

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
FACULTES DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Pharmacologie – Toxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

Maeva WENDREMAIRE

le 7 Mai 2012 à 14h

**Obésité et grossesse : étude de l'influence d'un marqueur de
l'obésité sur les mécanismes cellulaires et tissulaires de
l'accouchement dans un modèle d'explants myométriaux humains.**

Directeur de thèse : Pr Marc BARDOU

Co-encadrant de thèse : Dr Françoise GOIRAND

Jury :

Pr Paul SAGOT

Dr Michelle BREUILLER-FOUCHE

Pr Philippe DERUELLE

Pr Marc BARDOU

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

A Monsieur le Professeur Marc BARDOU, directeur de thèse

Je te remercie de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir initiée à la recherche. J'ai beaucoup appris au cours de la réalisation de ce travail. Tu m'as permis d'acquérir une rigueur et une démarche scientifiques et m'as donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès, en France comme à l'étranger. J'espère, à l'avenir, faire bon usage de ce que j'ai pu apprendre à tes côtés.

A Monsieur le Professeur Paul SAGOT, juge et président de jury

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Votre collaboration a été indispensable dans la réalisation de ce travail. Je vous prie de bien vouloir remercier, en mon nom, tout le personnel des services de la maternité du CHU de Dijon ayant contribué au recueil des prélèvements biologiques. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Michelle BREUILLER-FOUCHE, juge et rapporteur

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'y apporter tes connaissances scientifiques dans le domaine de la périnatalité. Membre du comité de suivi de thèse, tu as pu suivre l'évolution de ce travail année après année et j'espère qu'il est à la hauteur de tes attentes. Je te remercie également pour ton soutien lors du congrès du SGI à Orlando. Sois assurée de ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur Philippe DERUELLE, juge et rapporteur

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'y apporter votre expertise clinique. Je suis très honorée que vous ayez accepté de consacrer du temps à la lecture de ce manuscrit. J'espère que ce travail débouchera sur une collaboration dans de nombreuses études.

A Madame le Docteur Françoise GOIRAND, co-encadrant de thèse

Je te remercie pour ton accueil chaleureux au laboratoire, pour ton aide lors des manipulations ainsi que pour ta disponibilité et ton soutien lors de la rédaction et la correction du manuscrit.

A Madame le Professeur Monique DUMAS

Je vous remercie pour votre accueil au sein de votre laboratoire et votre soutien dans la réalisation de mes projets professionnels. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Frédéric LIRUSSI

Je te remercie pour m'avoir épaulée lors de mes débuts dans la recherche à mon arrivée au laboratoire ainsi que pour tes nombreux conseils et connaissances, tant dans le domaine de la recherche qu'en Pharmacologie – Toxicologie. Je te suis très reconnaissante pour la confiance que tu m'as accordée pour la dispensation des cours, l'encadrement des travaux pratiques de toxicologie et des travaux dirigés.

Je remercie les membres du laboratoire ainsi que toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail pour leur aide, leurs conseils et leurs connaissances, notamment Marina dont l'amitié a été d'un grand soutien.

Résumé

L'obésité maternelle, dont la prévalence ne cesse d'augmenter, est associée à de nombreux troubles de l'accouchement, tels que des dépassements de terme à l'origine d'une augmentation du taux de césariennes. Ces troubles pourraient, en partie, s'expliquer par une concentration plasmatique de leptine plus élevée chez les femmes enceintes obèses ainsi que par les effets inhibiteurs, démontrés *in vitro*, de cette adipokine sur la contractilité myométriale. Au moment de l'accouchement, la transition phénotypique du myomètre d'un état de quiescence utérine à un état contractile est une étape clé indispensable à la mise en route du travail. Elle est associée à une activation de l'apoptose des cellules myométriales ainsi qu'à un remodelage de la matrice extracellulaire utérine. Le but de notre travail était d'étudier la capacité de la leptine à moduler l'apoptose et le remodelage myométriaux induits par le lipopolysaccharide (LPS).

Les échantillons de myomètre ont été prélevés lors de césariennes réalisées avant la mise en route du travail, à la maternité du CHU de Dijon. Les effets de la leptine ont été évalués après incubation des explants myométriaux pendant 48 heures avec du LPS (10 µg/ml) avec ou sans leptine (de 10^{-10} à 10^{-8} M).

Nos résultats ont démontré la capacité de la leptine à inhiber, de façon concentration-dépendante, l'apoptose induite par le LPS en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques (caspase-3 clivée, BAX) et en augmentant celle du médiateur anti-apoptotique BCL2. Cet effet anti-apoptotique de la leptine dans le myomètre gestant était associé à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2. De plus, nos résultats ont montré que la leptine était également capable de s'opposer, de façon concentration-dépendante, à la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire myométriale induite par le LPS. Cet effet était associé à l'inhibition de l'activation et de la surexpression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 induites par le LPS.

Ce travail a permis d'approfondir les connaissances sur le rôle de la leptine dans la régulation de l'activité du myomètre. Nos résultats suggèrent que les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses résulteraient de l'inhibition de l'apoptose et du remodelage myométriaux par la leptine, en plus de l'inhibition de la contractilité utérine déjà décrite.

Mots clés: myomètre, leptine, grossesse, apoptose, remodelage de la matrice extracellulaire

Abstract

Maternal obesity is associated with a wide spectrum of delivery disorders, such as delayed or post-term delivery, that might be explained partly by the increase in plasma leptin levels in obese women, as leptin inhibits *in vitro* myometrial contractility. Delivery involves uterine apoptosis and remodelling of the extracellular matrix, *via* the activation of matrix metalloproteinases (MMP). This study was aimed to assess the role of leptin on human myometrium, by studying the interaction of leptin with lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis and degradation of myometrial collagen.

Myometrial biopsies were obtained from women undergoing caesarean delivery before labour onset. The effects of leptin on myometrial apoptosis and remodelling were assessed by incubating the strips for 48h with LPS (10 µg/ml) alone or with leptin (from 10^{-10} to 10^{-8} M).

Leptin prevented LPS-induced apoptosis, in a concentration-dependent manner, by down-regulating cleaved caspase-3, BAX and up-regulating BCL2 expression. This effect was specifically mediated through leptin receptors stimulation followed by ERK1/2 signalling pathway activation. Leptin prevented, in a concentration-dependent manner, an LPS-induced decrease in myometrial collagen content, and this effect was associated with a decrease in MMP2 and MMP9 activity and overexpression. These effects of leptin were abolished by pre-treatment with a selective leptin receptor antagonist.

These results suggest new potential pathways involved in delivery disorders of obese women and propose a role for leptin-induced inhibition of myometrial apoptosis and extracellular matrix remodelling in the development of such disorders.

Keywords: human myometrium, leptin, pregnancy, apoptosis, extracellular matrix remodelling

Table des matières

Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
Abréviations	11
 INTRODUCTION.....	 13
I. L'obésité	14
1. Définition	14
2. Epidémiologie de l'obésité.....	16
2.1. Prévalence de l'obésité.....	16
2.2. Déterminants génétiques et facteurs environnementaux de l'obésité	17
2.3. Autres facteurs de risque	18
2.3.1. Sexe	18
2.3.2. Age	19
2.3.3. Origine ethnique	19
2.3.4. Niveau socio-économique	19
3. Conséquences physiopathologiques de l'obésité	20
3.1. Expansion du tissu adipeux	20
3.2. Rôle endocrine du tissu adipeux	22
3.3. Sécrétion d'adipokines	23
3.3.1. La leptine.....	23
3.3.2. Les facteurs de l'inflammation.....	23
3.3.3. Les acides gras et les protéines du métabolisme lipidique.....	25
3.3.4. Les facteurs vasculaires.....	25
4. Conséquences de l'obésité chez la femme enceinte et le fœtus	26
4.1. Chez la femme enceinte	26
4.1.1. Troubles de la fécondité	26
4.1.2. Troubles de la grossesse	26
4.1.3. Troubles de l'accouchement	27
4.1.3.1. Dépassements de terme	27

4.1.3.2. Accouchement prématuré.....	28
4.2. Chez le fœtus.....	29
4.2.1. Mortalité périnatale	29
4.2.2. Malformations congénitales	29
4.2.3. Macrosomie	29
4.2.4. Exposition prénatale et influence maternelle	30
II. La physiologie du travail	31
1. La sphère utéro-placentaire	31
1.1. L'utérus	31
1.1.1. Anatomie	31
1.1.2. Histologie	31
1.2. Les membranes fœtales	32
2. Le rôle de l'inflammation dans la mise en route du travail.....	34
2.1. Inflammation et mise en route du travail	34
2.2. Cytokines et mise en route prématurée du travail	35
3. Les mécanismes de l'accouchement	36
3.1. Le remodelage des tissus gestationnels.....	36
3.1.1. La rupture des membranes fœtales.....	37
3.1.2. La dilatation du col.....	38
3.1.3. Le remodelage utérin.....	38
3.1.3.1. Le remodelage de la matrice extracellulaire myométriale	38
3.1.3.2. L'apoptose des cellules myométriales	39
3.2. Les contractions utérines.....	40
III. La leptine et ses récepteurs	43
1. La leptine.....	43
1.1. Le gène codant pour la leptine	43
1.2. Structure	43
1.3. Fonctions	44
1.4. Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine	45
2. Les récepteurs à la leptine	46
2.1. Le gène codant pour les récepteurs	46
2.2. Structure des récepteurs	46

2.2.1. L'isoforme longue OB-RL	47
2.2.2. Les isoformes courtes OB-RS	47
2.2.3. L'isoforme soluble	47
2.3. Distribution tissulaire des récepteurs	48
2.4. Voies de signalisation intracellulaires couplées aux récepteurs à la leptine	49
2.4.1. Dimérisation du récepteur	49
2.4.2. Internalisation du récepteur	49
2.4.3. Les voies de signalisation.....	49
2.4.3.1. La voie JAK/STAT	49
2.4.3.2. La voie des MAPK.....	51
2.4.3.3. La voie IRS/PI3K.....	52
2.4.3.4. Autre voie de signalisation activée par la leptine.....	54
2.5. Régulation des voies de signalisation	54
2.5.1. Suppressor of Cytokine Signalling-3	54
2.5.2. Protein Tyrosine Phosphatase 1B.....	55
3. Effets de la leptine sur les mécanismes impliqués dans l'accouchement	55
3.1. Effets de la leptine sur la prolifération et l'apoptose	55
3.2. Effets de la leptine sur le remodelage de la matrice extracellulaire.....	56
3.3. Effets de la leptine sur la contractilité musculaire	56
4. Leptine et obésité	57
4.1. Mise en évidence expérimentale du rôle de la leptine dans l'obésité	57
4.2. Déficit en leptine ou en ses récepteurs chez l'homme	58
4.3. Surexpression de leptine et résistance à la leptine	59
4.3.1. Surexpression de leptine	59
4.3.2. Résistance à la leptine	59
4.3.2.1. Diminution du passage de la leptine à travers la BHE.....	60
4.3.2.2. « Down-regulation » de l'expression des récepteurs hypothalamiques	61
4.3.2.3. Défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques.....	61
5. Leptine et grossesse.....	62
5.1. La leptine et ses récepteurs au cours de la grossesse	62
5.1.1. La leptine maternelle.....	62
5.1.2. La leptine placentaire	63
5.1.3. La leptine fœtale.....	64
5.1.4. L'expression des récepteurs à la leptine pendant la grossesse	65

5.2. Les rôles de la leptine pendant la grossesse	66
5.2.1. Le rôle de la leptine au niveau placentaire	66
5.2.2. Le rôle de la leptine chez la mère	67
5.2.3. Le rôle de la leptine chez le fœtus	67
5.3. Pathologies de la grossesse et leptine	68
5.3.1. La grossesse molaire	68
5.3.2. La pré-éclampsie	68
5.3.3. Le diabète	69
OBJECTIFS.....	70
MATERIELS ET METHODES	72
I. Recueil des prélèvements	73
II. Protocole de stimulation des explants de myomètre	73
1. Protocole n°1 : étude des voies de signalisation activées par la leptine.....	73
2. Protocole n°2 : étude des effets de la leptine sur l'apoptose et le remodelage induits par le LPS dans le myomètre gestant	74
3. Protocole n°3 : étude de l'implication des MMP dans le remodelage utérin induit par le LPS	74
4. Protocole n°4 : étude de l'implication de la voie ERK1/2 dans les effets de la leptine sur l'apoptose myométriale	75
III. Techniques histologiques	76
1. Marquage au DAPI	76
2. Coloration au rouge sirius	76
3. Immunohistochimie.....	77
IV. Techniques de biologie moléculaire	78
1. Extraction des ARN totaux	78
2. Rétro-transcription en ADNc et PCR.....	78

V. Techniques biochimiques.....	80
1. Extraction et dosage protéiques	80
2. Analyse de l'expression protéique par Western Blotting.....	80
3. Analyse de l'activité des métalloprotéinases par zymographie	81
VI. Analyse statistique	82
VII. Drogues utilisées	82
RESULTATS	83
I. Article 1: « Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an <i>in vitro</i> human model of chorioamnionitis. »	84
1. Introduction	84
2. Conclusion et discussion	86
II. Article 2: « Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an <i>in vitro</i> model of myometrial inflammation. »	89
1. Introduction	89
2. Conclusion et discussion	91
CONCLUSIONS	94
PERSPECTIVES	97
BIBLIOGRAPHIE	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des adultes en fonction de l'IMC selon l'OMS.....	14
Tableau 2 : Recommandations de l'Institut de Médecine sur la prise de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC.....	15
Tableau 3 : Amorces et conditions de PCR pour chaque séquence amplifiée	79
Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps et dilutions utilisés pour les expériences de Western Blotting.....	81

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la prévalence de l'obésité chez les adultes de plus de 18 ans en France depuis 1980.	17
Figure 2 : Mécanismes physiopathologiques de l'obésité à l'origine des principales complications métaboliques et cardiovasculaires	21
Figure 3 : Adipokines sécrétées par le tissu adipeux.	22
Figure 4 : Organisation de la sphère utéro-placentaire.	33
Figure 5 : Effets de la progestérone au niveau myométrial.	41
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la leptine.	44
Figure 7 : Multiplicité d'actions de la leptine	45
Figure 8 : Les différentes isoformes du récepteur à la leptine chez l'humain.	48
Figure 9 : La voie de signalisation JAK/STAT couplée à OB-RL.	51
Figure 10 : La voie de signalisation MAPK couplée à OB-R.....	52
Figure 11 : La voie de signalisation IRS/PI3K couplée à OB-R.....	54
Figure 12 : Souris obèse (ob/ob) déficiente en leptine à gauche comparée à une souris sauvage.	57
Figure 13 : Réponse clinique après traitement substitutif à base de leptine recombinante.....	58
Figure 14 : Evolution de la leptinémie maternelle au cours de la grossesse.	63
Figure 15 : Objectifs du travail : Etude des effets de la leptine sur les mécanismes impliqués dans l'accouchement.	71
Figure 16 : Schéma récapitulatif des protocoles de stimulation 2, 3 et 4.....	75
Figure 17 : Schéma récapitulatif des conclusions de ce travail.	96

Abréviations

aa = Acide Aminé	IMC = Indice de Masse Corporelle
ADU = Unité Densitométrique Arbitraire	IRS = Insulin Receptor Substrate
AMPK = AMP-Activated Protein Kinase	JAK = Janus Kinases
ApoE = Apolipoprotéine E	JNK = c-Jun N-terminal Kinase
BAX = Bcl-2–Associated X protein	KO = Knock-Out
BCL2 = B-Cell Lymphoma 2	LFD = Low-Fat Diet
BET = Bromure d'éthidium	LPS = Lipopolysaccharide
BHE = Barrière Hémato-Encéphalique	MAPK = Mitogen Activated Protein Kinase
BSA = Albumine Sérique Bovine	MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein-1
CAPs = Contraction-Associated Proteins	MEK = MAPK kinase
CETP = Cholesteryl Ester Transfer Protein	MMP = Métalloprotéinase
COX = Cyclo-Oxygénase	mTOR = Mammalian Target Of Rapamycine
CRP = C-reactive protein	NFκB = Nuclear Factor-kappa B
DAPI = 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	NO = Monoxyde d'azote
DMEM = Dubelcco's Modified Eagle Medium	Ob = Leptine
EMMPRIN = Extracellular Matrix MetalloPRotéinase INducer	OB-R = Récepteur à la leptine
eNOS = NO Synthase endothéliale	OB-RL = Isoforme longue de OB-R
ERK1/2 = Extracellular signal Regulated Kinase	OB-RS = Isoforme courte de OB-R
Grb-2 = Growth factor receptor binding protein	OB-Rsol = Isoforme soluble de OB-R
GSK3 = Glycogène Synthase Kinase	OMS = Organisation Mondiale de la Santé
hCG = Hormone Gonadotrophine Chorionique	PAI-1 = Plasminogen Activator Inhibitor-1
HFD = High-Fat Diet	PBS = Phosphate Buffered Saline
ICAM-1 = InterCellular Adhesion Molecule-1	PBS-T = PBS - 0,1% Tween-20
IL = Interleukine	PCR = Polymerase Chain Reaction
	PDE3B = Phosphodiesterase 3B
	PDK-1 = Phosphoinositide Dependent Kinase 1
	PFA = Paraformaldéhyde

PG = Prostaglandines
 PGF2 α = Prostaglandine F2 α
 PI3K = PhosphoInositide 3-Kinase
 PIP3 = PhosphatidylInositol triphosphate
 PKB = Protéine Kinase B
 PKC = Protéine Kinase C
 PTP1B = Protein Tyrosine Phosphatase 1B
 RT-PCR = Reverse Transcription –
 Polymerase Chain Reaction
 SA = Semaine d'Aménorrhée
 SDS = Sodium Dodécyl Sulfate
 SH2 = Src-like Homology 2
 SHP-2 = SH2 domain-containing protein
 tyrosine phosphatase

SOCS-3 = Suppressor of Cytokine
 Signalling-3
 SOS = Son of Sevenless
 STAT = Signal Transducers and Activators
 of Transcription
 TBST = Tris-Buffered Saline – 0,1%
 Tween-20
 TIMP = Tissue Inhibitor of
 MetalloProteinases
 TNF = Tumor Necrosis Factor
 VEGF = Vascular Endothelial Growth
 Factor
 VLDL = Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION

I. L'obésité

1. Définition

L'obésité correspond à un excès de masse grasse pouvant avoir des conséquences néfastes pour la santé. Officiellement reconnue comme maladie depuis 1985, elle se caractérise par une augmentation de poids et notamment du tissu adipeux résultant d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques [1].

Pour évaluer la masse grasse chez l'adulte, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'utilisation de l'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quetelet, défini par le rapport entre le poids (en kilogrammes) et la taille (en mètre) élevée au carré. Ainsi, le surpoids et l'obésité sont respectivement caractérisés par un IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m² et supérieur ou égal à 30 kg/m² (Tableau 1). De plus, une classification en trois grades selon la sévérité de l'obésité a été définie et reportée dans le Tableau 1 [1]. Récemment, deux grades supplémentaires d'obésité ont été décrits et correspondent à la « super-obésité » ($50 \leq \text{IMC} < 60$ kg/m²) et à la « super-super-obésité » ($\text{IMC} \geq 60$ kg/m²) [2, 3].

Classification	IMC (kg/m ²)
Poids normal	18,5 – 24,9
Surpoids	25 – 29,9
Obésité modérée, grade I	30 – 34,9
Obésité sévère, grade II	35 – 39,9
Obésité morbide, grade III	≥ 40

Tableau 1 : Classification des adultes en fonction de l'IMC selon l'OMS (d'après [1]).

L'interprétation de l'IMC selon la classification de l'OMS n'est applicable qu'aux adultes de 18 à 65 ans et n'est pas valable chez les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes très musclées. Bien que la définition de l'obésité infantile repose également sur l'IMC, cette valeur doit être reportée sur des courbes de percentiles d'évolution de la corpulence. Les seuils de surpoids et d'obésité chez l'enfant sont définis respectivement par les courbes de percentiles rejoignant un IMC égal à 25 kg/m² et à 30 kg/m², à 18 ans [4].

Un autre élément diagnostique de l'obésité est la mesure du tour de taille (ou du rapport taille/hanche) qui évalue l'adiposité abdominale [5]. En effet, la répartition de la masse grasse diffère entre les sujets obèses et conditionne l'apparition des complications associées à l'obésité. Une répartition androïde des graisses est appréciée par un tour de taille supérieur à 88 cm chez la femme (rapport taille/hanche > 0,8) et à 102 cm chez l'homme (rapport taille/hanche > 1), définissant ainsi l'obésité abdominale. Le tissu adipeux de type androïde, plus important chez les hommes, est localisé dans la partie supérieure du corps. Au contraire, une répartition de type gynoïde est principalement retrouvée chez les femmes, chez lesquelles le tissu adipeux prédomine dans la partie inférieure du corps au niveau des cuisses et des fesses [5].

Pendant la grossesse, la prise de poids observée chez la femme est liée à la constitution des réserves maternelles et fœtales ainsi qu'au développement des tissus de la sphère utéro-placentaire. Ces modifications physiologiques inhérentes à la grossesse invalident l'interprétation de l'IMC chez les femmes enceintes. Le statut pondéral des femmes enceintes est donc défini avec les paramètres pré-conceptionnels. En 1990, l'Institut de Médecine (Institute of Medicine) a établi des recommandations concernant la prise de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC pré-conceptionnel (Tableau 2) [6].

IMC pré-conceptionnel (kg/m ²)	Prise de poids recommandée (kg)	
	Grossesse unique	Grossesse multiple
18,5 – 24,9	11,5 - 16	17 - 25
25 – 29,9	7 – 11,5	14 – 23
≥ 30	5 - 9	11 - 19

Tableau 2 : Recommandations de l'Institut de Médecine sur la prise de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC (d'après [6]).

2. Epidémiologie de l'obésité

2.1. Prévalence de l'obésité

L'obésité est un problème majeur de santé publique et touche actuellement 310 millions de personnes dans le monde [7]. Depuis 1997, l'obésité est considérée par l'OMS comme une épidémie mondiale dont la prévalence ne cesse d'augmenter. Depuis ces 20 dernières années, elle touche également les pays en voie de développement tels que la Chine, les pays de l'Asie du Sud-est et du Moyen-Orient, dont le taux d'obésité a triplé [7].

Aux Etats-Unis, l'obésité touche 72 millions d'adultes et correspond à plus de 35% de la population [7, 8]. Cependant, il semblerait que cette prévalence ait atteint un plateau pendant la dernière décennie. Dans une revue de la littérature, Berghöfer *et coll.* [9] rapportent que certains pays d'Europe suivent le pas des Etats-Unis, avec un taux d'obésité supérieur à 25% en Espagne et en Italie en 2000. En effet, les pays méditerranéens et de l'Europe de l'Est ont une prévalence de l'obésité plus élevée par rapport aux pays nordiques et occidentaux. Des études menées ces 30 dernières années montrent que le taux d'obésité entre les pays européens varie entre 4% et 28,3% pour les hommes et entre 6,2% et 36,5% pour les femmes [9].

En France, la prévalence de l'obésité fut d'abord évaluée par l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), dont les deux dernières enquêtes datent de 1980 et 1991, puis à partir de 1997, par les enquêtes Obépi dans le cadre d'une collaboration Inserm-Roche. Ces enquêtes Obépi sont réalisées tous les trois ans chez des adultes de plus de 18 ans, à l'exception des femmes enceintes, issus de la base permanente de TNS-Sofres. Jusqu'au début des années 1990, les adultes français étaient relativement épargnés par l'obésité, avec une prévalence de l'obésité de 6,1% en 1980 et 6,5% en 1991 (Figure 1) [10]. Entre 1997 et 2009, les enquêtes Obépi rapportent une progression régulière de 0,5% par an, avec une prévalence de l'obésité de 14,5% en 2009 contre 8,5 % en 1997 (Figure 1) [11].

Les enquêtes Obépi sont réalisées à partir de larges échantillons et reposent sur des valeurs de poids et de taille rapportées par les individus et non mesurées. Il est donc possible que les résultats de ces enquêtes sous-estiment la prévalence de l'obésité en France [11]. D'après les résultats de l'étude Mona Lisa (MOnitoring NAtional du rISque Artériel), menée de 2005 à 2007 dans le but d'évaluer les principaux facteurs de risque cardiovasculaire, dont l'obésité, la prévalence de l'obésité en France pourrait être sous-estimée d'environ 30% [12].

