA & Trowsdale J (2000) DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3zeta family. *Immunol Res* 22: 21–42
- Witt SH, Frank J, Gilles M, Lang M, Treutlein J, Streit F, Wolf IAC, Peus V, Scharnholtz B, Send TS, *et al* (2018) Impact on birth weight of maternal smoking throughout pregnancy mediated by DNA methylation. *BMC Genomics* 19
- Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, Beisswenger C & Bals R (2017) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary structure and regulates the response to cigarette smoke. *PLOS ONE* 12: e0180092

- Wrześniak M, Kepinska M, Królik M & Milnerowicz H (2016) The Influence of Tobacco Smoke on Protein and Metal Levels in the Serum of Women during Pregnancy. *PLOS ONE* 11: e0161342
- Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V & Aguilar-Hernández MM (2013) Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling* 25: 2185–2197
- Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS & Shekhtman A (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 283: 27255–27269
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F & Esmon CT (2009) Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15: 1318–1321
- Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R & Shekhtman A (2011) Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* 19: 722–732
- Xue J, Ray R, Singer D, Böhme D, Burz DS, Rai V, Hoffmann R & Shekhtman A (2014) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry* 53: 3327–3335
- Yamamoto K-I, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M & Huh N-H (2013) DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep* 29: 1073–1079
- Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, *et al* (2011) Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol* 186: 3248–3257
- Yan H, Zhu L, Zhang Z, Li H, Li P, Wang Y & Leng M (2018) HMGB1-RAGE signaling pathway in pPROM. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 57: 211–216
- Yan J & Jiang L (2015) Expression of advanced glycation end products in placenta and concentration in maternal and umbilical serum in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 41: 843–849
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D & Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269: 9889–9897
- Yatime L & Andersen GR (2013) Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *The FEBS Journal* 280: 6556–6568

- Yu H, Shen Y, Ge Q, He Y, Qiao D, Ren M & Zhang J (2013) Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia. *Int J Mol Sci* 14: 7571–7582
- Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Lopez-Vancell R & Vadillo-Ortega F (2004) Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or chorion with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* 71: 1296–1302
- 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 (2007) 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* 5: 46
- Zare-Bidaki M, Sadrinia S, Erfani S, Afkar E & Ghanbarzade N (2017) Antimicrobial Properties of Amniotic and Chorionic Membranes: A Comparative Study of Two Human Fetal Sacs. *J Reprod Infertil* 18: 218–224
- Zeng-Brouwers J, Beckmann J, Nastase M-V, Iozzo RV & Schaefer L (2014) De novo expression of circulating biglycan evokes an innate inflammatory tissue response via MyD88/TRIF pathways. *Matrix Biol* 35: 132–142
- Zhang J, Chen Z, Smith GN & Croy BA (2011) Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol* 8: 1–11
- Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A & Postina R (2008) Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 283: 35507–35516
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K & Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464: 104–107
- Zhang Q, Shimoya K, Moriyama A, Yamanaka K, Nakajima A, Nobunaga T, Koyama M, Azuma C & Murata Y (2001) Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Mol Hum Reprod* 7: 573–579
- Zhang W, Wang L, Zhao Y & Kang J (2000) Changes in cytokine (IL-8, IL-6 and TNF-alpha) levels in the amniotic fluid and maternal serum in patients with premature rupture of the membranes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 63: 311–315
- Zhang Y, Zheng W, Shen K & Shen W (2018) Δ9-tetrahydrocannabinol inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting matrix metalloproteinase-9 in endometrial cancer. *Oncol Lett* 15: 8527–8535
- Zhao X, Pan S & Liu C (2015) [Effect of S100 calcium binding protein A12 on the pathogenesis of preeclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 50: 183–187

- Zhao Y, Koga K, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Inoue S, *et al* (2013) Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines and matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) from human decidual cells, and the production was reduced by progesterone. *Am J Reprod Immunol* 69: 454–462
- Zhou Z, Immel D, Xi C-X, Bierhaus A, Feng X, Mei L, Nawroth P, Stern DM & Xiong W-C (2006) Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med* 203: 1067–1080
- Zieman S & Kass D (2004) Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail* 10: 144–149; quiz 150–151
- van Zoelen MAD, Schmidt A, Florquin S, Meijers JC, de Beer R, de Vos AF, Nawroth PP, Bierhaus A & van der Poll T (2009) Receptor for Advanced Glycation End Products Facilitates Host Defense during *Escherichia coli* –Induced Abdominal Sepsis in Mice. *J INFECT DIS* 200: 765–773