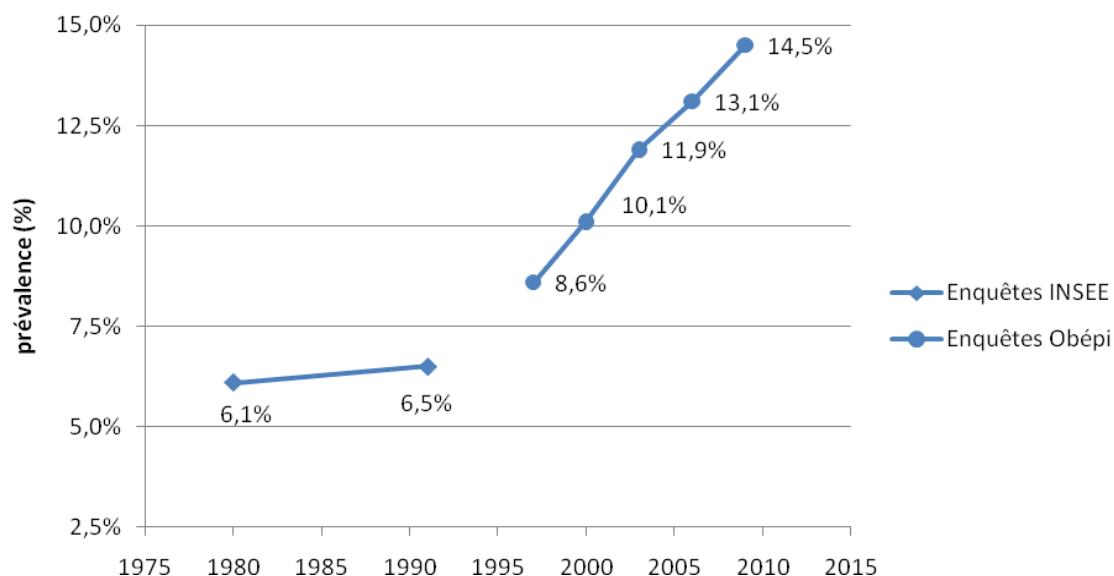


Figure 1 : Evolution de la prévalence de l'obésité chez les adultes de plus de 18 ans en France depuis 1980 (d'après [10, 11]).

Parallèlement à la progression générale de l'obésité, le nombre de femmes enceintes obèses augmente. Aux Etats-Unis, une étude récente révèle qu'en moyenne une femme enceinte sur cinq est obèse [13]. Selon l'Etat et l'ethnie d'origines, l'obésité peut affecter un tiers des femmes enceintes [13]. Au Royaume-Uni, la prévalence de l'obésité chez les femmes enceintes varie selon les études entre 8,1% et 15% [14, 15]. Les données françaises sont semblables à celles du Royaume-Uni et varient entre 7,5% et 12% [16, 17]. D'après les données du réseau périnatal de Bourgogne de 2005 à 2009, environ 10% des femmes qui ont accouché chaque année à la maternité du CHU de Dijon étaient obèses avant de débiter leur grossesse.

2.2. Déterminants génétiques et facteurs environnementaux de l'obésité

Après la découverte du syndrome de Prader-Willi en 1956, l'origine psychologique et psychosomatique de l'obésité a été remise en cause en faveur d'une origine génétique et héréditaire. A la fin des années 1980, des études familiales réalisées chez des jumeaux (mono et/ou dizygotes, élevés ensemble ou séparément) et chez des enfants adoptés ont été entreprises afin d'attester du déterminisme génétique de l'obésité. D'après ces études, 25% à 80% de la variation de poids seraient ainsi déterminés par des facteurs génétiques [18].

Hormis les rares cas d'obésité monogénique causée par une mutation unique, l'obésité résulte de l'expression d'une susceptibilité individuelle définie par l'association de variants génétiques, chez un sujet exposé à un environnement propice à son développement [19]. L'identification des déterminants génétiques de l'obésité repose sur l'étude du génome des personnes atteintes et sur l'analyse de gènes candidats et de leur polymorphisme. Ainsi, un polymorphisme du gène *FTO* (FaT mass and Obesity-associated) est associé à une élévation du poids, de l'IMC et de l'apport énergétique contribuant au développement d'une obésité précoce et grave [19].

La part génétique et héréditaire de l'obésité ayant été très largement démontrée, elle est cependant insuffisante pour expliquer l'explosion de la prévalence de l'obésité observée durant ces 20 à 30 dernières années. Ainsi, la principale cause de cette augmentation doit être recherchée dans les changements environnementaux qui touchent désormais une proportion importante de la population mondiale. Au cours des dernières décennies, l'industrialisation et l'essor des sociétés de consommation ont profondément modifié les modes de vie, augmentant d'une part, la disponibilité et l'abondance de nourriture et d'autre part, la sédentarité des populations. Parmi les facteurs environnementaux, l'augmentation des apports énergétiques et/ou la diminution des dépenses énergétiques participent au développement de l'obésité [18].

La prédisposition à l'obésité est en partie déterminée par des facteurs génétiques mais son expression phénotypique n'est possible que dans un environnement « obésogène » caractérisé par une alimentation déséquilibrée et un manque d'activité physique.

2.3. Autres facteurs de risque

2.3.1. Sexe

En Europe comme aux Etats-Unis, la prévalence de l'obésité est plus élevée chez les femmes que chez les hommes. En France, l'enquête Obépi de 2009 recense 15,1% de femmes obèses contre 13,9% d'hommes obèses et rapporte une augmentation relative de 11% par rapport à 2006, particulièrement importante chez les femmes de 25 à 34 ans (+19,5%) [11]. En 2010, les Etats-Unis comptaient 35,8% de femmes obèses contre 35,5% d'hommes obèses [8]. Cependant, il est difficile de comparer l'IMC selon le sexe étant donné les différences de répartition des graisses et de pourcentage de masse grasse liées au sexe. En effet, le seuil du surpoids de 25 kg/m² est plus facilement atteint chez les hommes en raison d'une plus grande contribution de la masse non grasse au poids.

2.3.2. Age

En France, l'enquête Obépi de 2009 révèle que, quel que soit le sexe, la prévalence de l'obésité augmente avec l'âge, passant de 4,0% chez les 18-25 ans à 19,8% chez les 55-64 ans. Par conséquent, l'IMC moyen augmente avec l'âge passant de 22,3 kg/m² pour les 18-25 ans à 26,5 kg/m² chez les 55-64 ans [11]. Aux Etats-Unis, des résultats similaires ont été démontrés avec une prévalence de l'obésité passant de 31,9% chez les femmes de 20 à 39 ans à 36% chez les femmes de 40 à 59 ans, puis à 42,3% chez les femmes de plus de 60 ans [8].

2.3.3. Origine ethnique

L'influence de l'origine ethnique sur l'obésité a été largement démontrée aux Etats-Unis, où les communautés ethniques sont nettement identifiées. Ainsi, des données récentes montrent que la prévalence de l'obésité est de 32,2% chez les américaines de type caucasien, de 41,4% chez les américaines hispaniques et de 58,5% chez les afro-américaines [8]. Néanmoins, le niveau socio-économique contribue très probablement aux différences observées puisque les afro-américaines et les hispaniques appartiennent aux catégories sociales les plus pauvres.

2.3.4. Niveau socio-économique

En 1989, Sobal et Stunkard [20] ont démontré l'existence d'une relation directe entre l'obésité et le statut socio-économique dans les pays en voie de développement, un statut élevé favorisant la survenue de l'obésité. Cette relation s'inverse dans les pays industrialisés où l'obésité touche préférentiellement les classes les plus pauvres [20]. En France, l'obésité progresse dans toutes les catégories socioprofessionnelles, mais à une vitesse moindre dans les classes les plus aisées. La prévalence de l'obésité est inversement proportionnelle au niveau d'éducation et de revenus du foyer. En effet, elle est trois fois plus importante chez les personnes n'ayant fait aucune étude et vivant avec un faible revenu que chez celles ayant un niveau d'instruction et un revenu élevés [11].

3. Conséquences physiopathologiques de l'obésité

3.1. Expansion du tissu adipeux

L'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique, en faveur des apports d'énergie, conduisant à une augmentation des réserves énergétiques stockées sous forme de triglycérides dans les adipocytes du tissu adipeux. Il en résulte une expansion du tissu adipeux, par augmentation de la taille des adipocytes (hypertrophie) mais également de leur nombre (hyperplasie) par stimulation de l'adipogénèse.

Le tissu adipeux blanc est un tissu très vascularisé, innervé et formé majoritairement d'adipocytes, groupés en petits lobules séparés par de fines cloisons conjonctives et contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibres de collagène. Il est principalement localisé au niveau sous-cutané et viscéral.

Dans certaines situations, les capacités de stockage des graisses dans le tissu sous-cutané sont dépassées entraînant ainsi leur dépôt au niveau viscéral et de sites ectopiques comme le tissu cardiaque, hépatique, musculaire et vasculaire (Figure 2). Contrairement au tissu sous-cutané, le tissu adipeux viscéral est associé à un métabolisme actif responsable d'un fort renouvellement lipidique et d'une sécrétion accrue d'acides gras libres à l'origine des perturbations métaboliques liées à l'obésité [21]. Il constituerait ainsi le seul dépôt pathogénique de l'organisme [22]. Associée à une fonte préférentielle de la graisse viscérale, une perte de poids même modeste procure des bénéfices métaboliques et cliniques significatifs [23]. L'afflux massif de graisses dans les tissus cardiaque, hépatique, musculaire et vasculaire a un effet délétère sur ces tissus dépourvus de capacité de stockage des lipides [21].

Par ailleurs, Drolet *et coll.* [24] ont observé que les femmes obèses possèdent une importante capacité de stockage des graisses au niveau sous-cutané et une moindre accumulation viscérale. Ceci pourrait expliquer que les femmes soient moins sujettes aux complications métaboliques associées à l'obésité.

La répartition des graisses apparaît donc comme un critère pertinent dans l'évaluation de l'obésité, puisqu'une accumulation viscérale de graisses est impliquée dans le développement du syndrome métabolique, principale complication de la maladie [21, 22].

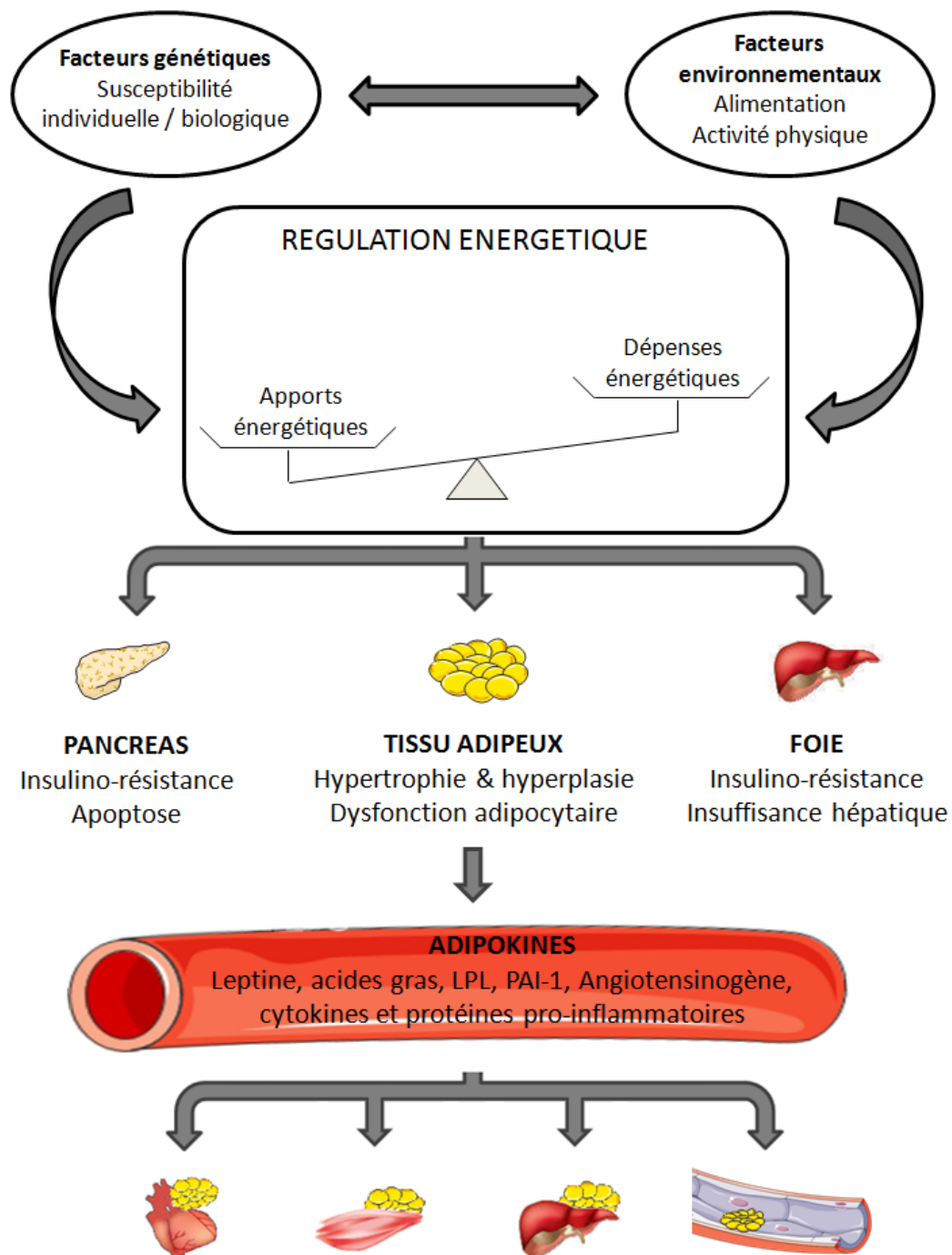


Figure 2 : Mécanismes physiopathologiques de l'obésité à l'origine des principales complications métaboliques et cardiovasculaires (d'après [21, 25]).

3.2. Rôle endocrine du tissu adipeux

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un tissu « passif » dévolu au stockage des graisses et intervenant comme isolant thermique et mécanique. Sa reconnaissance comme véritable organe endocrine a débuté avec la découverte de la leptine en 1994 [26].

Les molécules sécrétées par ce tissu sont regroupées sous le terme d'adipokines, et plus d'une centaine, de structure et de fonctions variées, ont été dénombrées. Parmi elles, on retrouve la leptine, les acides gras, des enzymes métaboliques, des cytokines et des protéines de l'inflammation (Figure 3). Certaines adipokines exercent une action autocrine ou paracrine, comme en atteste la présence sur l'adipocyte de récepteurs à la leptine, à l'IL-6 (Interleukine-6) et au TNF α (Tumor Necrosis Factor), tandis que d'autres agissent de façon endocrine sur des tissus cibles après libération dans la circulation sanguine [26].

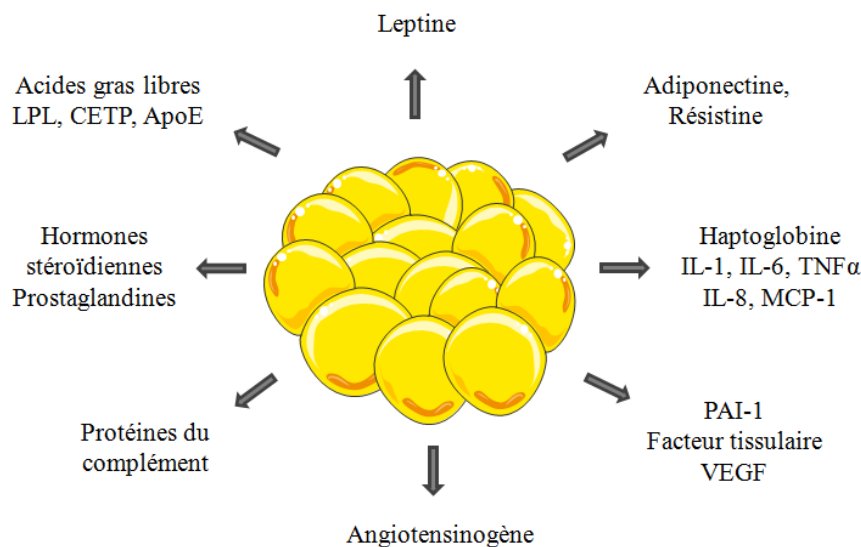


Figure 3 : Adipokines sécrétées par le tissu adipeux (d'après [26]).

Les adipokines interviennent dans des processus physiologiques variés tels que la régulation de la balance énergétique (leptine) et de la pression artérielle (angiotensinogène), le métabolisme lipidique (Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), Apolipoprotéine E (ApoE)) et glucidique (adiponectine, résistine), l'homéostasie vasculaire (Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), facteur tissulaire), l'angiogénèse (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) et l'immunité (protéines du complément).

Elles sont également impliquées dans des phénomènes pathologiques puisque de nombreuses adipokines participent à l'inflammation. En effet, l'adipocyte sécrète des cytokines, des marqueurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α , haptoglobine) et des chémokines (Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), IL-8). Paradoxalement, une adipokine aux propriétés anti-inflammatoires, l'adiponectine, est également sécrétée par l'adipocyte [26].

3.3. Sécrétion d'adipokines

L'expansion du tissu adipeux est responsable d'une sécrétion augmentée d'adipokines associée à un état inflammatoire local et systémique. Il est maintenant clairement établi que les adipokines sont le lien entre l'obésité et les pathologies qui lui sont associées telles que le diabète et l'athérosclérose [25]. Etant donné le nombre important de molécules sécrétées par le tissu adipeux et dont l'expression est augmentée avec l'obésité, seules les adipokines impliquées formellement dans la physiopathologie des complications de l'obésité seront détaillées. De nombreuses adipokines, telles que la visfatine, l'apeline, la vaspine et l'hepcidine, n'ont été décrites que récemment et pour lesquelles des études sont en cours afin d'identifier leur rôle, leur mécanisme d'action et leur possible implication dans le développement de l'obésité.

3.3.1. La leptine

La leptine est une des principales adipokines du tissu adipeux et possède une multiplicité de rôles dans de nombreux phénomènes physiologiques. C'est pourquoi l'hyperleptinémie et la résistance à la leptine, observées chez les sujets obèses ont des retentissements majeurs sur le métabolisme, la reproduction et l'immunité. Etant donné l'importance majeure de cette adipokine dans notre travail, une partie entière lui est consacrée ci-dessous.

3.3.2. Les facteurs de l'inflammation

L'obésité est caractérisée par une inflammation systémique modérée et chronique. Chez les sujets obèses, on observe une élévation des taux circulants de médiateurs pro-inflammatoires tels que des marqueurs non spécifiques (CRP (C-reactive protein)), des cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-18) et des marqueurs de la phase aiguë (haptoglobine) [27]. Par ailleurs, le taux plasmatique d'adiponectine, adipokine aux propriétés anti-inflammatoires, est diminué chez les personnes obèses [27]. D'après Yudkin *et coll.* [28], ces marqueurs plasmatiques de

l'inflammation sont corrélés à une résistance à l'insuline et à une dysfonction endothéliale, contribuant ainsi à l'augmentation du risque cardiovasculaire chez les personnes obèses.

De par son rôle endocrine, le tissu adipeux est considéré comme l'une des principales sources des facteurs pro-inflammatoires plasmatiques observés en cas d'obésité [27]. Le TNF α fut le premier facteur pro-inflammatoire pour lequel une sécrétion adipocytaire a été démontrée [29]. Puissant régulateur du tissu adipeux, il stimule la lipolyse, l'apoptose des cellules adipocytaires et la synthèse d'autres cytokines telles que l'IL-6 et l'haptoglobine. Chez les individus obèses, on observe une augmentation de l'expression adipocytaire de TNF α et des cytokines pro-inflammatoires dont il régule la synthèse [27].

Parallèlement, la synthèse adipocytaire des chémokines MCP-1 et MIF (Macrophage Inhibitory Factor) impliquées dans le recrutement macrophagique est augmentée chez les sujets obèses [30, 31]. Il en résulte une infiltration et une accumulation de macrophages dans le tissu adipeux, l'abondance macrophagique étant corrélée à l'IMC. Une fois infiltrés dans le tissu adipeux, les macrophages entretiennent le phénomène inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [31, 32]. La majeure partie du TNF α et de l'IL-6 est ainsi sécrétée par les macrophages adipocytaires [31]. En effet, des études ont montré que l'expression de marqueurs macrophagiques dans le tissu adipeux est plus élevée chez des patients obèses et insulino-résistants et qu'elle est corrélée à celle du TNF α et de l'IL-6 [31]. De plus, des études réalisées chez la souris et sur des lignées adipocytaires humaines ont mis en évidence le rôle majeur de l'inflammation et de l'infiltration macrophagique du tissu adipeux dans le développement de l'insulino-résistance liée à l'obésité [33, 34].

Les causes de cette infiltration adipocytaire restent cependant méconnues. Un des mécanismes envisagés implique le développement d'une hypoxie liée à l'hyperplasie adipocytaire et/ou d'un état de stress adipocytaire résultant d'une accumulation excessive de lipides [25]. La nécrose des adipocytes engendrée par ces phénomènes serait à l'origine de l'infiltration macrophagique du tissu adipeux [31].

Enfin, chez les sujets obèses, une perte de poids est associée à une réduction de l'infiltration macrophagique et de la sécrétion de TNF α ainsi qu'à une diminution du taux plasmatique de CRP et d'IL-18 [27, 35].

3.3.3. Les acides gras et les protéines du métabolisme lipidique

Les adipokines les plus abondamment sécrétées par le tissu adipeux sont les acides gras [26]. On retrouve également des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique telles que la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) et l'apolipoprotéine E [36]. L'obésité est associée à une augmentation de la sécrétion d'acides gras libres dans la circulation sanguine [36]. Les acides gras libérés par le tissu adipeux parviennent directement au foie, causant alors une hypertriglycéridémie par une synthèse accrue des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) et une hyperglycémie par une néoglucogénèse favorisée. Il en résulte un hyperinsulinisme ainsi qu'une résistance à l'insuline, au niveau hépatique mais également musculaire du fait de l'utilisation préférentielle des lipides à la place du glucose. Enfin, les acides gras exercent une action pro-apoptotique sur les cellules β pancréatiques et provoquent une diminution de la sécrétion d'insuline, renforçant ainsi le risque de diabète chez les sujets obèses [25]. Parallèlement aux dysfonctionnements hépatique et pancréatique, l'excès d'acides gras est donc responsable d'une dyslipidémie et d'une résistance à l'insuline, à l'origine du développement du syndrome métabolique [25].

3.3.4. Les facteurs vasculaires

Le PAI-1 participe à l'homéostasie vasculaire par son action anti-fibrinolytique. L'élévation de l'expression et de l'activité de PAI-1 chez les sujets obèses suggère fortement son implication dans les complications cardiovasculaires liées à l'obésité [37]. L'angiotensinogène est le précurseur de l'angiotensine II, puissant agent vasoconstricteur contribuant au développement de l'hypertension artérielle. Chez les sujets obèses, l'expression adipocytaire et le taux plasmatique d'angiotensinogène sont augmentés proportionnellement à l'IMC, expliquant ainsi l'hypertension artérielle retrouvée chez les sujets obèses [36]. Par ailleurs, l'angiotensine II semble également participer aux phénomènes inflammatoires en stimulant la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de leptine, comme démontré sur des lignées adipocytaires humaines [36]. Elle interviendrait également de façon indirecte dans les complications cardiovasculaires de l'obésité en stimulant la synthèse adipocytaire de PAI-1 [36].

En résumé, l'obésité est associée à une expansion du tissu adipeux à l'origine de la formation de dépôts ectopiques de graisses et du dysfonctionnement des tissus infiltrés. D'autre part, le tissu adipeux hypertrophié sécrète une quantité importante d'adipokines parmi lesquelles on retrouve la leptine, les acides, certains facteurs inflammatoires et vasculaires. Il est désormais établi que les adipokines constituent le lien entre l'obésité et les pathologies associées à l'obésité.

4. Conséquences de l'obésité chez la femme enceinte et le fœtus

4.1. Chez la femme enceinte

4.1.1. Troubles de la fécondité

Plusieurs études ont montré que l'obésité était associée à une augmentation d'irrégularités du cycle menstruel et de troubles de l'ovulation, responsables d'un allongement du délai de conception [38, 39]. De plus, chez les femmes obèses recevant une assistance médicale à la procréation, le recueil d'ovocytes est moins important et de moins bonne qualité, conduisant à un taux d'échec plus élevé [38, 39]. Le risque de fausse couche au premier trimestre est doublé chez les patientes obèses, que ce soient pour les grossesses spontanées ou après une assistance médicale à la procréation [39].

4.1.2. Troubles de la grossesse

Bien que les mécanismes physiopathologiques en soient encore peu connus, il est maintenant clairement établi que l'obésité est associée à une élévation du risque de diabète et d'hypertension gestationnels ainsi que de pré-éclampsie [16, 40-42].

Dans une cohorte de plus de 16000 patientes, Weiss *et coll.* [42] ont montré qu'en cas d'obésité modérée et sévère respectivement, le risque relatif est de 2,6 et 4,0 pour le diabète gestationnel, de 2,5 et 3,2 pour l'hypertension artérielle et de 1,6 et 3,3 pour la pré-éclampsie. Une étude récente s'est intéressée aux femmes enceintes dites « super-obèses » ($IMC \geq 50 \text{ kg/m}^2$) [3]. Chez ces patientes, les taux de pré-éclampsie et de diabète gestationnel sont significativement supérieurs à ceux observés chez des femmes obèses (17,4 % vs 8,5% pour la pré-éclampsie et 12,9% vs 6,3% pour le diabète gestationnel), de même que le risque relatif associé à chaque complication ($RR = 2,14$; $IC\ 95\% : 1,64 - 2,80$ pour la pré-éclampsie et $RR = 1,90$; $IC\ 95\% : 1,40 - 5,57$ pour le diabète gestationnel) [3].

La grossesse est associée à un état pro-thrombotique caractérisé par une diminution de la fibrinolyse et une augmentation des facteurs de coagulation. Il semblerait que ces troubles soient majorés en cas d'obésité maternelle, en augmentant d'un facteur 2 à 5 le risque de survenue d'une thrombose veineuse [43].

4.1.3. Troubles de l'accouchement

4.1.3.1. *Dépassements de terme*

Selon l'OMS, une grossesse est dite à terme dépassé si elle se prolonge au-delà de 41 semaines d'aménorrhées (SA) révolues. Il est démontré que l'obésité maternelle est associée de manière significative à des dépassements de terme et des perturbations du déroulement du travail [40, 44, 45].

Une étude récente de Denison *et coll.* [44] montre que la durée de la grossesse s'allonge proportionnellement à l'IMC pré-conceptionnel. De façon similaire, Cedergren *et coll.* [40] ont montré une augmentation du risque d'accouchement post-terme en fonction du grade de l'obésité en l'évaluant respectivement à 1,4, 1,5 et 1,8 en cas d'obésité modérée, sévère et morbide.

Chez les femmes obèses, la probabilité d'une mise en travail spontanée est divisée d'un facteur deux par rapport aux femmes de poids normal [44]. Une des hypothèses avancées afin d'expliquer ces perturbations est l'absence ou l'irrégularité des contractions utérines observées chez les femmes enceintes obèses [45]. L'étude *in vitro* de Zhang *et coll.* [15] réalisée sur des biopsies de myomètre montre une réduction de l'amplitude et de la fréquence des contractions myométriales chez les femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal. Ainsi, l'obésité diminuerait la capacité de l'utérus à se contracter spontanément au moment de l'accouchement, expliquant un recours plus fréquent au déclenchement artificiel du travail [14-17, 45]. De plus, Hamon *et coll.* [17] ont montré qu'une quantité plus importante d'ocytocine était utilisée chez ces patientes.

Par ailleurs, certaines études montrent que l'obésité maternelle s'accompagne d'un allongement de 60 à 90 minutes de la première phase de travail ; phase correspondant à l'effacement et à la dilatation du col et s'achevant lorsque ce dernier est totalement dilaté [17, 45]. Cet allongement est lié à une progression plus lente de la dilatation du col utérin jusqu'à 7 cm et pourrait résulter d'une inefficacité des contractions utérines, ces dernières étant le moteur de la dilatation cervicale [45]. Ceci reste controversé puisque d'autres études ne montrent aucune variation de la durée de cette phase [14, 46]. Ces différences peuvent s'expliquer par une proportion plus élevée de femmes nullipares ou par l'inclusion de femmes en surpoids dans le groupe contrôle. Néanmoins, les études s'accordent sur l'absence de modification de la durée de la seconde phase du travail qui, plus courte que la phase précédente, correspond à la progression du fœtus dans le bassin maternel et à son expulsion [14, 17, 45, 46].

Enfin, différentes études ont démontré une augmentation du risque d'accouchement par césarienne variant entre 1,6 et 3 chez des femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal [14, 16, 17, 42]. Plus précisément, Cedergren *et coll.* [40] ont stratifié le risque d'accouchement par césarienne en fonction du grade de l'obésité en l'évaluant respectivement à 1,8, 2,3 et 2,7 en cas d'obésité modérée, sévère et morbide.

4.1.3.2. Accouchement prématuré

Le risque d'accouchement prématuré, défini comme une naissance survenant avant 37 SA, associé à l'obésité est très controversé.

De nombreuses études rapportent une augmentation du risque de prématurité avec l'IMC pré-conceptionnel [40, 42, 47, 48]. Ces données sont confirmées par les résultats d'une méta-analyse regroupant 84 études, soit plus d'une million de patientes, et décrivant chez les femmes en surpoids et obèses, une augmentation du risque de prématurité avant 37 SA (RR = 1,24 ; IC 95% : 1,13 – 1,37) et notamment avant 33 SA (RR = 1,26 ; IC 95% : 1,14 – 1,39), toute cause confondue [49]. Cependant, certaines études rapportent que l'obésité maternelle est associée à une diminution du risque de prématurité [41, 50] tandis que d'autres études ne montrent aucun effet de l'obésité sur ce risque [43]. Il semblerait que ces différences soient liées à l'hétérogénéité des limites définissant l'obésité et l'accouchement prématuré, mais aussi au manque de distinction entre les différentes causes d'accouchement prématuré.

Un accouchement prématuré peut être secondaire soit à une mise en travail spontanée et prématurée, soit à un travail induit prématurément pour raisons médicales. Dans la majorité des cas, l'induction du travail est motivée par l'apparition de complications liées à un diabète ou une hypertension pré-gestationnels ou gestationnels, et notamment par le diagnostic d'une pré-éclampsie qui correspond à une grave complication de la grossesse reconnue comme une des principales causes de mortalité maternelle et périnatale [50]. D'après Hendler *et coll.* [50], la pré-éclampsie est la cause de 62% des accouchements prématurés pour raisons médicales chez les patientes obèses contre 36% chez les femmes de poids normal.

En distinguant ces deux causes, la plupart des études s'accordent sur le fait que l'obésité est associée à une augmentation du risque d'induction du travail pour raisons médicales avant 37 SA (RR = 1,30 ; IC 95% : 1,23 - 1,37 [49]) [49-51]. Cependant, dans l'étude de Baeten *et coll.* [47], l'augmentation du risque de prématurité avec l'obésité maternelle persiste après exclusion des patientes présentant des complications pour lesquelles une induction du travail est recommandée.

4.2. Chez le fœtus

4.2.1. Mortalité périnatale

L'obésité maternelle est associée à un risque élevé de mort *in utero* et de décès néonatal précoce. D'après Cedergren *et coll.* [40], le risque de mort *in utero* est estimé à 1,8, 2 et 2,8 chez des patientes souffrant respectivement d'obésité modérée, sévère et morbide. Des données similaires ont été observées pour le risque de décès néonatal précoce [40].

Le taux d'admission en unités de soins intensifs des nouveau-nés de mère obèse est 1,5 fois plus élevé comparé aux nouveau-nés de mère de poids normal [14]. Ce risque est multiplié par 4,6 en cas d'obésité morbide [41].

4.2.2. Malformations congénitales

En cas d'obésité maternelle, le risque de spina bifida est augmenté d'un facteur variant de 2,2 à 3,5 selon les études, et semble indépendant des facteurs nutritionnels et de la supplémentation en folates [52]. De plus, les femmes obèses présentent un risque accru d'omphalocèles et de malformations cardiaques [52, 53]. Cet excès de risque pourrait être lié à l'incidence plus élevée de diabète gestationnel chez les femmes obèses, le diabète étant un facteur de risque reconnu de malformations congénitales [52].

4.2.3. Macrosomie

La grossesse chez la femme obèse s'accompagne d'un taux élevé de macrosomie fœtale, indépendamment de l'existence d'un diabète gestationnel [17, 41]. Chez les nouveau-nés de mères diabétiques, la macrosomie résulte d'une hyperglycémie et d'un hyperinsulinisme fœtaux causés par l'hyperglycémie maternelle [16]. On peut alors supposer qu'en l'absence de diabète gestationnel, l'obésité maternelle soit responsable d'une hyperglycémie et d'un hyperinsulinisme fœtaux à l'origine de la macrosomie. Selon les études, la proportion de nouveau-nés macrosomes oscille entre 15% et 30% [14, 17, 41, 42]. Le risque de macrosomie dépend du poids avant la grossesse et de la prise de poids au cours de la grossesse. Ainsi, chez des patientes obèses, ce risque est multiplié par 2 à 3 si la prise de poids est supérieure à 14 kg [38]. L'obésité est également associée à un risque augmenté de dystocie des épaules dont une des principales causes est la macrosomie fœtale [14, 40].

4.2.4. Exposition prénatale et influence maternelle

Le concept de programmation fœtale décrit l'influence de l'environnement intra-utérin sur le fœtus influençant sa susceptibilité à développer certaines maladies à l'âge adulte. Ainsi, l'exposition précoce du fœtus à un environnement énergétique extrême, aussi bien excessif que restreint lors de périodes de famine, ou à un environnement diabétogène contribue au développement d'une obésité infantile qui se maintient à l'âge adulte [54]. De plus, une corrélation positive a été mise en évidence entre la prise de poids maternel pendant la grossesse et l'IMC infantile d'une part, et le risque d'obésité à l'âge adulte d'autre part [55].

Par ailleurs, l'obésité maternelle est un facteur de risque d'obésité infantile ou survenant à l'âge adulte. En effet, Whitaker *et coll.* [56] montrent, sur une cohorte de 8494 enfants, que l'obésité maternelle au premier trimestre de grossesse augmente d'un facteur 2 à 2,3 le risque d'obésité infantile entre 2 et 4 ans et que les taux d'enfants obèses observés à 2, 3 et 4 ans sont respectivement de 15,1%, 20,6% et 24,1% contre 9%, 12% et 14,5%, pour les enfants nés de mère obèses et de poids normal. De plus, le risque de survenue d'une obésité à l'âge adulte en cas d'obésité maternelle est compris entre 2,8 et 3,6 [57].

II. La physiologie du travail

1. La sphère utéro-placentaire

1.1. L'utérus

1.1.1. Anatomie

L'utérus est un organe creux en forme de poire, impair et médian, situé au centre de la cavité pelvienne entre la vessie et le rectum. L'utérus non gravide mesure 6 à 8 cm de long sur 4 à 5 cm de large et pèse environ 50 g. Cependant, sa taille et son poids augmentent considérablement au cours de la grossesse, entraînant des modifications de forme, de position et de consistance. A terme, ses dimensions atteignent 32 cm de long sur 22 cm de large, pour un poids d'environ 1100 g.

L'utérus est composé de trois parties : le corps, l'isthme et le col utérin. Le corps utérin comprend deux bords latéraux et un bord supérieur (fundus). Les cornes utérines sont les régions supéro-latérales au niveau desquelles l'utérus est relié aux trompes de Fallope. L'isthme est la partie relativement rétrécie du corps juste au-dessus du col. Enfin, le col est la partie étroite et cylindrique qui s'ouvre sur le vagin.

1.1.2. Histologie

La paroi de l'utérus mesure environ 1,5 cm d'épaisseur et est formée de trois couches tissulaires. De la lumière à la périphérie, on trouve l'endomètre, le myomètre et le périmètre.

L'endomètre est une muqueuse constituée d'un épithélium simple, prismatique et glandulaire qui repose sur un stroma endométrial de tissu conjonctif en contact direct avec le myomètre. Riche en vaisseaux sanguins, ce tissu subit d'importantes modifications structurales au cours du cycle menstruel et de la grossesse.

Le myomètre est un tissu musculaire spontanément contractile et hautement excitable. L'activité contractile efficace du myomètre est limitée à une courte période en fin de grossesse. Le myomètre est formé de fibres musculaires lisses organisées en faisceaux entrecroisés. Trois couches ont été décrites : la couche interne ou circulaire est composée de fibres musculaires orientées parallèlement au stroma endométrial, formant un anneau entourant la cavité utérine ; la couche intermédiaire, très vascularisée, est essentiellement constituée de tissu conjonctif ; la couche externe ou longitudinale est épaisse au niveau du fundus utérin et s'affine au niveau du

col. De nombreuses anastomoses entre les faisceaux de fibres des différentes couches assurent leur cohésion.

Le périmètre est constitué d'un revêtement séreux tapissant les faces antérieure et postérieure du corps utérin, ainsi que la face dorsale du col. Il est formé par le péritoine doublé d'une mince couche de tissu conjonctif et relie l'utérus à la paroi du bassin.

1.2. Les membranes fœtales

Les membranes fœtales tapissent la cavité amniotique et renferment le liquide amniotique et le fœtus tout au long de la grossesse. A terme, leur surface représente 1500 cm^2 pour une épaisseur de 200 à 300 μm . Leur structure complexe et multistratifiée leur garantit une cohésion et une élasticité permettant d'une part, la croissance harmonieuse du fœtus et d'autre part, l'absorption des chocs. Elles sont constituées de deux feuillets accolés, histologiquement distincts : l'amnios et le chorion (Figure 4).

L'amnios, membrane la plus interne, donne sur la cavité amniotique et est en contact avec le liquide amniotique. Elle est formée d'un épithélium unistratifié cubique non cilié reposant sur une membrane basale de tissu filamenteux. Son rôle est d'assurer le renouvellement du liquide amniotique.

Le chorion, membrane la plus externe, est en contact étroit avec la décidue avec laquelle il forme l'interface fœto-maternelle. Difficilement dissociables, ils sont souvent désignés sous le terme de chorio-décidue. Le chorion est composé d'une couche conjonctive fibreuse riche en collagène, lui conférant une grande élasticité, et d'une couche trophoblastique, impliquée dans la formation des villosités choriales et du placenta [58, 59].

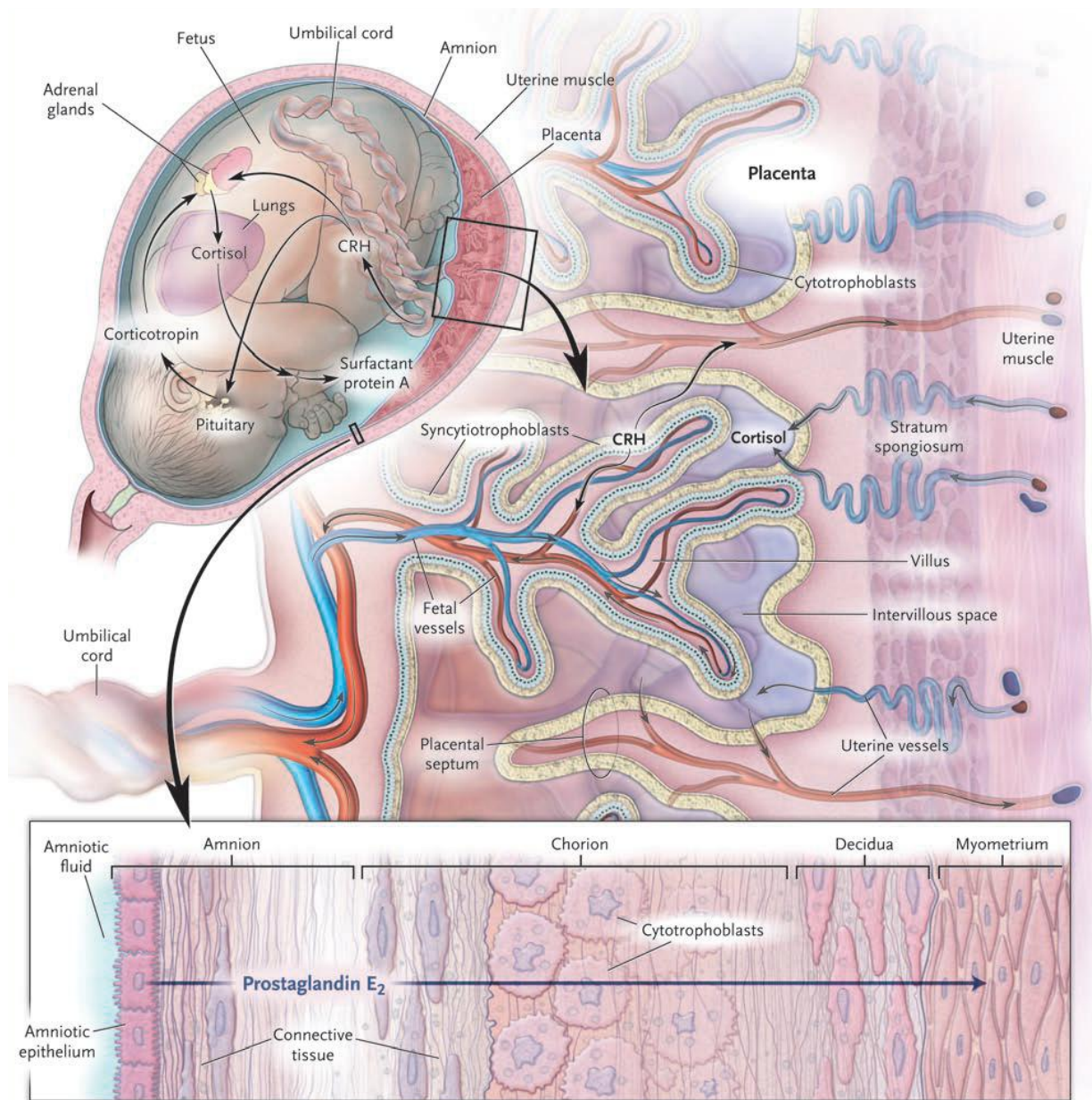


Figure 4 : Organisation de la sphère utéro-placentaire [59].

2. Le rôle de l'inflammation dans la mise en route du travail

La mise en route du travail implique une suite d'évènements, incluant la dilatation du col utérin, la rupture des membranes fœtales et le déclenchement de contractions utérines efficaces permettant l'expulsion du fœtus puis du placenta. Ce processus est ensuite suivi d'un phénomène d'involution utérine permettant à l'utérus de retrouver sa taille initiale. Bien que les mécanismes précis menant à la mise en route du travail restent mal élucidés, il semblerait que l'inflammation y joue un rôle initiateur [60].

2.1. Inflammation et mise en route du travail

Au niveau systémique, il semblerait que la mise en route du travail soit associée à une prolifération de neutrophiles et de monocytes circulants ainsi qu'à leur activation [61]. Chez les femmes en travail, Yuan *et coll.* [61] ont montré une augmentation du taux de neutrophiles et de monocytes circulants, de l'activité de migration des neutrophiles en réponse à un agent chimiotactique de synthèse ainsi que de l'expression de marqueurs d'activation situés à la surface des leucocytes tels que CD62L (L-sélectine), CD11a et CD11b, permettant leur adhérence aux cellules endothéliales.

Au niveau des tissus gestationnels, la mise en route du travail est associée à une réaction inflammatoire observée dans le myomètre et le col utérin suite à l'infiltration de ces tissus par des cellules circulantes, majoritairement des neutrophiles et des monocytes [62]. L'afflux de leucocytes dans ces tissus est favorisé d'une part, par l'augmentation de la synthèse utérine de chémokines telles que l'IL-8 et MCP-1 [62, 63] et d'autre part, par l'expression accrue de la molécule ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) au moment du travail, permettant ainsi l'adhésion et la diapédèse des cellules du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire [64]. En effet, il existe une augmentation de l'expression génique d'IL-8 et de MCP-1 dans les leucocytes circulants de femmes en travail, leur permettant une fois infiltrés, d'entretenir l'afflux de leucocytes dans le myomètre [61]. De plus, Ledingham *et coll.* [64] ont montré que le travail était associé à une augmentation d'un facteur 10 de l'expression génique myométriale et cervicale de ICAM-1. Enfin, des études d'immunomarquage ont permis de localiser cette molécule d'adhésion cellulaire au niveau de l'endothélium de vaisseaux présents dans le myomètre et le col [64].

Une fois infiltrés, les leucocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, comme en atteste l'analyse de biopsies myométriales et cervicales de femmes en travail montrant une augmentation de l'expression d'IL-1 β et d'IL-6, par rapport à des femmes non en travail [62, 65]. Dans les membranes fœtales, une augmentation de l'expression d'IL-1 β et d'IL-6 au moment du travail a également été démontrée, sans qu'elle ne s'accompagne d'une augmentation de la densité leucocytaire de ces tissus. Elle proviendrait d'une production accrue de ces cytokines par des cellules inflammatoires résidentes des membranes fœtales [62].

En résumé, la mise en route du travail est associée à une infiltration leucocytaire des tissus utérins, favorisée par l'expression accrue de chémokines par ces tissus d'une part, et de molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et au niveau tissulaire d'autre part. Il en résulte une sécrétion leucocytaire de cytokines pro-inflammatoires, localisée au niveau de la sphère utérine et supposée déclencher la mise en route du travail.

2.2. Cytokines et mise en route prématurée du travail

Il semblerait que le travail prématuré et le travail physiologique obéissent à un processus identique survenant à des âges gestationnels différents [60]. Les infections intra- ou extra-utérines, déclarées ou non, constituent une des principales causes d'accouchement prématuré [66]. Les infections intra-utérines (ou chorioamniotites) sont associées à des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6 et l'IL-8, dans le liquide amniotique, la décidue, le myomètre et les membranes fœtales [60]. En pratique, l'inflammation physiologique est difficile à différencier de l'inflammation pathologique d'origine infectieuse, en raison de la difficulté à diagnostiquer une chorioamniotite sub-clinique.

L'IL-1 β a été la première cytokine identifiée comme un élément central de l'inflammation aboutissant à l'accouchement prématuré. Par la suite, il a été montré que le TNF α était également fortement impliqué dans la physiopathologie du travail prématuré. En effet, ces deux cytokines sont produites par la décidue en réponse à une stimulation bactérienne. De plus, leur expression et leur activation sont augmentées chez les femmes présentant une menace d'accouchement prématuré et une chorioamniotite [66]. Différentes études réalisées *in vivo* sur des modèles animaux ont étayé ces observations. Les injections intra-amniotiques d'IL-1 β ou de TNF α à des macaques induisent des contractions myométriales à l'origine d'un travail prématuré, contrairement aux injections d'IL-6 et d'IL-8 [67]. De plus, Romero *et coll.* [66] ont

montré que le prétraitement de souris avec un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β bloquait le travail induit par l'administration d'IL-1 β . Des résultats similaires ont été observés lors d'une étude réalisée sur des souris knock-out (KO) pour les récepteurs à l'IL-1 β et au TNF α chez lesquelles l'inoculation intra-utérine de bactéries induisait moins de travail prématuré que chez des animaux sauvages [68].

Il existe une redondance des effets des cytokines impliquées dans la parturition. Ainsi, plusieurs cytokines peuvent entraîner la même réponse cellulaire, expliquant le fait que le blocage d'une seule cytokine ne suffit pas à prévenir l'accouchement prématuré [60]. Cependant, l'inactivation simultanée des voies de signalisation de l'IL-1 β et du TNF α chez des souris KO pour le récepteur de ces deux cytokines réduit significativement le taux d'accouchements prématurés, suggérant leur importance dans la parturition [68].

Parmi les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 semble impliquée dans le maintien de la grossesse. En effet, une étude réalisée chez le macaque a montré que l'IL-10 est capable de s'opposer au travail induit par l'IL-1 β et diminue également la concentration en TNF α dans le liquide amniotique [69]. En outre, la production placentaire d'IL-10 est réduite à terme avant la mise en route du travail, par rapport aux taux observés aux premier et second trimestres, ce qui suggère que la diminution de l'IL-10 au moment du terme favorise la survenue d'une réponse inflammatoire et la mise en route du travail [70]. Les travaux de Hanna *et coll.* [71] corroborent cette hypothèse puisqu'ils montrent que l'expression d'IL-10 est plus faible dans les tissus placentaires de grossesses compliquées de chorioamniotite par rapport à des tissus non infectés.

3. Les mécanismes de l'accouchement

3.1. Le remodelage des tissus gestationnels

A terme, les tissus maternels subissent de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles, telles que la rupture des membranes fœtales, la dilatation du col et un remodelage utérin permettant la synchronisation des contractions utérines [72].

Ce remodelage tissulaire fait intervenir des enzymes de digestion des composants de la matrice extracellulaire, les métalloprotéinases (MMP) [73]. Aussi appelées matrixines, elles sont regroupées en sous-groupes en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat. Elles

sont toutes capables de digérer le collagène mais certaines peuvent également digérer la gélatine, la fibronectine et l'élastine [73]. Synthétisées sous forme d'enzymes inactives (pro-MMP), elles sont activées dans le milieu extracellulaire par des protéases telles que d'autres MMP ou par des espèces réactives de l'oxygène [73]. La synthèse des MMP est induite par une glycoprotéine EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloPRotéinase INducer) et leur activité est inhibée par les TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) [73, 74].

Il existe une relation étroite entre le système inflammatoire et le système des MMP, puisque les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'activer différentes MMP [75, 76] et inversement, les MMP2, MMP9 et MMP13 sont capables d'activer l'IL-1 β , entretenant ainsi le signal inflammatoire [77].

3.1.1. La rupture des membranes fœtales

La mise en route du travail et la rupture des membranes fœtales sont associées à un changement du profil d'expression, de sécrétion et d'activation des MMP et des TIMP dans le liquide amniotique [78-80]. En effet, MMP2 est exprimée dans l'amnios tout au long de la grossesse et surexprimée au moment du travail. MMP9 est exprimée sélectivement en fin de grossesse et constitue la MMP la plus exprimée au cours du travail [79, 80].

Plusieurs études ont montré que certaines protéines et cytokines sont capables de moduler l'expression des MMP et donc de réguler la rupture des membranes fœtales. En effet, l'expression de la protéine EMMPRIN, induisant la synthèse des MMP, est augmentée dans les membranes fœtales de femmes en travail [74]. Des études *in vitro* ont montré que la stimulation de biopsies de membranes fœtales par de l'IL-1 β et/ou du TNF α augmente l'expression de MMP9. De plus, il semble que le TNF α soit indispensable à la régulation de l'expression de MMP9 en cas de stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) [81].

L'amincissement et la fragilisation aboutissant à la rupture des membranes fœtales ne concernent pas l'ensemble du tissu mais touchent plutôt une zone en regard du col utérin [82]. Cette zone présente des modifications de la matrice extracellulaire avec une augmentation de l'activité de MMP9 et une répression de TIMP3 [82]. Enfin, l'invasion leucocytaire des membranes fœtales participe également à leur remodelage. En effet, la sous-population de lymphocytes recrutée par les chémokines sécrète MMP9 au niveau de l'espace chorio-décidua [79].