RÉSUMÉ

La rupture prématurée des membranes fœtales (RPM) représente une complication obstétricale responsable d'un tiers des naissances prématurées. Cette pathologie semble de plus en plus découler de l'emballement précoce d'un processus impliqué dans la rupture physiologique à terme, l'inflammation stérile. Ce phénomène est basé sur la reconnaissance de molécules spécifiques, les alarmines (ou DAMPs), par une famille de récepteurs dénommés PRR pour « Pattern Recognition Receptors ». Cette interaction conduit à une réponse inflammatoire stérile participant à la fragilisation physiopathologique des MF. Cependant, il n'a toujours pas été décrit comment fonctionne exactement cette activation de l'inflammation au sein des MF, quel(s) PRR(s) est(sont) à l'origine de la transduction de ce signal, à moduler de façon à ce que la rupture physiologique n'ait pas lieu avant 37 semaines. Au cours de ma thèse, nous nous sommes focalisés sur un récepteur de la famille des PRR : RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts ; récepteur aux produits avancés de glycation).

Après avoir étudié l'ontogénèse de l'axe RAGE au sein des MF, notre premier objectif a été d'étudier l'activation de RAGE dans un contexte physiologique en exposant des explants d'amnios et de chorion à deux alarmines phares : HMGB1 et les AGEs. Nous avons alors mis en évidence un profil d'expression différentiel des acteurs de l'axe RAGE au sein des différentes zones des MF, notamment une surexpression de RAGE au sein de la zone de rupture. Par ailleurs, ce travail a révélé une réponse pro-inflammatoire en réponse à HMGB1 ou aux AGEs, au sein des deux feuillets des MF, qui est dépendante de RAGE. Par ailleurs, cette thèse s'est intéressée à l'activation de RAGE dans un contexte plus pathologique : le tabagisme maternel, facteur de risque très connu de la RPM. Nous avons pu démontrer *in vitro* l'implication de RAGE dans la réponse pro-inflammatoire induite par un condensé de fumée de cigarette au sein des cellules épithéliales de l'amnios.

Globalement, l'ensemble de ce travail soutient fortement le rôle de RAGE dans la fragilisation physiopathologique des MF. Ces données pourront potentiellement aider au développement futur de nouveaux outils de diagnostic et de thérapeutique pour lutter contre la RPM.

THESIS ABSTRACT

Preterm premature rupture of membranes is a pregnancy complication responsible for 30% of all preterm births. This pathology seems more and more to be the consequence of an early process runaway activation usually implicated in the physiologic rupture at term called sterile inflammation. This phenomenon is dependent on some specific molecules called "alarmins" or "Damage-Associated Molecular Patterns" (DAMPs) recognized by Pattern Recognition Receptors (PRRs) leading to a microbial-free inflammatory response. However, it remains unclear how exactly this activation works, and which receptor translates this sterile inflammatory signaling in fetal membranes (FM) to manage a successful physiological rupture not before 37 weeks. In this context, we focused our work on one actor of the sterile inflammation (member of PRR family), the Receptor for Advanced End-Glycation products (RAGE).

Following the realization of the RAGE axis members' ontogenesis into FM, our first objective was to evaluate the implication of RAGE axis in the arising of fetal membranes inflammation in a physiological context. Here, we revealed differential expression profile of RAGE axis actors in the different zones of the FM, especially an overexpression of RAGE inside the rupture zone. This work demonstrated also that alarmins HMGB1 and AGEs led to an inflammatory response in FM involving RAGE pathway. Then, we focused on the RAGE activation in a pathological context: the maternal tobacco smoking, a well-described risk factor of the pPROM. Our results have demonstrated the RAGE implications in the pro-inflammatory response in amniotic epithelial cells exposed to a Cigarette Smoke Condensate.

All this work strongly supports the role of RAGE in FM physiopathological weakening. These data could help to the future development of new strategies of diagnosis and therapeutics to fight against pPROM.