3.1.2. La dilatation du col

La maturation cervicale se traduit par un ramollissement et une ouverture du col et constitue un élément nécessaire à la mise en route du travail et à son bon déroulement. Cette maturation implique un remodelage intense mettant en jeu des processus analogues à ceux observés dans la rupture des membranes fœtales. En effet, de nombreux travaux ont décrit une activation de différentes MMP et une infiltration leucocytaire de ce tissu au moment du travail [83, 84].

Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression cervicale des MMP2 et MMP9 à terme [85, 86] et une infiltration leucocytaire de ce tissu au moment du travail [62]. MMP2 est majoritairement sécrétée par les fibroblastes et les cellules musculaires cervicales tandis que MMP9 provient exclusivement des leucocytes infiltrés [86].

L'IL-8 semble être responsable de la maturation cervicale. En effet, des concentrations élevées d'IL-8 sont observées dans le col pendant sa maturation et sont corrélées à l'expression de MMP8 et MMP9 [87]. D'autres cytokines sont également impliquées dans ce processus. Il s'agit de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF α dont l'expression est augmentée dans des biopsies de tissu cervical de femmes en travail comparé à des femmes non en travail [62, 84] et qui modulent la production des MMP ou des TIMP [88, 89].

3.1.3. Le remodelage utérin

3.1.3.1. *Le remodelage de la matrice extracellulaire myométriale*

Au cours de la grossesse, l'utérus croît en taille pour accueillir le fœtus, le placenta et le liquide amniotique. Ce processus est en partie facilité par un remodelage important de la matrice extracellulaire accompagné d'une prolifération des cellules utérines [90]. Au moment de la parturition, ce remodelage tissulaire est essentiel car il permet à l'utérus de recouvrer une activité contractile efficace et d'initier le phénomène d'involution utérine afin que l'utérus retrouve sa taille initiale [72, 91].

L'expression et l'activité des MMP dans le myomètre lors de la mise en route du travail n'ont été que peu étudiés. Roh *et coll.* [75] ont rapporté une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP9 dans les cellules myométriales en travail et que cette augmentation est corrélée à la progression du travail. Ces observations ont été confirmées par Choi *et coll.* [92] qui ont montré une surexpression de MMP9 dans le myomètre après la mise en route du travail.

La stimulation de cellules myométriales humaines par de l'IL-1 β ou du TNF α induit l'expression et l'activation de MMP9 démontrant ainsi que le système des MMP peut être activé par un signal inflammatoire [75]. Ces effets de l'IL-1 β sont liés à l'activation de NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) et à la dégradation d'I κ B [92]. Par ailleurs, MMP3 qui agit à la fois comme enzyme de dégradation et comme activateur de différentes MMP, est également surexprimée au moment du travail [93].

Notre équipe a démontré l'existence d'un remodelage intense du tissu myométrial humain en cas de chorioamniotite *via* une augmentation de l'expression des MMP1, MMP2, MMP3 et MMP9, et une activation des MMP2 et MMP9 [94]. De plus, la stimulation de biopsies myométriales par du LPS est capable de reproduire ce remodelage [94].

D'autres MMP ou TIMP (MMP2, MMP13, MMP28, TIMP1, TIMP3) sont surexprimés dans le myomètre au cours de l'implantation ou lors du post-partum [95-98].

3.1.3.2. *L'apoptose des cellules myométriales*

A l'approche du terme, les cellules myométriales changent de phénotype, passant d'un état quiescent à un état contractile indispensable à la mise en route du travail. Cette transition phénotypique du myomètre semble coïncider avec une activation apoptotique [99].

Chez la femme, Charpigny *et coll.* [100] ont montré que la parturition est caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire ainsi que par une induction des gènes de l'inflammation, de l'apoptose et de la contraction. D'autres études de génomique fonctionnelle ont montré que l'expression génique associée au travail varie en fonction du segment utérin étudié [101, 102]. Ainsi, dans le fundus, l'expression des gènes inhibiteurs de l'apoptose est diminuée tandis que dans le segment antérieur et le col utérin, c'est l'expression des gènes de la prolifération et de l'apoptose cellulaires qui diminue [101]. Ces données suggèrent une coordination des modifications structurales et fonctionnelles des différents segments du myomètre, à l'origine des événements indispensables à la mise en route du travail.

Une activation transitoire des caspases concomitante à une transition du statut phénotypique utérin a été mise en évidence chez la rate gestante [99]. D'après Shynlova *et coll.* [99], cette activation des caspases ne serait pas impliquée dans l'apoptose des cellules myométriales mais constituerait plutôt un signal de différenciation de l'utérus de l'état prolifératif vers l'état contractile. Néanmoins, des signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose ont été mis en évidence dans l'utérus de rate en fin de gestation ainsi que dans des biopsies myométriales de

femmes en travail [103, 104]. L'apoptose myométriale est également impliquée dans le processus d'involution utérine [105].

Notre équipe a rapporté que l'inflammation survenant lors d'une chorioamniotite est associée à une apoptose des cellules myométriales mise en évidence par une surexpression de la caspase-3 clivée et de BAX (Bcl-2-Associated X protein) et une diminution de l'expression de BCL2 (B-Cell Lymphoma 2) [106]. Par ailleurs, Leroy *et coll.* [107] ont montré que l'apoptose des cellules myométriales pouvait être causée par le TNF α sécrété par les membranes fœtales en réponse à une stimulation par du LPS. Ces études confirment le rôle de l'inflammation et notamment du TNF α dans le processus apoptotique des cellules myométriales [106, 107].

3.2. Les contractions utérines

Le déclenchement des contractions utérines résulte de l'expression de protéines associées aux contractions (CAPs = Contraction-Associated Proteins). Parmi elles, on retrouve les récepteurs à l'ocytocine et à la prostaglandine F2 α (PGF2 α) ainsi que la connexine-43 impliquée dans la formation des jonctions gap [108]. Les jonctions gap, ou communicantes, sont formées par des canaux intercellulaires reliant le cytoplasme de deux cellules et permettant un couplage métabolique et électrique entre ces cellules. Au moment du travail, la formation de ces jonctions confère ainsi aux cellules myométriales la capacité de se contracter de façon synchrone.

Pendant la grossesse, la progestérone contribue au maintien de la grossesse, en favorisant la relaxation utérine. L'activation par la progestérone de l'isoforme PR-B de son récepteur réprime l'expression de gènes codant pour les CAPs, diminuant ainsi leur expression (Figure 5) [108]. La sensibilité du myomètre à ces molécules impliquées dans la contraction utérine est réduite, favorisant ainsi la relaxation utérine. De plus, la progestérone inhibe l'expression des récepteurs aux œstrogènes ER α , dont l'activation stimule l'expression des CAPs (Figure 5). Cependant, le récepteur à la progestérone possède une autre isoforme PR-A dont l'activation inhibe l'activité de PR-B (Figure 5). Pendant la grossesse, l'isoforme PR-B est majoritairement exprimée au sein du myomètre de telle sorte que le ratio PR-A/PR-B est de 0,5 à la 30^{ème} SA [108].

Le déclenchement des contractions utérines est associé à une baisse des effets de la progestérone et une augmentation des effets des œstrogènes. Contrairement à de nombreux modèles animaux, aucune variation du taux de ces hormones n'a été observée chez la femme en travail. Il semblerait plutôt que les contractions utérines soient déclenchées par une moindre sensibilité du

myomètre à la progestérone. En effet, le ratio PR-A/PR-B dans le myomètre est égal à 1 avant la mise en route du travail, et voit sa valeur tripler au moment du travail [108]. A terme, la progestérone activerait les isoformes PR-A, plus nombreuses, qui inhibent l'activité des isoformes PR-B, permettant ainsi l'expression des CAPs nécessaires à la contractilité utérine (Figure 5) [108].

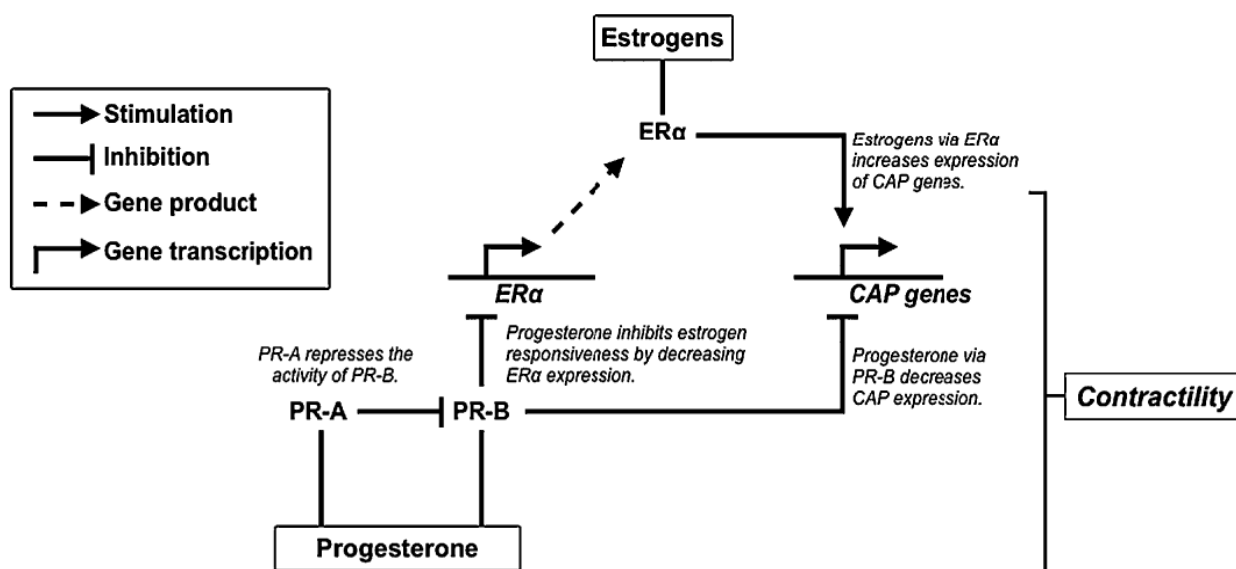


Figure 5 : Effets de la progestérone au niveau myométrial [108].

La parturition est donc associée à une augmentation de la sensibilité du myomètre aux prostaglandines (PG) et à l'ocytocine.

Les PGE2 et PGF2α, principales prostaglandines stimulantes, sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique via la cyclo-oxygénase (COX) dont il existe 2 isoformes : la COX-1 constitutive et la COX-2 induite par les médiateurs de l'inflammation [109].

La régulation du métabolisme de l'acide arachidonique semble essentielle à la mise en route du travail. De nombreux travaux ont démontré une augmentation des taux de prostanoïdes, notamment PGE2 et PGF2α, dans les tissus utérins au moment du travail [110, 111] et dans le liquide amniotique juste avant la mise en route du travail [112, 113].

La production de PG par les cellules amniotiques, choriales, déciduales et myométriales est stimulée par l'IL-1β et le TNFα [114-118] et résulte en partie d'une surexpression de COX-2 [119]. D'autres cytokines pro-inflammatoires et chémokines telles que l'IL-6 et MCP-1 stimulent également la production des PG par les membranes fœtales [120, 121].

Parallèlement à une action sur leur synthèse, la régulation des PG peut également s'exercer *via* une action sur leur catabolisme. En effet, l'expression de la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase, enzyme responsable du catabolisme des PG, dans les membranes fœtales est diminuée au moment du travail [122], mais également en cas de stimulation de ces tissus par l'IL-1 β et le TNF α [123, 124]. Cette diminution est partiellement antagonisée par l'IL-10 [125].

L'ocytocine est une hormone hypothalamique impliquée dans le déclenchement des contractions utérines, ce qui explique l'utilisation thérapeutique de l'hormone de synthèse dans l'insuffisance contractile utérine et celle d'un antagoniste de son récepteur, l'atosiban, dans la menace d'accouchement prématuré.

Les récepteurs à l'ocytocine sont présents dans les tissus gestationnels à l'exception du placenta [126]. Leur expression myométriale varie avec l'âge gestationnel mais pas avec la mise en route du travail. En effet, Wathes *et coll.* [126] ont montré une augmentation de l'expression génique de ces récepteurs dans le myomètre après 37 SA par rapport à du tissu prélevé entre 24 et 36 SA, et n'ont montré aucune variation de cette expression dans les tissus provenant de femmes en travail ou non en travail. Dans les membranes fœtales, la parturition est associée à une augmentation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine [127].

L'ocytocine stimule les contractions utérines soit de façon directe car l'activation du récepteur à l'ocytocine entraîne une entrée de calcium dans les myocytes [128], soit de façon indirecte par stimulation de la COX-2 et de la sécrétion des prostaglandines contractiles par les membranes fœtales et les cellules myométriales [127, 129]. L'IL-1 β est capable d'augmenter l'expression des récepteurs à l'ocytocine dans le myomètre et les membranes fœtales [127, 130].

A l'approche du terme, les tissus gestationnels subissent un remodelage intense indispensable au bon déroulement de l'accouchement, se traduisant par la rupture des membranes fœtales, la dilatation cervicale et l'apparition de contractions utérines synchrones. Ce remodelage et le déclenchement des contractions utérines sont des phénomènes stimulés par les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β et le TNF α et peuvent donc se produire de façon prématurée en réponse à une inflammation pathologique dans un contexte infectieux.

III. La leptine et ses récepteurs

1. La leptine

1.1. Le gène codant pour la leptine

En 1994, l'étude de modèles animaux d'obésité a permis la découverte du gène murin *Ob* (*obese*) codant pour la leptine et de son homologue humain par clonage positionnel [131]. Aussi appelé gène de l'obésité, le gène *Ob* est localisé sur le chromosome 6 chez la souris et sur le chromosome 7 chez l'homme [132]. Il mesure 650 kilobases réparties en trois exons séparés par deux introns et la région codante pour la leptine se situe dans les exons 2 et 3. L'étude des régions promotrices du gène a permis de mettre en évidence des éléments de régulation tels que l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE = cAMP Responsive Element), aux glucocorticoïdes (GRE = Glucocorticoïde Responsive Element) et des sites de fixation pour les facteurs de transcription C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) et SP-1 (Specificity Protein-1). Le facteur PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) semble réguler négativement la transcription du gène de la leptine en inhibant l'activation du facteur C/EBP α [132, 133].

1.2. Structure

La leptine est une protéine de 16 kDa formée de 167 acides aminés (aa). Plus de 67% de sa séquence peptidique est conservée entre les différentes espèces étudiées à ce jour. La leptine humaine possède un taux d'homologie de 84 % et 83 % avec la leptine de souris et de rat, respectivement [132]. Elle est formée de quatre hélices alpha antiparallèles caractéristiques de la famille des cytokines et possède également deux résidus cystéine formant un pont disulfure, crucial pour son intégrité structurale et sa stabilité (Figure 6) [134]. La région responsable de l'activité biologique de la leptine se situe entre les résidus 106 et 140. Elle a été identifiée en étudiant le poids et la consommation de nourriture de souris déficientes en leptine, après injection de peptides de synthèse correspondant à différentes régions de la leptine [135].

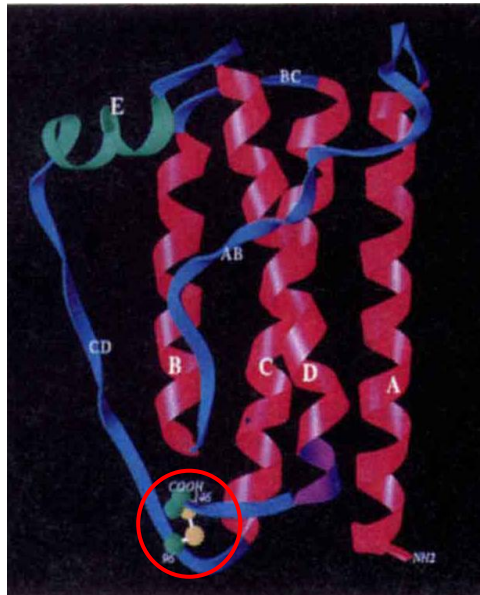


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la leptine, caractérisée par quatre hélices alpha (en rouge), connectées par trois boucles (en bleu) et une petite hélice supplémentaire (en vert) dans la boucle CD. Le pont disulfure (cercle rouge) se situe entre la boucle CD et l'extrémité carboxy-terminale [134].

1.3. Fonctions

Du grec *leptos* signifiant maigre, la leptine a pour rôle principal la régulation de la balance énergétique et du poids corporel [132, 133]. Reflet de l'état des réserves énergétiques, elle communique avec le système nerveux central afin d'ajuster l'apport alimentaire et les dépenses énergétiques en conséquence. Son principal site d'action est l'hypothalamus, territoire cérébral renfermant les centres de la satiété et de la faim [136].

Cependant, la vision initiale de la leptine comme cytokine adipocytaire régulant la balance énergétique au niveau central a largement évolué depuis sa découverte. En effet, les profils d'expression de la leptine et de son récepteur ont été étendus à divers tissus périphériques et les phénotypes observés chez les souris déficientes en leptine ou en son récepteur ont guidé l'investigation des actions physiologiques de la leptine. Ainsi, la leptine serait impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme glucidique et lipidique, la reproduction, la réponse immunitaire, l'homéostasie du tissu osseux et vasculaire (Figure 7) [136].

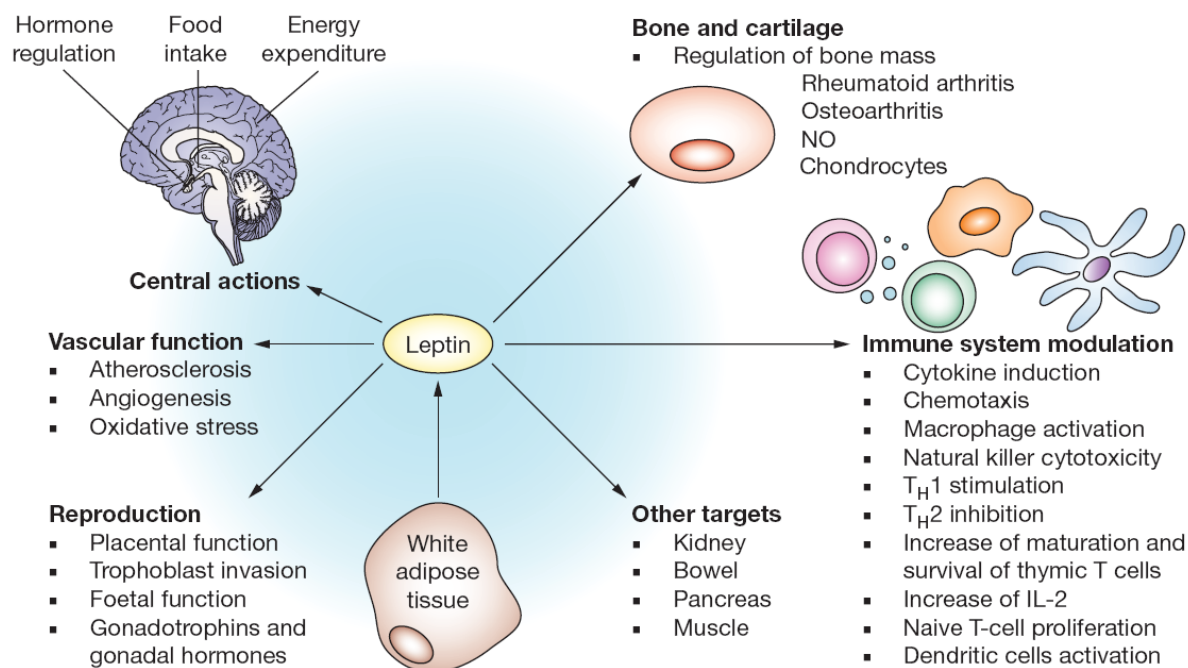


Figure 7 : Multiplicité d'actions de la leptine [136]

1.4. Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine

Initialement mise en évidence au niveau des adipocytes du tissu adipeux, il est maintenant établi que la leptine est également synthétisée par de nombreux tissus et organes, tels que le muscle squelettique, l'épithélium mammaire, la muqueuse gastrique et les trophoblastes placentaires [131, 132].

La sécrétion plasmatique de leptine est corrélée à la taille du tissu adipeux, reflétant ainsi l'état des réserves énergétiques. En effet, dans les modèles murins et humains, l'obésité est associée à une élévation du taux plasmatique de leptine, tandis qu'une perte de poids liée à une restriction alimentaire est associée à une baisse de ce taux [137].

La sécrétion de leptine est également influencée par le statut nutritionnel, et cette régulation dépend de l'espèce considérée. En effet, la concentration plasmatique de leptine augmente après un repas unique chez les rongeurs tandis qu'elle n'augmente qu'après plusieurs jours de suralimentation chez l'homme. Dans le cas contraire, le jeûne entraîne en quelques heures une baisse du taux de leptine dans les deux espèces, et celui-ci est rétabli par la ré-alimentation [132]. Ces observations suggèrent que la leptine est un indicateur de l'état des réserves énergétiques ainsi qu'un régulateur de la balance énergétique, et non un signal de satiété postprandiale.

Au niveau adipocytaire, la sécrétion de leptine n'est pas continue mais pulsatile, caractérisée par des pics de sécrétion de faible amplitude mais de fréquence élevée et positivement corrélée à l'IMC [138]. Les glucocorticoïdes, l'œstradiol et l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) augmentent la synthèse et la sécrétion de leptine tandis que la stimulation β -adrénergique et l'exposition au froid la diminuent. De plus, la synthèse de leptine est stimulée par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IL-1}\beta$ et le LIF (Leukemia Inhibitory Factor), pouvant expliquer la perte de poids observée lors de réactions infectieuses ou inflammatoires [132].

2. Les récepteurs à la leptine

2.1. Le gène codant pour les récepteurs

En 1995, soit un an après la découverte de la leptine, Tartaglia *et coll.* [139] ont identifié le gène *db* (*diabetes*) codant pour le récepteur à la leptine (OB-R) à partir de plexus choroïdes murins. Situé sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 1 chez l'homme, ce gène code pour plusieurs isoformes du récepteur issues d'un épissage alternatif.

2.2. Structure des récepteurs

Le récepteur à la leptine appartient à la superfamille des récepteurs aux cytokines de classe I, bien que sa structure ne présente que 24% d'homologie avec celle des récepteurs aux cytokines. En effet, il possède le motif peptidique Trp-Ser-X-Trp-Ser et des domaines fibronectine de type III, caractéristiques de cette famille de récepteur [139].

Le récepteur à la leptine est un récepteur transmembranaire, constitué d'un domaine extracellulaire de plus de 800 aa, d'un domaine membranaire unique de 34 aa et d'un domaine intracellulaire dont la taille diffère selon les isoformes (Figure 8).

A l'heure actuelle chez l'humain, cinq isoformes du récepteur ont été dénombrées et réparties en trois catégories distinctes : l'isoforme longue (OB-RL), trois isoformes courtes (OB-RS) et une isoforme soluble (OB-Rsol) [140-142].

Chez la souris et le rat, on dénombre une isoforme longue (OB-Rb), trois isoformes courtes (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd) et une isoforme soluble (OB-Re). Une isoforme courte supplémentaire (OB-Rf) a été mise en évidence chez le rat [132].

2.2.1. L'isoforme longue OB-RL

L'isoforme longue OB-RL possède un domaine intracellulaire complet formé de 302 résidus (Figure 8). Etant donné que la mutation de cette isoforme chez les souris db/db et les rats Zucker conduit à l'obésité, ceci suggère le rôle prépondérant de ce récepteur dans les mécanismes de couplage à la leptine. En effet, OB-RL est dite « fonctionnelle » car son domaine intracellulaire contient les motifs permettant l'activation de toutes les voies de signalisation décrites comme étant couplées au récepteur [139].

2.2.2. Les isoformes courtes OB-RS

Obtenues par épissage alternatif, les isoformes courtes possèdent un domaine intracellulaire de taille réduite, formé de 30 à 40 résidus (Figure 8). Chez l'homme, les 3 isoformes courtes sont désignées B219.1, B219.2 et B219.3 [140, 143]. Ne possédant pas les motifs intracellulaires nécessaires à l'activation de certaines voies de signalisation couplées à OB-RL, elles étaient initialement considérées comme non fonctionnelles. Cependant, il est maintenant établi que ces isoformes courtes possèdent des capacités de signalisation réduites [144]. Il semblerait qu'elles participent au passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) [145].

2.2.3. L'isoforme soluble

Cette isoforme, ne possédant ni domaine transmembranaire, ni domaine intracellulaire, représente la principale protéine plasmatique de liaison de la leptine (Figure 8) [146]. En effet, la majorité de la leptine circulante se trouve sous forme liée à des protéines plasmatiques. Elle permet également d'assurer le transport plasmatique de la protéine et de réguler la proportion de leptine libre dans le plasma, contrôlant ainsi son activité biologique.

Alors que l'ARNm codant l'isoforme soluble a été identifié chez la souris et le rat, aucun ARNm correspondant n'a été mis en évidence chez l'homme. Cependant, cette isoforme est bien présente dans le plasma humain et résulterait du clivage des récepteurs transmembranaires après fixation de la leptine [147].

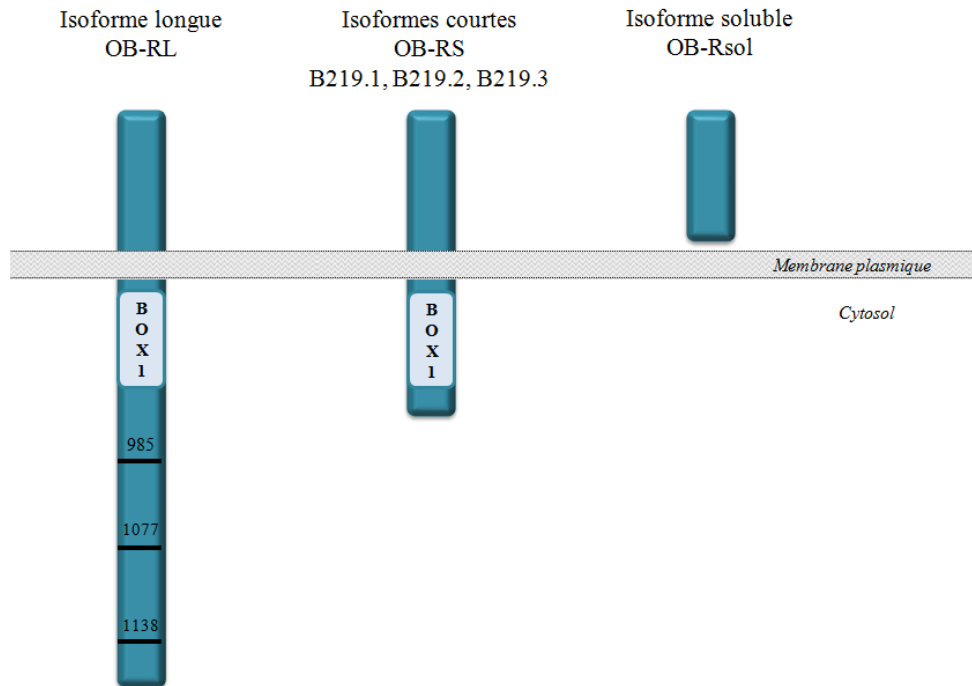


Figure 8 : Les différentes isoformes du récepteur à la leptine chez l'humain (d'après [142]).

2.3. Distribution tissulaire des récepteurs

Initialement, l'expression de OB-RL n'a été démontrée qu'au niveau central chez le rat et l'homme, notamment au niveau de l'hypothalamus, site d'action majeur de la leptine. Les isoformes courtes du récepteur ont également été identifiées au niveau des micro-vaisseaux cérébraux des deux espèces, renforçant l'hypothèse de leur implication dans le transport de la leptine à travers la BHE [146]. Les isoformes courtes et longue du récepteur à la leptine ont ensuite été mises en évidence dans de nombreux tissus périphériques. Cette distribution ubiquitaire suggère une grande diversité des fonctions de la leptine et des processus biologiques qu'elle régule [146, 148].

2.4. Voies de signalisation intracellulaires couplées aux récepteurs à la leptine

L'appartenance du récepteur à la leptine à la superfamille des récepteurs aux cytokines de classe I a permis une identification rapide de ses propriétés d'activation et de signalisation.

2.4.1. Dimérisation du récepteur

La fixation de la leptine sur son récepteur, selon une stœchiométrie 1:1, entraîne la formation d'homodimères indispensables à l'activation du récepteur. En présence de leptine, des hétérodimères peuvent également se former mais leur capacité à activer les voies de signalisation couplées aux récepteurs à la leptine reste à démontrer [148].

2.4.2. Internalisation du récepteur

Après fixation de la leptine sur son récepteur, ce dernier est internalisé à partir de structures membranaires spécialisées, « les puits recouverts de clathrine ». Les récepteurs endocytés peuvent alors être recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés. Dans des conditions standards, seulement 5% à 25% des récepteurs à la leptine sont présents dans la membrane plasmique, la majorité étant regroupée au niveau intracellulaire. De plus, il semblerait que ce phénomène d'internalisation intracellulaire soit plus important pour OB-RL et que le recyclage vers la membrane plasmique se fasse plus rapidement pour OB-RS [148].

2.4.3. Les voies de signalisation

2.4.3.1. La voie JAK/STAT (Figure 9)

A l'instar des récepteurs aux cytokines, OB-R ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Son activation n'est donc possible que par l'intermédiaire de protéines à activité tyrosine kinase telles que les JAKs (Janus Kinases) dont il existe quatre isoformes [JAK1, 2, 3 et TYK2 (tyrosine kinase)]. Il a été montré que JAK1 et JAK2 interagissent avec OB-R par l'intermédiaire de séquences conservées appelées Box 1 et Box 2. Dans les conditions physiologiques, seule JAK2 semble être activée par la fixation de la leptine sur OB-RL et OB-RS. Box 1 est une séquence très conservée, riche en proline, indispensable à l'activation de

JAK2 (Figure 9). Box 2, plus variable et présente uniquement sur OB-RL, permettrait une activation maximale des JAKs [146].

Une fois activée, JAK2 s'auto-phosphoryle et phosphoryle trois résidus tyrosine, Y⁹⁸⁵, Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸, présents uniquement sur OB-RL (Figure 9). Chaque tyrosine phosphorylée permet le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques possédant un domaine « Src-like Homology 2 » (SH2) et ainsi l'activation des voies de signalisation. La protéine JAK2 activée peut également recruter directement les protéines adaptatrices. Elle joue donc un rôle majeur dans la signalisation induite par la leptine, en activant les différentes voies de transduction du signal soit de manière directe soit *via* les résidus phosphorylés du récepteur [146].

Au nombre de sept, les protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) sont des facteurs de transcription activés par l'ensemble des cytokines. Bien que OB-RS et OB-RL puissent activer JAK2, seule OB-RL, comprenant les sites de liaison pour les facteurs STAT, peut activer entièrement la voie JAK/STAT. Les protéines STAT sont recrutées au niveau des tyrosines phosphorylées Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸ présentes sur OB-RL *via* leur domaine SH2 et sont activées par auto-phosphorylation. Une fois activées, les STAT s'assemblent en dimères et sont transloquées dans le noyau. Elles stimulent alors la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaires (Figure 9) [146].

Parmi les membres de la famille STAT, plusieurs peuvent être recrutés par OB-RL. La co-expression de chaque protéine STAT avec OB-RL a révélé que seules STAT3, STAT5 et STAT6 sont activées par la leptine. Tandis que STAT5 est recrutée par Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸, STAT3 n'est recrutée que par Y¹¹³⁸ [146]. Les souris Y1138S, exprimant un récepteur OB-RL muté pour la tyrosine 1138 et incapable de recruter STAT3, sont obèses et insulino-résistantes. Ces données montrent d'une part que STAT3 régule la transcription des gènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel et d'autre part, qu'elle participe aux mécanismes de protection contre le développement de l'obésité. Contrairement aux souris db/db, les souris Y1138S ne présentent pas de troubles de la reproduction ce qui rend compte de l'importance des voies de signalisation autres que la voie JAK/STAT [149].

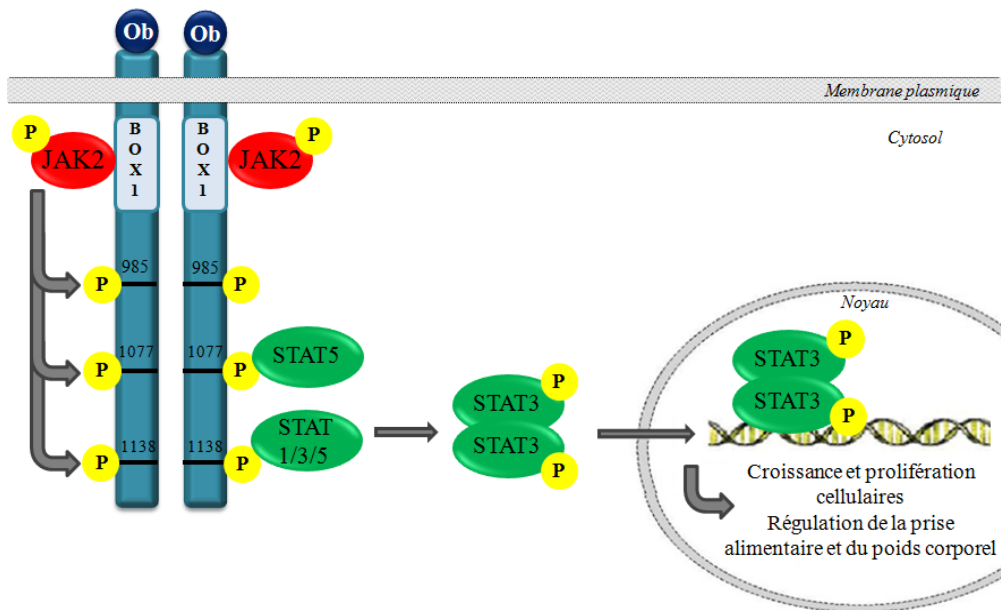


Figure 9 : La voie de signalisation JAK/STAT couplée à OB-RL (d'après [146]).

2.4.3.2. La voie des MAPK (Figure 10)

Les protéines de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) forment une véritable cascade de signalisation activée entre autres par les cytokines. Cette voie est activée par la leptine *via* OB-RL et dans une moindre mesure *via* OB-RS [144].

La stimulation de OB-RL par la leptine entraîne le recrutement de JAK2 puis la phosphorylation du récepteur au niveau de la tyrosine Y⁹⁸⁵, permettant l'activation de la protéine SHP-2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase). Ne possédant aucun site de phosphorylation Y⁹⁸⁵, les isoformes courtes OB-RS activent la protéine SHP-2 directement *via* JAK2 [146]. Ensuite, quelle que soit l'isoforme du récepteur, SHP-2 recrute la protéine adaptatrice Grb-2 (Growth factor receptor binding protein) qui active ensuite la protéine SOS (Son of Sevenless), activant à son tour la protéine Ras, déclencheur de la cascade des MAPK (Figure 10) [146].

L'activation consécutive de Ras, Raf, MEK1/2 (MAPK kinase) puis de ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase) conduit à sa translocation nucléaire afin de réguler l'expression de gènes cibles tels que *c-fos* et *egr-1* impliqués dans les phénomènes de prolifération et différenciation cellulaires. A l'instar des cytokines, la leptine est capable d'activer les protéines p38MAPK et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), impliquées dans des phénomènes de stress cellulaire (Figure 10) [146].

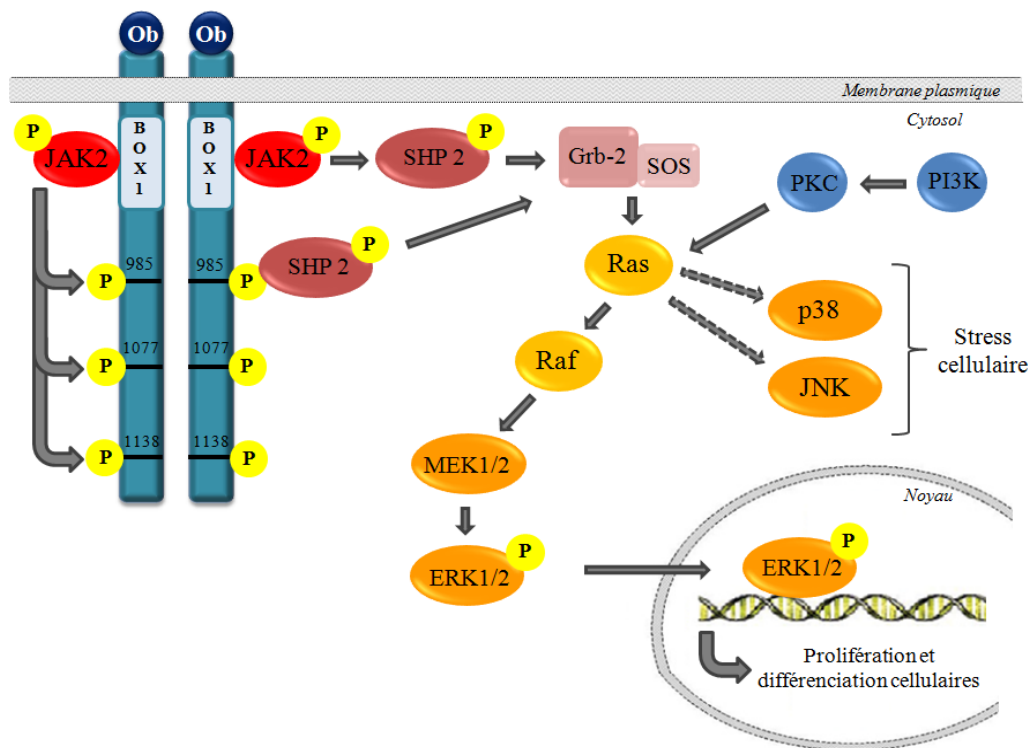


Figure 10 : La voie de signalisation MAPK couplée à OB-R (d'après [146]).

2.4.3.3. La voie IRS/PI3K (Figure 11)

La fixation de la leptine sur son récepteur active les protéines IRS1 et IRS2 (Insulin Receptor Substrate) par interaction avec JAK2, permettant ainsi une activation aussi bien par OB-RL que OB-RS [144, 146]. Une fois activées, les protéines IRS-1/2 stimulent l'activité de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) qui va phosphoryler les phosphatidylinositols de la membrane plasmique pour générer le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Le PIP3 sert alors de substrat à la PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase-1) qui active à son tour les protéines kinases B (PKB ou AKT) et C (PKC) (Figure 11) [146].

AKT est la protéine majeure de la voie de signalisation IRS/PI3K et est impliquée principalement dans des phénomènes de prolifération, de croissance et de survie cellulaires via l'activation de protéines telles que mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin), NFκB et BCL2 [150, 151]. AKT exerce également des effets métaboliques en inhibant la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques (via l'activation de la phosphodiesterase 3B (PDE3B)) et le stockage de glycogène (via la phosphorylation de glycogène synthase kinase (GSK3)). Dans l'hypothalamus de rat, l'utilisation d'un inhibiteur de la PDE3B reverse l'action de la leptine sur

la prise alimentaire et le poids et empêche l'activation et l'action de STAT3. Ceci indique le rôle prépondérant de ces deux voies dans les effets hypothalamiques de la leptine. De plus, AKT stimule la NO synthase endothéliale (eNOS) augmentant ainsi la production de monoxyde d'azote (NO) et induisant les effets vasorelaxants de la leptine (Figure 11) [146].

Les effets de l'activation de la PI3K sur la PKC, consécutivement à la fixation de la leptine sur son récepteur sont moins clairs. Différentes études ont montré que la leptine possède selon les conditions, un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activation des différentes isoformes de la PKC [146]. Enfin, une étude réalisée sur des cellules musculaires murines a montré un lien entre les voies IRS/PI3K et MAPK *via* la PKC (Figure 11) [146].

Par ailleurs, l'activation de la voie IRS/PI3K par la leptine entraîne l'ouverture de canaux potassiques ATP-dépendants entraînant une hyperpolarisation cellulaire à l'origine d'une inhibition de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques ou encore d'une modification de l'excitabilité des neurones hypothalamiques gluco-sensibles [146].

Ainsi, la voie IRS/PI3K joue un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire aux niveaux central et périphérique. De plus, il semblerait qu'elle intervienne également dans les effets délétères de la leptine sur le système reproducteur. En effet, des souris IRS2^{-/-}, déficientes en protéine IRS2, présentent une obésité et une hyperleptinémie, associées à des troubles de la reproduction [152].

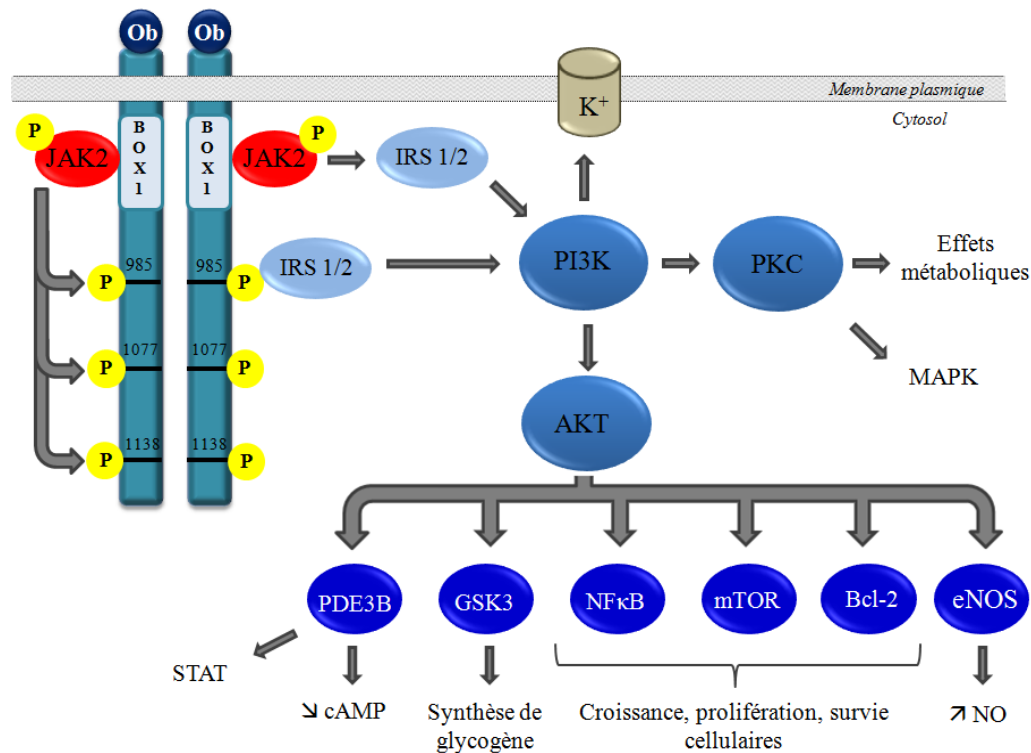


Figure 11 : La voie de signalisation IRS/PI3K couplée à OB-R (d'après [146]).

2.4.3.4. Autre voie de signalisation activée par la leptine

La leptine peut activer l'AMPK (5'-AMP-Activated Protein Kinase), une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire, en cas de déficit énergétique, et qui stimule notamment l'oxydation des acides gras et l'entrée du glucose dans la cellule. L'AMPK joue également un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire au niveau hypothalamique [146].

2.5. Régulation des voies de signalisation

2.5.1. Suppressor of Cytokine Signalling-3

Les protéines SOCS (Suppressor of Cytokine Signalling) sont les acteurs d'une boucle de rétro-contrôle négatif induite par de nombreuses cytokines [153].

La protéine SOCS-3 est synthétisée *via* STAT3 en réponse à la stimulation de OB-RL par la leptine. Sa fixation sur les résidus tyrosine du récepteur et sur JAK2 inhibe la phosphorylation de ces sites et l'activation de JAK2 [146]. Dans une lignée cellulaire hépatique, il est décrit que la surexpression de SOCS-3 réduit la phosphorylation de ERK1/2 et de AKT, inhibant ainsi

l'activation des voies de signalisation correspondantes [154]. Ainsi, la leptine induit la synthèse de SOCS-3 *via* la voie JAK/STAT afin de prévenir l'activation excessive de son récepteur.

2.5.2. Protein Tyrosine Phosphatase 1B

Comme SOCS-3, la PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) est un régulateur négatif *in vitro* et *in vivo* de la signalisation induite par la leptine. Sa cible principale est JAK2 dont elle inhibe l'activation [146].

3. Effets de la leptine sur les mécanismes impliqués dans l'accouchement

3.1. Effets de la leptine sur la prolifération et l'apoptose

La leptine possède des effets anti-apoptotiques et prolifératifs qui ont souvent été mis en évidence conjointement dans de nombreux tissus. Ainsi, Magariños *et coll.* [155] ont démontré les propriétés anti-apoptotiques et prolifératives de la leptine sur deux lignées de cellules de choriocarcinomes. Dans cette étude, l'apoptose des cellules trophoblastiques, induite par l'inactivation du gène de la leptine dans les cellules est réversée par ajout de leptine dans le milieu de culture [155]. Une concentration de leptine comprise entre 50 et 250 ng/ml augmente le nombre total de cellules et stimule certaines étapes du cycle cellulaire, notamment la phase de réplication et la transition G0/G1 *via* respectivement, l'augmentation du taux d'incorporation cellulaire de thymidine tritiée et l'expression de la cycline D1, protéine de régulation du cycle cellulaire [155]. De plus, les auteurs montrent que la leptine endogène synthétisée par les cellules trophoblastiques participe à la prolifération cellulaire. En effet, l'inactivation du gène de la leptine réduit de plus de 50% le nombre total de cellules et l'incorporation de thymidine tritiée, dont les taux sont restaurés par ajout de 100 ng/ml de leptine [155].

Ces propriétés ont également été démontrées dans d'autres types de cellules cancéreuses tels que des lignées cellulaires de lymphomes et de carcinomes hépatiques, mammaires et endométriaux [156-159]. Certains auteurs démontrent que les trois voies de signalisation de la leptine sont impliquées dans la prolifération des carcinomes hépatiques et endométriaux [156, 157], tandis que d'autres ne montrent l'implication que d'une seule voie. La prolifération des cellules de carcinomes mammaires, de choriocarcinomes et de lymphomes non-hodgkiniens mettent en jeu respectivement la voie JAK/STAT, ERK1/2 et PI3K/AKT [158-160]. Les différences observées dans l'activation des voies de signalisation peuvent dépendre du tissu considéré mais aussi des différentes voies étudiées.

3.2. Effets de la leptine sur le remodelage de la matrice extracellulaire

L'effet de la leptine sur les MMP varie selon les tissus. Dans des cultures primaires de cellules endométriales, Quinton *et coll.* [161] n'ont montré aucun effet de la leptine sur la sécrétion de MMP2 et de MMP9. De plus, dans une lignée cellulaire de tumeur cérébrale, la leptine augmente l'expression de MMP13, sans induire celle de MMP2 et de MMP9 [162]. Inversement, d'autres auteurs ont montré que la leptine augmente l'expression, l'activité et/ou la sécrétion de MMP2 et de MMP9 dans des lignées cellulaires placentaires et cardiaques humaines, ainsi que dans des cellules rénales de rat [163-165]. Peu d'études rapportent un effet inhibiteur de la leptine sur l'expression des MMP. Sur une lignée de cellules hépatiques humaines, Cao *et coll.* [166] montrent que la leptine réprime l'expression génique et protéique de MMP1 *via* l'inhibition de l'activité de son promoteur génique. En outre, l'inhibition des MMP par la leptine peut résulter d'une augmentation de l'expression des TIMP. En effet, il a été montré que la leptine induit l'expression de TIMP1 dans des cellules hépatiques humaines et de TIMP2 dans des ovaires de rates [167, 168].

Par ailleurs, une augmentation de l'expression du collagène de type I en réponse à une stimulation par la leptine a été démontrée dans les cellules hépatiques humaines [169], ainsi qu'au niveau de la matrice extracellulaire cardiaque [170]. Ainsi, ces données suggèrent un rôle pro-fibrosant de la leptine au niveau hépatique et cardiaque, par excès de synthèse de collagène. Cependant, cet effet est controversé car l'étude de Madani *et coll.* [165] réalisée sur des cultures primaires de cardiomyocytes humains met en évidence une altération du profil de collagène (synthèse augmentée de collagène III et IV et diminuée de collagène I) sans diminution de la synthèse de collagène total.

3.3. Effets de la leptine sur la contractilité musculaire

L'étude *in vitro* des effets de la leptine sur la contractilité utérine a été réalisée sur des biopsies de myomètre prélevées chez des femmes accouchant par césarienne à terme [171]. Moynihan *et coll.* [171] ont montré que la leptine inhibe les contractions utérines, qu'elles soient spontanées ou induites par l'ocytocine. Cette inhibition s'exerce *via* une réduction de l'amplitude et de la fréquence des contractions myométriales [171].

De plus, d'autres études ont montré un effet relaxant de la leptine sur le muscle vasculaire et cardiaque [172-174], tandis qu'aucun effet n'a été montré sur la contractilité de biopsies trachéales bovines [175].

De par leur distribution ubiquitaire, la leptine et ses récepteurs sont présents dans de nombreux tissus et régulent de multiples processus tels que la prolifération, le remodelage cellulaire et tissulaire et la contractilité musculaire, impliqués entre autres dans la parturition.

4. Leptine et obésité

4.1. Mise en évidence expérimentale du rôle de la leptine dans l'obésité

L'étude des modèles d'animaux génétiquement obèses, notamment les souris « obese » (ob/ob) et « diabetes » (db/db) ont permis de mettre en évidence le rôle de la leptine dans les mécanismes de l'obésité. Ces deux souches de souris présentent le même phénotype caractérisé par une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et une obésité morbide, associées à des troubles métaboliques (Figure 12). Les expériences de parabiose (union chirurgicale avec circulation croisée de deux animaux) réalisées par Coleman à partir de ces deux modèles murins lui ont permis de conclure que les souris ob/ob ne produisent pas le facteur de satiété, tandis que les souris db/db le produisent mais y sont insensibles [176]. Il a été démontré plus tard que le gène *obese* (*ob*) code pour la leptine (Ob) et le gène *diabetes* (*db*) pour ses récepteurs (OB-R) [131, 177].

Chez les souris ob/ob, l'administration de leptine entraîne une perte de poids ainsi qu'une diminution de la masse grasse et de l'apport alimentaire. De plus, une thérapie génique par la leptine permet de corriger l'obésité et les troubles métaboliques associés [178].



Figure 12 : Souris obèse (ob/ob) déficiente en leptine à gauche comparée à une souris sauvage.

L'étude moléculaire du récepteur à la leptine chez les souris db/db a confirmé les hypothèses de Coleman. En effet, ces souris sont porteuses d'une mutation sur le gène *diabetes* codant pour les récepteurs à la leptine, exprimant donc un récepteur tronqué, incapable d'activer la voie de signalisation JAK/STAT, principalement impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel [177, 179, 180].

4.2. Déficit en leptine ou en ses récepteurs chez l'homme

L'étude de familles consanguines à forte prévalence d'obésité morbide a permis de découvrir des mutations du gène codant pour la leptine ou pour ses récepteurs.

Jusqu'à présent, 4 mutations du gène *ob* à l'origine d'un déficit congénital en leptine ont été rapportées [181]. Tous les patients touchés présentent un taux plasmatique de leptine extrêmement faible, voire indétectable, résultant d'une absence de sécrétion de la protéine. Sur le plan clinique, ils souffrent d'obésité morbide et d'hyperphagie dès leurs premières années de vie, associées à des troubles métaboliques, reproducteurs et immunitaires.

Le traitement substitutif à partir de leptine recombinante a entraîné une perte importante de poids et de masse grasse, débutant dans les deux semaines suivant l'instauration du traitement et se poursuivant régulièrement (Figure 13) [181]. Cependant, des épisodes de rechute avec reprise de poids précédée d'hyperphagie, coïncidant avec l'apparition transitoire d'anticorps neutralisant ont été notés et corrigés par augmentation de la dose de leptine administrée [181]. Par ailleurs, ce traitement a également permis la correction des troubles métaboliques et immunitaires ainsi que le développement de la puberté [181].

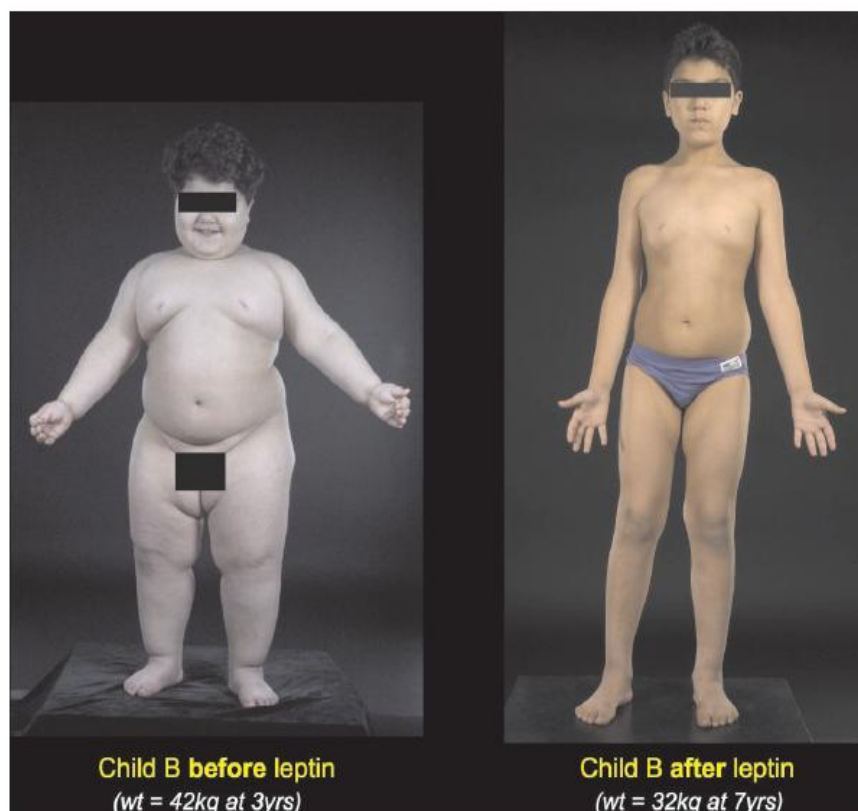


Figure 13 : Réponse clinique après traitement substitutif à base de leptine recombinante chez un enfant présentant un déficit congénital en leptine. A gauche, l'enfant à 3 ans pesant 42kg avant l'instauration du traitement. A droite, le même enfant après 4 ans de traitement [181].

A l'instar des mutations présentes dans le gène de la leptine, plusieurs mutations ont été décrites dans le gène codant pour ses récepteurs. Jusqu'à présent, 10 mutations du gène *db* ont été répertoriées [182-184]. Ces mutations conduisent à la synthèse d'un récepteur tronqué et inactif, ne possédant ni domaine transmembranaire, ni domaine intracellulaire. Les patients touchés présentent une obésité morbide débutant dans les premières années de vie ainsi qu'une hyperphagie, associées à des troubles reproducteurs et immunitaires. Les concentrations plasmatiques de leptine chez ces patients sont 6 à 10 fois supérieures à celles retrouvées chez les sujets d'IMC voisin [182]. Aucun traitement substitutif ne peut être envisagé chez ces patients, contrairement aux patients présentant un déficit congénital en leptine.

4.3. Surexpression de leptine et résistance à la leptine

Les formes les plus communes et les plus fréquentes d'obésité humaine ne sont pas associées à des mutations dans le gène de la leptine, hormis les rares cas précédemment cités [185]. Elles sont liées à une hyperleptinémie résultant d'une surexpression adipocytaire et conduisant au développement d'une résistance à la leptine.

4.3.1. Surexpression de leptine

L'obésité est associée à une surexpression adipocytaire de leptine (d'un facteur deux) à l'origine d'une élévation de son taux plasmatique, corrélées au pourcentage de graisse corporelle et à l'IMC [186, 187]. Les concentrations plasmatiques mesurées varient de 7,5 ng/ml chez les sujets de poids normal à 31,3 ng/ml chez les sujets obèses, et pouvant atteindre 52,7 ng/ml chez les sujets présentant une obésité morbide [187, 188].

4.3.2. Résistance à la leptine

Etant donné les effets anorexigènes de la leptine, l'hyperleptinémie observée chez les sujets obèses a conduit à l'hypothèse d'une résistance à la leptine.

Les expériences d'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses (DIO = Diet-Induced Obesity), entraînant le développement progressif de la maladie, ont permis de démontrer ce phénomène et d'en préciser la chronologie.

En effet, Lin *et coll.* [189] ont soumis des souris à un régime alimentaire pauvre (LFD = Low-Fat Diet) ou riche en graisses (HFD = High-Fat Diet) et ont étudié les effets d'injections

périphériques et centrales de leptine, par la mesure du poids et de la prise alimentaire de ces souris. Après une semaine, l'injection intra-péritonéale de leptine entraîne une baisse du poids et de la prise alimentaire des souris HFD et LFD [189]. A 8 semaines de régime, les souris HFD développent une résistance vis-à-vis de la leptine d'origine périphérique, tout en restant sensibles à une injection cérébrale de leptine. Après 19 semaines, ces souris deviennent également résistantes à la leptine d'origine centrale [189].

Le second résultat intéressant de cette étude est la diminution de l'apport alimentaire des souris HFD observée entre 4 et 8 semaines de régime, tandis que leur poids ne cesse d'augmenter. Les auteurs ont suggéré que cette hypophagie était la conséquence de l'effet anorexigène de la leptine afin de limiter la prise de poids [189].

Les causes et les mécanismes du développement de la résistance à la leptine sont encore mal définis et plusieurs hypothèses sont envisagées :

- ✓ Diminution du passage de la leptine à travers la BHE
- ✓ « Down-regulation » de l'expression des récepteurs hypothalamiques
- ✓ Défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques

4.3.2.1. Diminution du passage de la leptine à travers la BHE

Afin d'exercer ses effets hypothalamiques, le passage de la leptine à travers la BHE est indispensable et semble être assuré par l'isoforme courte du récepteur. Il a été montré que ce passage à travers la BHE est diminué de 2/3 chez des souris obèses DIO par rapport à des souris de poids normal [190]. Cette diminution persiste lors de l'utilisation d'un modèle de perfusion permettant de s'affranchir des taux plasmatiques de leptine des souris, en remplaçant le sang par une solution tamponnée contenant de faibles concentrations de leptine [190]. Le transport cérébral de la leptine étant un phénomène saturable, cette réduction peut être attribuée à la saturation du système de transport causée par l'hyperleptinémie observée chez les sujets obèses, mais également à un défaut du transporteur.

Cette hypothèse fut également démontrée chez l'homme par l'évaluation de l'efficacité du transport à travers la BHE grâce au ratio [concentration rachidienne de leptine] / [concentration sérique de leptine]. Plusieurs études ont montré une diminution de ce ratio traduisant un moindre transport de la leptine au niveau central chez les sujets obèses [191, 192]. Etant donné que les principaux effets de la leptine s'exercent au niveau central, la réduction de ses capacités de transport à travers la BHE pourrait être à l'origine de la résistance observée dans l'obésité.

4.3.2.2. « Down-regulation » de l'expression des récepteurs hypothalamiques

La résistance à la leptine peut également être la conséquence de la diminution de l'expression des récepteurs OB-R au niveau périphérique et central, et plus particulièrement OB-RL impliquée dans la régulation de la balance alimentaire. Dans une étude récente, Liu *et coll.* [193] ont montré une réduction de l'expression hypothalamique de OB-RS et OB-RL chez des rats obèses par rapport à des rats de poids normal. En outre, une relation négative a été mise en évidence entre la concentration plasmatique de leptine et l'expression des récepteurs [193]. Ce phénomène de résistance pourrait donc résulter de l'élévation de la leptinémie chez les sujets obèses. En effet, en cas d'obésité, la proportion de leptine libre circulante augmente alors que le taux de récepteur soluble diminue [194, 195]. Le ratio entre la leptine libre et son récepteur soluble est de 1:1 chez les sujets de poids normal, tandis qu'il s'élève à 25:1 en cas d'obésité morbide [196]. Ainsi, chez les sujets obèses, l'hyperleptinémie et la diminution du taux de récepteur soluble entraînent une saturation des protéines de transport plasmatique de la leptine. Il en résulte une élévation de la fraction biologiquement active de leptine, pouvant être à l'origine du développement de la résistance à la leptine par « down-regulation » de ses récepteurs.

4.3.2.3. Défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques

En 2000, El Haschimi *et coll.* [197] ont testé la capacité de la leptine à activer les récepteurs hypothalamiques OB-RL (*via* la phosphorylation de STAT3), dans un modèle murin d'obésité induite par une alimentation riche en graisses. Après 4 semaines de régime, l'activation hypothalamique de STAT3, évaluée par retard sur gel, en réponse à une administration intra-péritonéale de leptine est comparable chez les souris HFD et LFD. Après 15 semaines, l'administration intra-péritonéale de leptine n'entraîne plus d'activation hypothalamique de STAT3 chez les souris HFD, contrairement aux souris LFD [197]. Enfin, afin de savoir si ce défaut d'activation est lié à un défaut de signalisation du récepteur et/ou à une diminution du passage de la leptine à travers la BHE, la leptine est injectée directement au niveau cérébral. Dans l'hypothalamus des souris HFD, STAT3 est activée mais de façon sensiblement réduite par rapport aux souris LFD. Ces données confirment qu'en cas d'obésité, la réduction de l'activation de STAT3 résulte à la fois d'une diminution du passage de la leptine au niveau de la BHE et d'un défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques [197].

Etant donné que l'activation de OB-R est régulée négativement par SOCS-3 et PTP1B, le défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques pourrait également s'expliquer par une élévation de l'expression et/ou de l'activation de ces deux protéines régulatrices.

L'expression hypothalamique de SOCS-3 est augmentée chez des souris présentant une obésité associée à une résistance à la leptine [198]. De plus, plusieurs études menées sur des souris hétérozygotes (SOCS-3 ^{+/-}) ou déficientes (SOCS-3 ^{-/-}) pour SOCS-3 montrent une élévation de la sensibilité à la leptine et un moindre développement d'une obésité induite par l'alimentation [199, 200]. Ainsi, SOCS-3 a été identifié comme le médiateur principal de la résistance à la leptine en cas d'obésité. A l'instar des souris SOCS-3 ^{-/-}, les souris PTP1B ^{-/-} sont caractérisées par une sensibilité accrue à la leptine et à l'insuline ainsi que par une résistance à l'obésité [201, 202].

5. Leptine et grossesse

5.1. La leptine et ses récepteurs au cours de la grossesse

5.1.1. La leptine maternelle

Chez la femme enceinte, le taux plasmatique de leptine augmente graduellement tout au long de la grossesse (Figure 14) [203]. Dans les 24 heures suivant l'accouchement, la leptinémie chute brutalement pour revenir aux valeurs pré-conceptionnelles [204]. Ces variations ont été également été décrites chez le babouin et la rate gestantes [205, 206].

D'après Highman *et coll.* [207], la grossesse est associée à une augmentation de 66% du taux plasmatique de leptine ainsi qu'à une augmentation de 9% de la masse grasse. Cependant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les variations de ces deux paramètres au cours de la grossesse. En effet, 93% de l'augmentation des concentrations de leptine a lieu en tout début de grossesse au moment où survient une baisse de 3% de la masse grasse [207]. La masse grasse n'augmente qu'ultérieurement et n'est associée qu'à 7% de l'augmentation des concentrations de leptine [207]. Ces données suggèrent qu'au cours de la grossesse, la leptine est produite par un site supplémentaire et distinct du tissu adipeux. La chute immédiate de ses concentrations dans le post-partum [204] suggère que ce site de synthèse est le placenta.

Par ailleurs, il n'existe pas de corrélation entre la leptinémie maternelle et le poids de naissance ou la masse grasse du nouveau-né, soulignant l'absence de transfert de leptine maternelle vers le fœtus [208].

La leptinémie maternelle est corrélée avec l'IMC pré-conceptionnel quel que soit le terme de la grossesse [204]. Cependant, son augmentation au cours de la grossesse est plus faible chez les femmes obèses que chez les femmes de poids normal (Figure 14) [203].

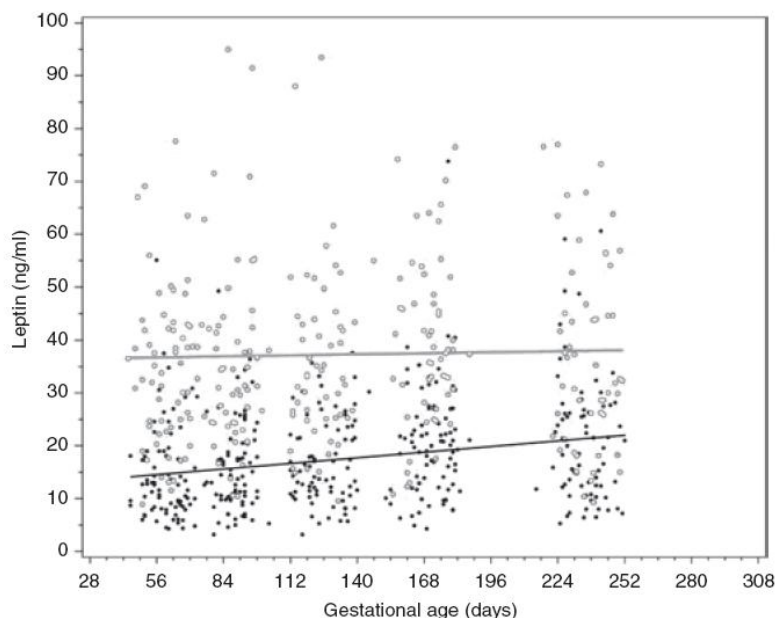


Figure 14 : Evolution de la leptinémie maternelle au cours de la grossesse chez des femmes en surpoids et obèses (en gris) et de poids normal (en noir), en début de grossesse [203].

5.1.2. La leptine placentaire

L'hypothèse d'une leptine placentaire fut confirmée par Masuzaki *et coll.* [209] qui ont démontré la synthèse de leptine par les cellules trophoblastiques. Contrairement à la leptinémie maternelle, l'expression placentaire de leptine diminue au cours de la grossesse. En effet, Henson *et coll.* [205, 210] ont démontré une diminution des transcrits d'ARNm de leptine entre le premier et le troisième trimestre de grossesse dans des tissus placentaires issus de babouins (60^{ème} vs 160^{ème} jour de gestation) et de femmes (7-14^{ème} SA vs 38^{ème} SA). Il semblerait donc que la leptinémie maternelle ne reflète l'expression génique placentaire de leptine qu'en début de grossesse. Malgré une expression génique placentaire diminuée, l'augmentation gestationnelle de la leptinémie maternelle pourrait être régulée par les hormones maternelles ou placentaires dont les taux varient au cours de la grossesse. En effet, Hardie *et coll.* [204] ont démontré une corrélation positive entre les concentrations de leptine et celles d'œstradiol et d'hCG. De plus, la sécrétion adipocytaire de leptine est augmentée par l'œstradiol et l'hCG [211].

La leptine est exprimée dans les cellules cyto- et syncytio-trophoblastiques, ces dernières étant situées à l'interface avec le sang maternel, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des capillaires fœtaux en contact direct avec le sang fœtal [212]. Cette localisation suggère une sécrétion de leptine placentaire dans les circulations maternelle et fœtale. Des études *in vitro* de perfusion placentaire ont permis de démontrer que 95% de la leptine placentaire est libérée dans la circulation maternelle et seulement 5% dans la circulation fœtale [213].

La leptine placentaire est identique à la leptine du tissu adipeux et synthétisée à des taux comparables dans les deux tissus [209]. Cependant, une séquence promotrice spécifique du gène de la leptine placentaire, « Placental Leptin Enhancer Element » (PLE3), a été identifiée, suggérant une régulation différente entre la leptine du tissu placentaire et celle du tissu adipeux [212]. Par exemple, la forskoline stimule l'expression placentaire de leptine tandis qu'elle la réprime dans le tissu adipeux [214].

Par ailleurs, l'obésité maternelle ne semble pas interférer avec la synthèse placentaire de leptine. En effet, Farley *et coll.* [215] n'ont montré aucune variation de l'expression de leptine entre des placentas issus de femmes de poids normal et obèses, à terme, après marquage immunohistochimique et quantification du signal observé.

5.1.3. La leptine fœtale

L'analyse de biopsies de tissu adipeux provenant de fœtus décédés *in utero* entre la 18^{ème} et la 38^{ème} SA a permis de démontrer une synthèse de leptine par l'adipocyte fœtal [216]. La leptine a été détectée dans les artères ombilicales dès la 18^{ème} SA et son taux augmente tout au long de la grossesse [217]. Il existe une forte corrélation entre la leptinémie ombilicale et la masse grasse fœtale ainsi qu'une corrélation plus faible avec le poids de naissance [208]. Ainsi, la leptine ombilicale apparaît comme un bon marqueur d'adiposité fœtale.

Outre sa production placentaire, la leptine est également synthétisée par les membranes fœtales [218]. Sécrétée par les cellules de l'amnios, son taux dans le liquide amniotique est de $3,6 \pm 0,8$ ng/ml et est positivement corrélé au taux de leptine maternelle avec un ratio constant de 1/4 [219].

5.1.4. L'expression des récepteurs à la leptine pendant la grossesse

Outre la synthèse de leptine, l'expression des isoformes longue et courtes de son récepteur, OB-RL et OB-RS, a également été mise en évidence dans du tissu placentaire murin, simien et humain [210, 220, 221]. Cependant, leur expression au cours de la grossesse varie selon l'espèce considérée. En effet, l'expression placentaire de OB-RL et OB-RS augmente au cours de la grossesse chez le babouin (x3 et x12 respectivement, [221]) tandis que seule celle de OB-RS est augmentée chez la rate (x4, [220]). Chez le babouin, l'augmentation de l'expression de OB-RS est également retrouvée dans la décidue et les membranes fœtales, d'un facteur 3,5 et 7, respectivement [221]. Au contraire, aucune variation de l'expression des récepteurs à la leptine au cours de la grossesse n'a été démontrée dans le placenta humain [210]. Cette différence peut s'expliquer par le faible effectif de l'étude puisque cinq échantillons placentaires ont été prélevés en début de grossesse (7-14 SA) et six ont été prélevés à terme (38 SA) [210].

Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont permis de localiser les récepteurs dans les syncytiotrophoblastes situés à l'interface maternelle [210, 222]. De plus, Akerman *et coll.* [218] ont montré que OB-RS est également exprimé dans les membranes fœtales alors que OB-RL est présent dans le cordon ombilical humain. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'expression placentaire de OB-RL, à terme, était diminuée dans des tissus placentaires issus de femmes obèses par rapport à ceux de femmes de poids normal [215]. Malheureusement, cette étude n'a pas évalué l'impact de l'obésité maternelle sur l'expression de OB-RS.

L'isoforme soluble du récepteur à la leptine a été détectée dans le cytotrophoblastes placentaires [222]. Sa présence tissulaire n'est pas aberrante puisque, chez l'Homme, sa formation résulterait du clivage des récepteurs transmembranaires après fixation de la leptine [147]. Les variations de l'expression plasmatique de l'isoforme soluble au cours de la grossesse diffèrent entre les espèces [221, 223]. En effet, Lewandowski *et coll.* [223] ont rapporté une diminution de son expression plasmatique chez la femme tandis qu'une expression augmentée a été décrite chez la femelle babouin gestante [221]. Quelle que soit l'espèce, l'augmentation de la leptinémie maternelle pendant la grossesse semble liée à une augmentation de la fraction liée de leptine plasmatique, aussi bien chez la femme enceinte [223] que chez la rate gestante [206]. Les conséquences de cette augmentation de la leptine liée sont une diminution de la clairance plasmatique en leptine et de son action suite à une distribution limitée aux tissus cibles.

Par ailleurs, plusieurs études menées chez le rat ont montré une diminution de l'expression hypothalamique et hypophysaire des récepteurs OB-RL ainsi qu'une réduction de l'activation de

STAT3 par la leptine dans les noyaux ventromédians pendant la gestation [224, 225]. Associées à une régularité, voire une augmentation de l'apport alimentaire, ces données suggèrent l'hypothèse de l'apparition d'un état de résistance centrale à la leptine au cours de la grossesse ou d'un détournement de son action vers d'autres cibles physiologiques.

En résumé, l'hyperleptinémie observée chez les femmes enceintes résulte, en début de grossesse, d'une synthèse placentaire de leptine. Associée à l'expression placentaire des récepteurs à la leptine, elle suggère un rôle important de cette adipokine au cours de la grossesse. A l'inverse, la leptinémie fœtale, représentée par sa concentration ombilicale, n'est pas corrélée à la production placentaire de leptine. Synthétisée par les adipocytes fœtaux, elle constituerait ainsi un marqueur d'adiposité fœtale.

5.2. Les rôles de la leptine pendant la grossesse

5.2.1. Le rôle de la leptine au niveau placentaire

L'expression placentaire de la leptine et de ses récepteurs sous-tend un mode d'action paracrine et/ou autocrine. De plus, la localisation des récepteurs à l'interface maternelle les rend accessibles à la leptine d'origine maternelle. Il est alors impossible de distinguer une action paracrine locale de la leptine placentaire d'une action endocrine de la leptine adipocytaire maternelle.

La corrélation entre les concentrations ombilicales de leptine et la taille du placenta suggère que la leptine interviendrait dans la croissance placentaire [219]. Ceci est étayé par les résultats de l'étude de Magariños *et coll.* [155] mettant en évidence les capacités prolifératives et anti-apoptotiques de la leptine sur des lignées de cellules trophoblastiques humaines. De plus, la leptine stimulerait l'angiogénèse placentaire, participant ainsi à la formation du placenta. Castellucci *et coll.* [163] ont montré l'implication de la leptine dans l'invasion trophoblastique de la décidue et du myomètre et le remodelage des artères spiralées maternelles. En effet, elle augmente l'expression et l'activité des MMP2 et MMP9 dans des lignées trophoblastiques humaines [163].

5.2.2. Le rôle de la leptine chez la mère

Le rôle de la leptine pendant la grossesse n'est pas entièrement élucidé. Pendant la grossesse, la femme enceinte doit maintenir une balance énergétique positive afin de fournir les substrats nécessaires à la croissance fœtale. Il paraît alors peu plausible que l'hyperleptinémie observée pendant la grossesse soit associée au rôle satiétogène de la leptine. En effet, l'injection centrale de leptine à des rates gestantes ne diminue pas l'apport alimentaire, contrairement à ce qui est observé chez des animaux non gestants [226]. De plus, l'absence d'augmentation des dépenses énergétiques renforcent l'hypothèse du développement d'un état de résistance à la leptine au cours de la grossesse [207].

Pendant la première moitié de la grossesse, les modifications du métabolisme maternel sont orientées vers le stockage lipidique. La fin de la grossesse correspond à une transition d'un état anabolique vers un état catabolique avec augmentation du taux d'acides gras libres et de glycérol circulant *via* l'activation de la lipolyse [227]. De par ses propriétés lipolytiques, il semblerait que l'hyperleptinémie maternelle favorise la mobilisation des substrats maternels et placentaires pour répondre à la demande énergétique du fœtus [208].

5.2.3. Le rôle de la leptine chez le fœtus

Etant donné la corrélation positive entre le taux de leptine ombilicale et le poids à la naissance d'une part et la masse grasse fœtale d'autre part [208], il semblerait que la leptine soit le reflet de la croissance du fœtus. De plus, une corrélation positive a été observée entre le taux de leptine ombilicale et celui d'hormones associées à la croissance intra-utérine telles que l'insuline et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) [228]. Chez la souris, la mise en évidence des récepteurs à la leptine dans différents tissus fœtaux suggère un ou plusieurs rôles de la leptine pendant la vie fœtale [229].

Cependant, les enfants nés avec un déficit congénital en leptine ou en ses récepteurs ont un poids de naissance normal [182, 230]. Des résultats similaires ont été observés chez les souriceaux déficients en leptine issus de souris ob/ob [231]. Ces données suggèrent que la leptine fœtale n'est pas indispensable au développement et à la croissance fœtale. Il semblerait que la leptinémie ombilicale soit un reflet plutôt qu'un déterminant de la croissance fœtale.

5.3. Pathologies de la grossesse et leptine

5.3.1. La grossesse molaire

Cette anomalie de la grossesse, touchant 1 grossesse sur 1000, est définie par une prolifération trophoblastique associée à une dégénérescence kystique des villosités placentaires. Une augmentation de la production placentaire de leptine à l'origine d'une hyperleptinémie maternelle ont été observées chez des femmes souffrant de grossesse molaire [232]. Chez ces patientes, la concentration plasmatique de leptine s'élevait à $63,8 \pm 14,2$ ng/ml contre $24,4 \pm 3,3$ ng/ml chez des femmes enceintes au premier trimestre de grossesse, après appariement sur l'âge et l'IMC, avant de revenir à une valeur normale 7 jours après le retrait du tissu molaire [232].

Etant donné l'expression placentaire de ses récepteurs, l'augmentation de la synthèse de leptine par les cellules trophoblastiques suggère une régulation locale de l'adipokine dans la physiopathologie de la mole hydatiforme. De par ses propriétés prolifératives démontrées sur des lignées de cellules trophoblastiques, la leptine pourrait entretenir ce phénomène [155]. Enfin, ces données suggèrent que la leptine pourrait être un marqueur utile dans le diagnostic et le suivi des grossesses molaires.

5.3.2. La pré-éclampsie

Lors des grossesses compliquées de pré-éclampsie, on observe une augmentation de la production placentaire de leptine résultant d'une augmentation de l'expression placentaire de l'ARNm de la leptine [233]. Les patientes pré-éclamptiques présentent également une élévation de la concentration plasmatique de leptine par rapport à des femmes ne souffrant pas de pré-éclampsie ($73,8 \pm 10,2$ ng/ml vs $35,5 \pm 3,0$ ng/ml, respectivement) [233]. Cette hyperleptinémie est la conséquence d'une production placentaire accrue de leptine, libérée à 95% dans la circulation maternelle. De plus, l'augmentation de la leptinémie maternelle est corrélée à la sévérité de la maladie [234]. Après l'accouchement, le taux plasmatique de leptine chez les femmes pré-éclamptiques diminue fortement, pour revenir à un taux correspondant à leur IMC [233]. Cette forte diminution survenant dans les 24 heures suivant l'accouchement confirme l'origine placentaire de l'hyperleptinémie maternelle chez ces patientes. Bien que les stimuli responsables de cette augmentation d'expression soient encore peu connus, l'hypoxie locale a été étudiée. *Mise et coll.* [233] ont montré une augmentation de la sécrétion de leptine par les cellules trophoblastiques soumises à des conditions d'hypoxie (5% O₂). Ces résultats suggèrent

que l'élévation de la leptinémie maternelle reflèterait l'hypoxie et/ou l'hypoperfusion placentaire et constituerait un bon marqueur de pré-éclampsie et/ou de sa sévérité [234].

Par ailleurs, en cas de pré-éclampsie, la leptinémie ombilicale est diminuée et est positivement corrélée au poids de naissance [235, 236]. Etant donné que la pré-éclampsie est associée à un retard de croissance intra-utérin, cette diminution serait le reflet de la diminution de la masse grasse fœtale. Ces données renforcent l'hypothèse présentant la leptine ombilicale comme le reflet de l'adiposité fœtale.

5.3.3. Le diabète

Chez les femmes souffrant d'un diabète insulino-dépendant ou gestationnel, on observe une augmentation de la production placentaire de leptine à l'origine d'une hyperleptinémie [237-239]. De plus, Qiu *et coll.* [239] ont mis en évidence une augmentation du risque de diabète gestationnel avec la concentration maternelle de leptine. Ainsi, une élévation de 10 ng/ml de la leptinémie maternelle est associée à une augmentation de 20% du risque de diabète gestationnel. En cas de diabète insulino-dépendant ou gestationnel, les concentrations ombilicales de leptine sont augmentées et positivement corrélées à la macrosomie fœtale [237, 240, 241].

Dans l'étude de Lepercq *et coll.* [237], les patientes diabétiques présentent un taux d'insuline plasmatique et ombilical significativement augmenté par rapport aux patientes non diabétiques. L'hyperinsulinémie plasmatique résulte d'un contrôle glycémique réalisé par insuline, à l'origine d'une glycémie comparable dans les deux groupes de patientes [237]. L'augmentation de la concentration ombilicale d'insuline suggère une hyperinsulinémie fœtale qui, de par les propriétés anaboliques de cette hormone, pourrait être à l'origine de la macrosomie fœtale observée lors des grossesses diabétiques. Comme précédemment, ces données renforcent également l'hypothèse présentant la leptine ombilicale comme le reflet de l'adiposité fœtale.

OBJECTIFS

Aux vues des connaissances existantes sur les effets cellulaires et tissulaires de la leptine d'une part, les variations de son taux plasmatique observées chez les personnes obèses et les troubles de l'accouchement constatés chez les femmes obèses d'autre part, nous avons voulu approfondir l'étude des effets de la leptine sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'accouchement (Figure 15).

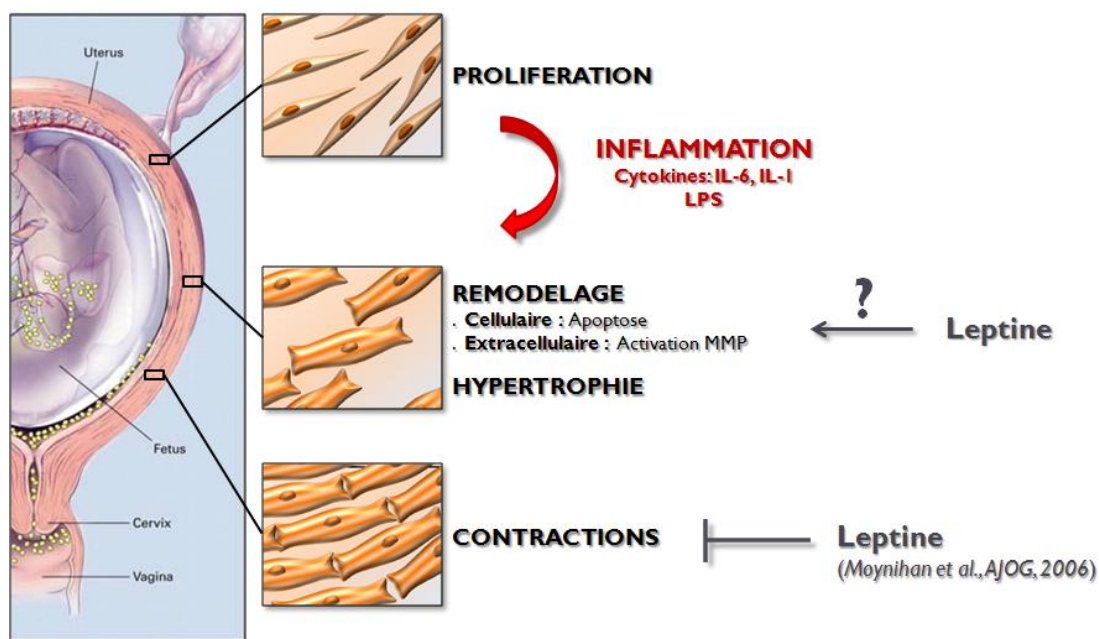


Figure 15 : Objectifs du travail : Etude des effets de la leptine sur les mécanismes impliqués dans l'accouchement.

Plus précisément, les objectifs de ce travail ont été (i) de vérifier l'expression des récepteurs à la leptine dans le myomètre gestant et caractériser les voies de signalisation activées par la leptine dans ce tissu, (ii) d'étudier les effets de la leptine sur l'apoptose myométriale dans un modèle *in vitro* d'inflammation induite par le LPS et de caractériser les voies de signalisation impliquées dans cet effet et (iii) d'étudier les effets de la leptine sur le remodelage de la matrice extracellulaire myométriale dans le même modèle *in vitro* d'inflammation induite par le LPS.

MATERIELS ET METHODES

I. Recueil des prélèvements

Les prélèvements de myomètre sont effectués lors de césariennes réalisées au bloc chirurgical de la maternité du CHU de Dijon. Les biopsies sont prélevées avant la mise en route du travail, à l'opposé du placenta, au niveau sous séreux, où la majorité des fibres musculaires sont orientées de façon longitudinale [94, 106].

Cette étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP-Est 1, Dijon, France) ainsi que par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (numéro d'enregistrement : 2008-A01334-51 et 2009-A01176-51) et un consentement écrit et éclairé a été obtenu pour chaque patiente. Sont exclus de l'étude les femmes mineures ainsi que celles porteuses d'une infection virale certaine ou probable, ou ayant des troubles de l'hémostase.

Les prélèvements de myomètre sont immédiatement placés dans du milieu DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen Gibco) stérile en présence d'antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine) et d'antifongique (250 ng/ml d'amphotéricine B), à 4°C et transportés au laboratoire. Ils sont ensuite lavés deux fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) stérile, nettoyés du sang et des parties œdématisées puis découpés en petits fragments d'environ 30-50 mg. Chaque fragment est placé dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 2 ml de DMEM supplémenté en antibiotiques et antifongique, constituant alors un explant [94, 106]. Pour pallier au stress engendré par le prélèvement et la dissection, les explants sont incubés à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48 heures afin de retrouver un seuil d'expression basal de cytokines avant d'être stimulés par différents agonistes [242].

II. Protocole de stimulation des explants de myomètre

1. Protocole n°1 : étude des voies de signalisation activées par la leptine

En premier lieu, nous avons analysé les voies de signalisation activées par la leptine dans le myomètre gestant humain. Pour cela, après 48 heures de repos, les explants de myomètre sont stimulés par la leptine à trois concentrations croissantes (de 10⁻¹⁰ à 10⁻⁸M) et pour trois temps de stimulation différents (15, 30 et 60 minutes).

2. Protocole n°2 : étude des effets de la leptine sur l'apoptose et le remodelage induits par le LPS dans le myomètre gestant (Figure 16)

Après 48 heures de repos, l'apoptose cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire sont induits en incubant les explants avec du LPS à une concentration finale de 10 µg/ml pendant 48 heures. Ce modèle *in vitro* d'inflammation myométriale a été préalablement validé et publié par notre équipe [94, 106]. Les effets du LPS dans le myomètre sain ont été comparés à ceux de l'inflammation pathologique observée dans des tissus myométriaux de femmes souffrant de chorioamniotite [94, 106]. Ensuite, une étude effet-dose a été réalisée afin d'évaluer la capacité de la leptine à s'opposer à l'apoptose et au remodelage utérin induits par le LPS. Les explants sont alors stimulés pendant 48 heures, soit par le LPS seul à une concentration finale de 10 µg/ml, soit par le LPS associé à la leptine à trois concentrations croissantes (de 10^{-10} à 10^{-8} M), la leptine étant ajoutée au milieu de stimulation 15 à 20 minutes avant le LPS. L'effet de la leptine seule a été testé sur des explants non stimulés par le LPS.

Nous avons également vérifié la spécificité des effets observés par l'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs à la leptine (LPrA, $K_i \approx 6.10^{-7}$ M) à trois concentrations croissantes (de 10^{-7} à 10^{-5} M). Une heure avant la stimulation par le LPS puis par la leptine, le LPrA est ajouté au milieu de stimulation. Les explants sont incubés avec ce mélange pendant 48 heures.

3. Protocole n°3 : étude de l'implication des MMP dans le remodelage utérin induit par le LPS (Figure 16)

L'implication des MMP dans le remodelage utérin induit par le LPS a été étudiée par l'utilisation d'un inhibiteur des MMP, le GM6001 ($K_i = 400$ pM, 500pM, 27nM, 100pM et 200pM pour MMP1, MMP2, MMP3, MMP8 et MMP9, respectivement). Une heure avant la stimulation par le LPS, les explants sont pré-incubés avec le GM6001 à une concentration finale de 10^{-5} M. Les explants sont incubés avec ce mélange pendant 48 heures.

4. Protocole n°4 : étude de l'implication de la voie ERK1/2 dans les effets de la leptine sur l'apoptose myométriale (Figure 16)

Les explants sont pré-incubés pendant une heure avec un inhibiteur de MEK1/2 (MAPK kinase, le U0126, IC₅₀=72nM et 58nM pour MEK1 et MEK2 respectivement), à deux concentrations, 10⁻⁵ et 3.10⁻⁵M. La leptine, puis le LPS sont ensuite ajoutés au milieu de stimulation, à une concentration finale de 10⁻⁸M et 10 µg/ml, respectivement, la leptine étant ajoutée au milieu de stimulation 15 à 20 minutes avant le LPS.

Pour chaque expérience, un témoin négatif non stimulé est réalisé. A la fin des différentes stimulations, les surnageants tissulaires sont immédiatement congelés et conservés à -80°C et les explants tissulaires sont soit congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C, soit fixés dans le paraformaldéhyde (PFA) à 4%.

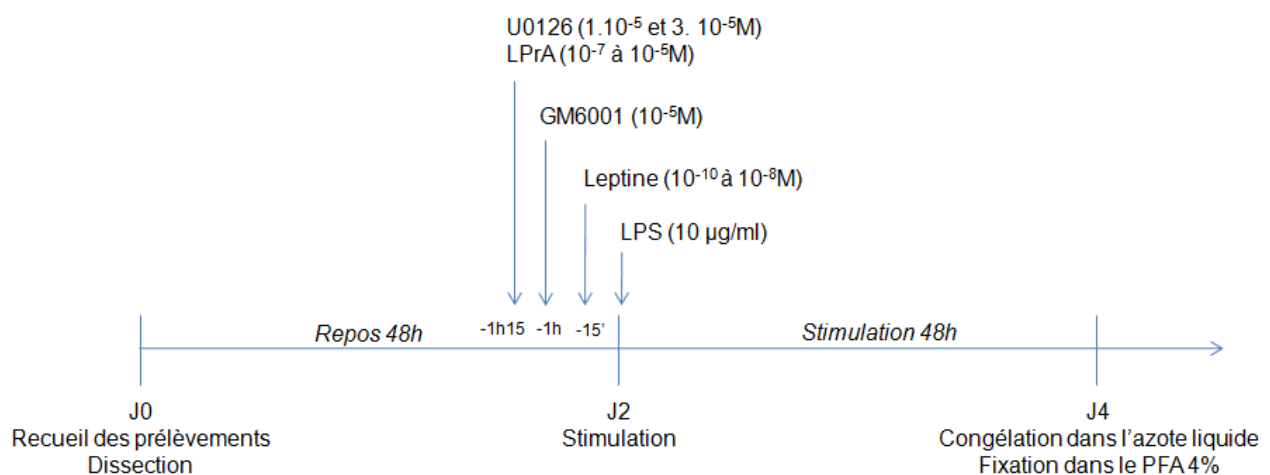


Figure 16 : Schéma récapitulatif des protocoles de stimulation 2, 3 et 4

III. Techniques histologiques

1. Marquage au DAPI

Afin de distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, la condensation de la chromatine du noyau des cellules ainsi que la formation de corps apoptotiques sont observées par marquage de l'ADN au DAPI (4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole).

Les explants de myomètre sont fixés dans une solution de PFA à 4% pendant 24 heures puis déshydratés par deux bains successifs de sucrose à 15% et 30% avant d'être inclus en résine OCT (Optical Coherence Tomography). Les explants sont ensuite coupés en sections de 5 µm d'épaisseur, à l'aide d'un cryostat. Les lames sont incubées dans une solution de DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) à 0,1 µg/ml pendant 15 minutes, à l'obscurité, puis rincées par trois lavages de 10 minutes dans du PBST (PBS - 0,1% Tween-20). Une goutte d'antifading est déposée sur les coupes avant d'être montées entre lames et lamelles.

Les noyaux marqués sont visualisés avec un microscope à fluorescence, à un grossissement x1000. L'excitation se fait à 350 nm alors que la fluorescence est émise à 420 nm.

2. Coloration au rouge sirius

La coloration au rouge sirius permet de visualiser les fibres de collagène présentes dans le tissu myométrial et d'observer un remodelage éventuel de ce tissu.

Les explants de myomètre sont fixés dans une solution de PFA à 4% pendant 24 heures puis déshydratés dans un bain d'alcool à 70° pendant 12 heures. Les explants sont ensuite inclus dans la paraffine puis coupés en sections de 5 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome. Les lames sont réhydratées par des bains successifs de xylène, d'éthanol absolu et à 70°. Enfin, les lames sont rincées dans 3 bains d'eau courante de 3 minutes. Les lames sont placées dans une solution d'hémalum de Mayer pendant 2 minutes puis rincées trois fois à l'eau distillée pendant 2 minutes. Elles sont ensuite placées dans un bain de Rouge Sirius à 0,1% pendant 30 minutes. Enfin, les lames sont rincées dans 2 bains successifs d'eau distillée de 20 secondes avant d'être montées avec une goutte de colle Aquatex®. Les fibres de collagène sont visualisées avec un microscope en lumière polarisée à un grossissement x100. Les fibres de collagène de type I et III présentent une coloration jaune-orangée et verte, respectivement [243]. Les différences de marquage observées entre les conditions expérimentales sont quantifiées par la mesure de l'intensité du collagène à l'aide du logiciel « Histolab ».

3. Immunohistochimie

Les explants de myomètre sont fixés dans une solution de PFA à 4% pendant 24 heures puis déshydratés dans un bain d'alcool à 70° pendant 12 heures, soit après 48h de repos pour le marquage de OB-R, soit après 48h de repos puis 48h de stimulation pour le marquage des MMP. Les explants sont ensuite inclus dans la paraffine puis coupés en sections de 5 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome. Les lames sont réhydratées par 3 bains successifs de xylène pendant 5 minutes, suivis de bains successifs d'éthanol absolu, à 95° et à 70°. Enfin, les lames sont rincées dans 2 bains d'eau distillée de 2 minutes.

Le démasquage des antigènes est réalisé au bain-marie dans un tampon citrate (10mM, pH 6) pendant 20 minutes à 95°C et n'est effectué que pour le marquage du récepteur à la leptine, de MMP9 et de MMP13. Après avoir bloqué l'activité peroxydase endogène par une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 15 minutes, les lames sont rincées au PBS puis saturées avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 3%.

Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire anti-OB-R (dilution 1/1000^{ème}, ab5593, Abcam), anti-MMP2 (dilution 1/100^{ème}, IM53, Calbiochem), anti-MMP9 (dilution 1/50^{ème}, IM09L, Calbiochem) et anti-MMP13 (dilution 1/50^{ème}, IM78, Calbiochem), toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire (anti-lapin ou anti-souris) biotinylé approprié (dilution 1/250^{ème}) pendant 1 heure, puis avec la peroxydase marquée à la streptavidine (dilution 1/500^{ème}) pendant 45 minutes et enfin avec le 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC) jusqu'à l'apparition d'une coloration rouge vif visible au microscope. La réaction enzymatique est stoppée par un bain d'eau courante pendant 2 minutes. Enfin, les lames sont contre-colorées par une solution d'hémalun de Mayer. Entre chaque incubation, trois lavages de 2 minutes avec une solution de PBS sont effectués.

L'expression du récepteur à la leptine et des MMP est appréciée par la présence d'une coloration rouge au niveau des cellules. Un contrôle négatif est réalisé en omettant l'anticorps primaire afin de vérifier la spécificité du marquage observé.

IV. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée grâce au Trizol (Invitrogen, France) après broyage des explants myométriaux dans l'azote liquide. Afin d'éviter la dégradation des ARN, le mortier et le pilon utilisés sont préalablement nettoyés avec une solution de « Ribonuclease Away » (Molecular Bioproducts). Le Trizol est ajouté à la poudre obtenue à raison de 1 ml pour 100 mg de tissu. Après homogénéisation, les ARN totaux sont purifiés par ajout de chloroforme, précipités par ajout d'isopropanol, lavés avec de l'éthanol 75% froid et repris dans de l'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate), selon le protocole du fournisseur. L'intégrité des ARN totaux extraits est vérifiée par obtention des deux bandes caractéristiques 18S et 28S après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% contenant 0,5 µg/ml de BET (bromure d'éthidium).

La concentration des solutions d'ARN obtenues est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité Abs_{260nm} = 40 µg d'ARN/ml). La pureté des ARN est appréciée par le rapport des absorbances mesurées à 260 nm et à 280 nm, devant être compris entre 1,8 et 2.

Enfin, les solutions d'ARN obtenues sont traitées à la désoxyribonucléase afin d'éviter la contamination de l'ARN par de l'ADN génomique.

2. Rétro-transcription en ADNc et PCR

La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice ARN. Un microgramme d'ARN totaux est rétro-transcrit en ADNc par la SuperScript II transcriptase (Invitrogen, France). Les produits de la réaction sont ensuite utilisés comme matrice pour les PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR est une technique d'amplification permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique. Elle consiste en une succession de réactions de réplication d'une matrice d'ADN double brin.

L'amplification se fait sur 2 µl de solution d'ADNc mis en présence d'une unité de l'enzyme de réplication, Taq polymérase, dans un mélange réactionnel contenant 2 µl de tampon 10X, 1,5 à 2 µM de MgCl₂, 0,2 à 2 µM d'amorces spécifiques et 0,2 mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) [143]. Le volume réactionnel est ajusté à 20 µl avec de l'eau stérile. Les amorces utilisées ainsi que la longueur des produits de PCR sont répertoriées dans le Tableau 3. Tous ces réactifs sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (Biometra) selon un programme spécifique pour chaque séquence à amplifier. Les cycles d'amplification des

différentes séquences amplifiées ne diffèrent que par leurs durées et leurs températures d'hybridation comme indiqué dans le Tableau 3. Après 3 minutes de dénaturation à 95°C, les échantillons sont soumis à une succession de cycles. La réaction se termine par une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Gène amplifié	Séquence (5' → 3')	Taille des amplicons (paire de bases)	Conditions de cycle	Nombre de cycles
<i>OB-RL</i>	Sens: GCCAACAACCTGTGGTCTCTC Antisens: AGAGAAGCACTTGGTGACTG	246	94°C x 50 sec 55°C x 50 sec 72°C x 1 min	40
<i>OB-RS B219.1</i>	Sens: TTGTGCCAGTAATTATTTCTCTT Antisens: CTGTGGCCTTCCGCAGTG	227	94°C x 1 min 60°C x 1 min 72°C x 1.5 min	40
<i>OB-RS B219.2</i>	Sens: TTGTGCCAGTAATTATTTCTCTT Antisens: ACCTCCACCCAGTAGTTCCTT	176	94°C x 1 min 60°C x 1 min 72°C x 1.5 min	40
<i>OB-RS B219.3</i>	Sens: TTGTGCCAGTAATTATTTCTCTT Antisens: AGTTGGCACATTGGGTCAT	200	94°C x 1 min 60°C x 1 min 72°C x 1.5 min	40
<i>18S rRNA</i>	Sens: GTAACCCGTTGAACCCCAT Antisens: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	131	94°C x 20 sec 62°C x 30 sec 72°C x 30 sec	35

Tableau 3 : Amorces et conditions de PCR pour chaque séquence amplifiée [143].

Enfin, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant 0,5 µg/ml de BET. Les échantillons sont mélangés à du tampon de charge 6X avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue pendant une heure à 130 Volts. Les bandes correspondant aux fragments d'ADN sont observées par excitation du BET sous une lumière ultraviolette (Geldoc, Bio-Rad). La taille des fragments est estimée par comparaison avec les bandes d'un marqueur de taille moléculaire (« 100bp DNA ladder », Fermentas).

V. Techniques biochimiques

1. Extraction et dosage protéiques

Les échantillons de myomètre sont broyés au mortier dans l'azote liquide, après avoir été préalablement pesés. La poudre obtenue est ensuite ajoutée à du tampon de lyse (40mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 50mM sodium fluoride, 1% Triton X100) supplémenté en inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1%). Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 10.000g à 4°C. La concentration totale en protéines est déterminée sur le surnageant par la méthode de Bradford avec l'albumine sérique bovine comme standard. Les échantillons sont dissous (vol/vol) dans du tampon Laemmli 2X (125mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,004% bleu de bromophénol) et portés à 95°C pendant 3 minutes.

2. Analyse de l'expression protéique par Western Blotting

Les protéines sont déposées (20 à 50 µg par puits) et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (8% pour OB-R, 10% pour les MMP, 12% pour les voies de signalisation, les marqueurs apoptotiques et 16% pour la caspase-3 clivée) en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate). Un marqueur de poids moléculaires connus est séparé sur le même gel afin de vérifier que les bandes d'intérêt correspondent au poids moléculaire attendu. Après transfert liquide sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride), les sites non spécifiques sont saturés par une solution de blocage (5% régilait, 0,1% BSA, TBST (Tris-Buffered Saline – 0,1% Tween-20)) pendant une heure sous agitation et à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées une heure, sous agitation et à température ambiante, avec l'anticorps primaire approprié dilué dans une solution de TBST avec 1% de régilait et 0,02% de BSA (Tableau 4). Après trois lavages au TBST, les membranes sont incubées une heure avec un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase et dilué dans une solution de TBST avec 1% de régilait et 0,02% de BSA. Après trois nouveaux lavages au TBST, les membranes sont révélées par chimiluminescence grâce à un kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Santa-Cruz biotechnology) et exposées sur un film photographique (Hyperfilm, Amersham Biosciences). L'intensité des bandes correspondant aux protéines d'intérêt est quantifiée par densitométrie avec le logiciel « Image Lab » et normalisée par comparaison avec l'intensité des bandes obtenues avec l'anticorps anti-GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) utilisé comme contrôle de la charge en protéines. Les résultats sont exprimés en unité densitométrique arbitraire (ADU).

Protéine d'intérêt	Anticorps primaire			
	Dilution	Espèce	Fournisseur	Référence
OB-R	1/2000	Lapin	Abcam	ab5593
ERK1/2	1/1000	Lapin	Cell Signaling Technology	# 9102
Phospho-ERK1/2				#9101
STAT3	1/1000	Lapin		# 9132
Phospho-STAT3				#9131
AKT	1/1000	Lapin		# 9272
Phospho-AKT				# 9271
p38 MAPK	1/1000	Lapin		#9212
Phospho-p38MAPK				#9211
Caspase-3 clivée	1/400	Lapin		#9661
BAX	1/1000	Lapin	Santa-Cruz biotechnology	sc-493
BCL2	1/1000	Souris		sc-7382
GAPDH	1/1000	Lapin		sc-25778
MMP2	1/500	Souris	Calbiochem	IM53
MMP9	1/250	Souris		IM09L
MMP13	1/500	Souris		IM78

Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps et dilutions utilisés pour les expériences de Western Blotting.

3. Analyse de l'activité des métalloprotéinases par zymographie

Les métalloprotéinases MMP2 et MMP9, aussi appelées gélatinases, sont des enzymes capables de digérer le collagène, constituant principal de la matrice utérine, mais aussi la gélatine. Les activités gélatinolytiques de ces deux métalloprotéinases sécrétées dans le surnageant de milieu de culture ont été étudiées par la technique de zymographie.

Les surnageants de milieu de culture tissulaire sont dilués dans du tampon de zymographie (Zymogram Sample Buffer, 161-0764, Bio-Rad), puis séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 12% co-polymérisé avec 3 mg/ml de gélatine. Après migration, le gel est incubé 30 minutes à température ambiante dans une solution de renaturation (2,5% Triton X-100), rincé brièvement dans de l'eau distillée puis incubé pendant 18 heures à 37°C dans un tampon

d'activation (50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM CaCl₂, 150mM NaCl, 5μM ZnSO₄). Le gel est alors coloré pendant 30 minutes avec du bleu de Coumassie 0,1% dans une solution de méthanol (40%) et d'acide acétique (10%). Puis, le gel est décoloré dans cette même solution sans colorant afin de révéler l'activité gélatinolytique.

L'activité des gélatinases est mise en évidence par l'apparition de bandes claires sur fond bleu lors de la décoloration du gel, traduisant une digestion de la gélatine par les MMP. L'intensité des bandes blanches observées est ensuite intégrée puis semi-quantifiée par densitométrie à l'aide du logiciel « Image Lab ». Les résultats sont exprimés en ADU.

VI. Analyse statistique

Les différences entre les groupes ont été comparées par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de comparaison multiple de Bonferroni ou de Dunn's. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel « GraphPad Prism » version 5.01. Le seuil de significativité retenu pour les différences observées a été fixé à $p < 0,05$.

VII. Drogues utilisées

La leptine humaine recombinante (ref: L4146) et le LPS (Lipopolysaccharide *E.coli* O55:B5, ref: L2880) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et ont été dissous selon les instructions du fournisseur. L'antagoniste du récepteur à la leptine (LPrA) a été gracieusement fourni par le Centre de Recherche Biomédicale de Boston. Les inhibiteurs sélectifs de MEK1/2 (U0126, ref: 662005) et des MMP (GM6001, ref: 364205) ont été achetés chez Calbiochem (Nottingham, UK).

RESULTATS

I. Article 1: « Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an *in vitro* human model of chorioamnionitis. »

1. Introduction

L'obésité maternelle, dont la prévalence ne cesse d'augmenter, est associée à une majoration des complications obstétricales pouvant mettre en jeu le pronostic vital de la mère et de l'enfant [244, 245]. Parmi les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses, on retrouve une diminution du taux de mise en travail spontanée à l'origine d'une élévation de la fréquence des déclenchements du travail ainsi que des taux d'échec de déclenchement du travail et de césarienne plus élevés [15, 44, 246, 247].

Les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses peuvent s'expliquer par d'importantes disproportions fœto-pelviennes et/ou par une contractilité utérine altérée. En effet, une réduction de l'amplitude et de la fréquence des contractions utérines ont été mises en évidence chez les femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal [15].

Au moment de l'accouchement, la transition phénotypique du myomètre d'un état de quiescence utérine à un état contractile est une étape clé indispensable à la mise en route du travail, et elle semble associée à une activation de l'apoptose des cellules myométriales. En effet, des études de génomique fonctionnelle menées sur des tissus myométriaux et cervicaux de femmes enceintes en travail ou non, ont montré que la parturition est associée à une augmentation de l'expression des gènes de l'apoptose [100, 248]. Des variations de l'expression de protéines anti- et pro-apoptotiques ainsi que des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose ont également été observées dans le myomètre [103] et les membranes fœtales à terme [249]. En outre, une activation transitoire des caspases concomitante à une transition du statut phénotypique utérin a été mise en évidence chez la rate gestante [99]. Enfin, Lirussi *et coll.* [106] ont montré que la chorioamniotite, qui est une des principales causes d'accouchement prématuré est associée à une apoptose des cellules myométriales.

Les femmes enceintes obèses présentent une hyperleptinémie, leur taux plasmatique de leptine étant augmenté de 60% par rapport aux femmes de poids normal [250]. De plus, Moynihan *et coll.* [171] ont démontré *in vitro* que la leptine inhibe la contractilité myométriale, qu'elle soit induite ou spontanée.

Les effets anti-apoptotiques de la leptine ayant été décrits dans de nombreux tissus [158, 160, 251, 252], notre hypothèse est que l'inhibition de l'apoptose des cellules myométriales par la leptine pourrait inhiber leur différenciation vers un phénotype contractile, et ainsi constituer un mécanisme physiopathologique participant aux troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses.

Le but de ce travail était, dans un premier temps, de mettre en évidence l'expression des récepteurs à la leptine dans le myomètre humain gestant par immunohistochimie, RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) et Western Blotting. Puis, nous avons cherché à caractériser les voies de signalisation activées par la leptine en étudiant l'état de phosphorylation des protéines ERK1/2, p38MAPK, STAT3 et AKT par Western Blotting. Dans un second temps, nous avons étudié les capacités de la leptine à moduler l'apoptose induite par le LPS en évaluant l'expression des marqueurs pro-apoptotiques (caspase 3 clivée, BAX) et anti-apoptotiques (BCL2) par Western Blotting.

2. Conclusion et discussion

Notre étude a démontré l'expression des isoformes longue et courtes du récepteur à la leptine dans le myomètre humain gestant, et que leur stimulation par la leptine active la voie de signalisation ERK1/2, et non pas p38MAPK, JAK/STAT et PI3K/AKT. Le résultat majeur de notre étude est la mise en évidence des capacités de la leptine à inhiber de façon concentration-dépendante l'apoptose induite par le LPS, en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques (caspase-3 clivée, BAX) et en augmentant celle d'un médiateur anti-apoptotique BCL2. La spécificité de l'effet observé a été démontrée par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à la leptine. Enfin, nos résultats ont montré que l'effet anti-apoptotique de la leptine dans le myomètre gestant est associé à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2.

Ce travail est le premier à mettre en évidence l'expression des isoformes du récepteur à la leptine dans le myomètre gestant. En effet, alors que celle des différentes isoformes de OB-R avait été montrée dans le placenta [210] et l'endomètre [253], leur expression myométriale n'avait été démontrée que dans du tissu non gestant [254]. L'impact de l'obésité maternelle sur l'expression myométriale de ces isoformes n'a été étudié que dans le placenta et l'étude de Farley *et coll.* [215] a montré une diminution de l'expression de OB-RL dans des tissus placentaires issus de femmes obèses par rapport à ceux de femmes de poids normal ; l'expression de OB-RS n'ayant pas été étudiée. Cependant, en raison d'un nombre limité de prélèvements, nous n'avons pas pu comparer l'expression des isoformes de OB-R entre les myomètres de femmes obèses et de poids normal.

Nos résultats sont en accord avec de précédents travaux ayant mis en évidence les propriétés anti-apoptotiques de la leptine dans différents types cellulaires [158, 160, 251, 252]. De plus, l'implication de la voie ERK1/2 dans ces effets a aussi été décrite dans les cellules trophoblastiques [160]. En outre, nos résultats sont concordants avec ceux de l'étude de Bates *et coll.* [149] rapportant que la voie JAK/STAT n'est pas impliquée dans les phénomènes reproducteurs et notamment, le contrôle de la fertilité exercé par la leptine puisque l'inactivation de cette voie chez des souris n'empêche par leur reproduction.

Au contraire, la mise en évidence d'un effet anti-apoptotique de la leptine diffère avec les résultats de précédentes études, la première réalisée sur des cellules endométriales, ne montrant aucun effet de la leptine sur l'apoptose induite par des agents anticancéreux [255] et la seconde démontrant un effet pro-apoptotique de la leptine sur des cellules ovariennes humaines [256].

Les effets anti-apoptotiques de la leptine n'ont pas toujours été décrits comme étant associés à une activation de la voie de signalisation ERK1/2. En effet, Uddin *et coll.* [158] montrent que l'effet anti-apoptotique de la leptine dans des cellules humaines de lymphomes est lié à l'activation de la voie PI3K/AKT tandis que Chen *et coll.* [251] observent, dans des cellules humaines d'hépatocarcinomes, l'implication des trois voies JAK/STAT, PI3K/AKT et ERK1/2 dans ces effets.

Nous supposons que les divergences observées, aussi bien dans l'effet pro- ou anti-apoptotique de la leptine ou dans les voies de signalisation impliquées dans cet effet, peuvent être liées à des différences dans le type cellulaire étudié, la voie de déclenchement de l'apoptose (mitochondriale vs extrinsèque), l'affinité de la leptine pour les différentes isoformes de son récepteur et/ou leur densité cellulaire.

Notre hypothèse est que les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses pourraient être liés à l'augmentation de la concentration plasmatique de leptine. Les effets délétères de la leptine s'exerceraient sur certains mécanismes cellulaires et tissulaires impliqués dans l'accouchement, notamment l'apoptose myométriale. D'après Shynlova *et coll.* [99], l'activation de l'apoptose dans le myomètre de rate gestante correspondrait à un signal permettant la différenciation des myocytes. Cette activation apoptotique semble donc constituer un élément clé dans la mise en route du travail, en permettant la transition des cellules myométriales d'un état de quiescence utérine vers un phénotype contractile. Ainsi, par son action anti-apoptotique, la leptine pourrait bloquer cette différenciation cellulaire indispensable à la mise en route du travail, et ce, d'autant plus qu'elle est fortement exprimée dans des myoblastes humains indifférenciés [257] et qu'elle peut inhiber la différenciation de myoblastes porcins [258]. L'hypothèse de l'altération par la leptine d'un mécanisme cellulaire additionnel de ceux impliqués dans la contraction des cellules myométriales est soutenue par une étude récente ne montrant aucune corrélation entre l'IMC maternel et la contractilité myométriale, qu'elle soit spontanée ou induite [259]. Ces résultats, en contradiction avec ceux de Zhang *et coll.* [15], peuvent s'expliquer par un biais dans le recueil des prélèvements, en particulier si ce dernier est réalisé après la mise en route du travail, procurant ainsi des tissus myométriaux dans lesquels les myocytes sont différenciés vers un phénotype contractile.

Ce travail est le premier à démontrer l'expression des récepteurs à la leptine dans le myomètre gestant et l'effet anti-apoptotique de la leptine dans ce tissu *via* l'activation de la voie ERK1/2. Il a permis d'approfondir les connaissances sur le rôle de la leptine dans la régulation de l'activité du myomètre. Moynihan *et coll.* [171] ayant démontré le rôle inhibiteur de la leptine sur les contractions myométriales, les résultats de ce travail suggèrent un mécanisme par lequel l'augmentation du taux de leptine chez les femmes obèses enceintes pourrait être impliquée dans les troubles de l'accouchement.

II. Article 2: « Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an *in vitro* model of myometrial inflammation. »

1. Introduction

Au cours de la grossesse, l'utérus croît en taille pour accueillir le fœtus, le placenta et le liquide amniotique. Ce processus est en partie facilité par un remodelage important de la matrice extracellulaire accompagné d'une prolifération des cellules utérines [90]. Bien que les mécanismes conduisant à la mise en route du travail restent peu connus, il semblerait que le remodelage myométrial joue un rôle important, puisqu'il permet à l'utérus de recouvrer une activité contractile efficace [91]. De plus, il interviendrait dans la maturation cervicale [86] et le phénomène d'involution utérine, permettant à l'utérus de retrouver sa taille initiale [90].

Le remodelage myométrial est associé à une dégradation des collagènes de type I et III [260], principaux constituants du myomètre humain, sous le contrôle d'enzymes protéolytiques, les métalloprotéinases [73]. Parmi elles, les gélatinases A et B, MMP2 et MMP9 respectivement, ont été particulièrement étudiées en raison de leur grande variété de substrat [73].

Alors qu'il est clairement établi que la mise en route du travail est associée à une augmentation de l'expression de plusieurs MMP dans le placenta [261, 262], les membranes fœtales [79, 262, 263] et le liquide amniotique [264, 265], l'activation et la régulation des MMP dans le myomètre au moment du travail n'ont été que peu étudiées. Néanmoins, une augmentation de l'activité et de l'expression de MMP2 et de MMP9 ont été mises en évidence dans le myomètre de femmes en travail par rapport à des femmes non en travail [75, 86]. De plus, Lirussi *et coll.* [94] ont montré que la chorioamniotite, une des principales causes d'accouchement prématuré, est associée à un remodelage myométrial intense regroupant une dégradation du collagène total et une augmentation de l'activation et de l'expression de MMP2 et de MMP9. MMP13 est exprimée dans les tissus gestationnels humains tels que la décidue, les membranes fœtales et le liquide amniotique et son expression déciduale diminue au cours de la grossesse [266, 267]. Chez les rongeurs, MMP13 semble participer activement au phénomène d'involution utérine [73].

Notre premier travail a permis de montrer les effets anti-apoptotiques de la leptine sur les cellules myométriales [268]. Dans la présente étude, nous nous sommes appliqués à tester l'influence de la leptine sur le remodelage de la matrice extracellulaire utérine. Plus spécifiquement, l'hypothèse physiopathologique de cette étude est que l'inhibition du remodelage myométrial par la leptine pourrait inhiber la différenciation du myomètre vers un phénotype contractile.

Le but de ce travail était donc d'étudier les capacités de la leptine à moduler le remodelage myométrial induit par le LPS en évaluant l'activation et l'expression des MMP ainsi que le niveau d'expression du collagène total myométrial.

2. Conclusion et discussion

Ce travail a confirmé l'implication des MMP dans le remodelage myométrial induit par le LPS, par l'utilisation du GM6001, un inhibiteur des MMP à large spectre. L'utilisation du GM6001 a permis de prévenir la dégradation du collagène et l'activation des MMP induite par le LPS au niveau myométrial. Ces résultats ont permis de confirmer ceux d'une précédente étude montrant que la stimulation d'explants myométriaux sains par le LPS était associée à une dégradation du collagène ainsi qu'à une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP2 et de MMP9, et que ces effets étaient comparables à ceux observés dans des explants de myomètre prélevés chez des patientes présentant une chorioamniotite [94]. De plus, ces données sont en accord avec Koscica *et coll.* [269], qui ont montré que l'administration intra-péritonéale de GM6001 à des souris traitées par le LPS diminuait le taux d'accouchement prématuré.

Le résultat majeur de ce travail est que la leptine est capable de s'opposer au remodelage myométrial induit par le LPS. En effet, la leptine inhibe, de façon concentration-dépendante, l'augmentation de l'expression et de l'activité de MMP2 et MMP9 induite par le LPS. Il en résulte une diminution de la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire myométriale.

Nos résultats sont en contradiction avec plusieurs études, montrant soit l'absence d'effet, soit un effet stimulant de la leptine sur l'expression ou l'activité des MMP [161-165, 270]. D'après l'étude de Quinton *et coll.* [161], réalisée sur des lignées cellulaires endométriales de femmes non enceintes, la leptine n'exerce aucun effet sur l'expression de MMP2 et de MMP9. Ces divergences peuvent s'expliquer par la différence de type cellulaire utilisé (endométrial vs myométrial) et de statut physiologique des femmes dont sont issus les prélèvements (non-enceinte vs enceinte).

A l'inverse de nos résultats, plusieurs études montrent des effets stimulants de la leptine sur le remodelage de la matrice extracellulaire de nombreux tissus et types cellulaires, tels que des cellules glomérulaires murines [164], des cardiomyocytes humains [165] et des cellules trophoblastiques humaines [163]. Nous supposons que les différences observées sont liées aux types cellulaires utilisés, mais également à une action différente de la leptine entre le début et la fin de la grossesse. L'hypothèse d'une action différentielle de la leptine en cours de grossesse sur l'expression et/ou l'activité des MMP est étayée par une étude réalisée chez la souris montrant une stimulation par la leptine de l'invasion trophoblastique au 10^{ème} jour de gestation et une absence d'effet au 18^{ème} jour de gestation [271]. Cette action différentielle pourrait être

liée à une variation de l'expression des différentes isoformes du récepteur à la leptine au cours de la grossesse, au niveau des tissus placentaires et myométriaux. En effet, chez la femme, leur expression au cours de la grossesse n'a été étudiée que dans le tissu placentaire et aucune variation n'a été décrite [210]. Au contraire, au cours de la grossesse chez le babouin, une augmentation de l'expression des deux isoformes a été mise en évidence dans le placenta tandis que seule celle de OB-RS est augmentée dans la décidue et les membranes fœtales [221]. Au niveau myométrial, l'évolution de l'expression des isoformes de OB-R pendant la grossesse n'est pas connue et reste à être explorée.

En accord avec nos résultats, deux travaux récents ont mis en évidence un effet inhibiteur de la leptine sur l'expression des MMP [166, 170]. Dans des cellules hépatiques humaines, Cao *et coll.* [166] ont montré que la leptine diminuait l'expression génique et protéique de MMP1 en réprimant le gène codant pour MMP1 *via* l'activation de ERK1/2. Etant donné que la stimulation d'explants myométriaux par la leptine active la voie de signalisation ERK1/2 [268], cette étude suggère que la leptine pourrait de la même façon, inhiber l'expression et l'activité de MMP2 et de MMP9 dans le myomètre, par une action répressive sur les gènes codant pour ces deux protéases, et ce, *via* l'activation de ERK1/2. Cette hypothèse reste à vérifier. Par ailleurs, le LPS active MMP2 et MMP9 *via* la voie ERK1/2 dans les cardiomyoblastes [272]. De plus, nos précédents résultats ont montré que les effets anti-apoptotiques de la leptine passent par une activation de ERK1/2 dans le myomètre [268]. Notre hypothèse est que l'effet inhibiteur de la leptine sur l'augmentation de l'expression de MMP2 et de MMP9 par le LPS s'exercerait par un phénomène de compétition entre la leptine et le LPS pour l'activation de ERK1/2.

Nos résultats montrent également que la stimulation des explants myométriaux par la leptine ne permet pas de prévenir la surexpression de MMP13 induite par le LPS. Ces données s'opposent à celles de deux précédentes études montrant que la leptine stimule l'expression de MMP13 dans des chondrocytes et des gliomes humains [162, 270]. Ces divergences peuvent être liées aux différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation et l'expression des MMP. En effet, alors que ERK1/2 semble être la voie majeure de signalisation permettant l'activation myométriale de MMP2 et de MMP9 par le LPS [272], Rossa *et coll.* [273] montrent que le LPS active MMP13 *via* la voie p38MAPK dans les fibroblastes parodontaux murins. Ainsi, l'absence d'effet de la leptine sur la surexpression myométriale de MMP13 induite par le

LPS pourrait s'expliquer par l'incapacité de la leptine à interférer avec la voie p38MAPK dans le myomètre.

Bien que MMP13 ait été détectée dans le tissu décidual, les membranes fœtales, le liquide amniotique humains et l'utérus murin [266, 267, 274], son expression et son rôle dans la parturition n'ont été que peu étudiés. L'expression génique de MMP13 dans des échantillons utérins de rates gestantes augmente d'un facteur 30 dans le post-partum [274]. De plus, chez la rate gestante, l'expression et l'activité utérines de MT1-MMP (Membrane type 1-MMP), un activateur de MMP13, augmente de façon transitoire entre la 18^{ème} heure et le 5^{ème} jour suivant l'accouchement [97]. Alors que MMP2 et MMP9 semblent être impliquées dans la mise en route du travail, il semblerait plutôt que MMP13 intervienne dans le phénomène d'involution utérine. Ainsi, étant donné l'absence d'effet de la leptine sur l'expression de MMP13, cette adipokine ne semble pas interférer avec l'involution utérine du post-partum, à moins que d'autres MMP ne participent à ce processus.

Ce travail nous a permis de confirmer l'implication des MMP dans le remodelage myométrial induit par le LPS et de démontrer les capacités de la leptine à inhiber ce phénomène. A l'instar de l'apparition des contractions utérines et de l'activation de l'apoptose myométriale, l'initiation du remodelage de la matrice extracellulaire utérine semble être impliquée dans la mise en route du travail. Ainsi, nos résultats suggèrent, dans la continuité du précédent article, que les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses résulteraient de l'inhibition du remodelage myométrial par la leptine, associée à une inhibition de l'apoptose et de la contractilité utérines.

CONCLUSIONS

L'obésité est devenue un véritable problème de santé publique, dont la prévalence ne cesse d'augmenter en France et qui n'épargne pas les femmes en âge de procréer. L'obésité maternelle est associée à de nombreux troubles de la reproduction, de la grossesse et de l'accouchement. Pendant la grossesse, le taux de leptine circulante augmente du fait d'une synthèse placentaire, suggérant un rôle gestationnel de la leptine. Chez les femmes enceintes obèses, l'augmentation du taux de leptine circulante est d'autant plus importante que l'obésité est sévère. Notre hypothèse est que la leptine pourrait être impliquée dans les troubles de l'accouchement observés chez les femmes enceintes obèses.

Ce travail de thèse s'est donc intéressé aux effets de la leptine sur les mécanismes cellulaires et tissulaires impliqués dans le déclenchement de l'accouchement, à savoir l'apoptose et le remodelage de la matrice extracellulaire myométriales. Ces travaux ont été effectués sur des explants myométriaux humains. Le modèle mis au point et validé par notre équipe, est un modèle *in vitro* d'inflammation myométriale induite par le LPS et mimant les dommages cellulaires et tissulaires observés en cas de chorioamniotite, cause majeure d'accouchement prématuré [94, 106].

La première partie de ce travail a mis en évidence pour la première fois l'expression des récepteurs à la leptine dans le myomètre de femmes enceintes à terme. Nous avons identifié la voie ERK1/2, comme étant une voie de signalisation activée par la leptine dans ce tissu. Par ailleurs, nous avons montré que la leptine présentait des propriétés anti-apoptotiques sur les cellules myométriales stimulées au LPS, et que cet effet était au moins partiellement médié par l'activation de la voie ERK1/2 (Figure 17).

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons confirmé l'implication des MMP dans le remodelage myométrial induit par le LPS. Nous avons ensuite montré que la leptine s'opposait à ce remodelage, en inhibant l'activation et l'expression de MMP2 et de MMP9 (Figure 17).

Après les travaux de Moynihan *et coll.* [171] montrant les effets inhibiteurs de la leptine sur la contractilité utérine, nos travaux suggèrent que l'hyperleptinémie observée chez les femmes enceintes obèses serait directement impliquée dans les troubles de l'accouchement observés chez ces femmes, *via* une perturbation du remodelage cellulaire et tissulaire myométrial, indispensable à la mise en place d'un phénotype contractile.

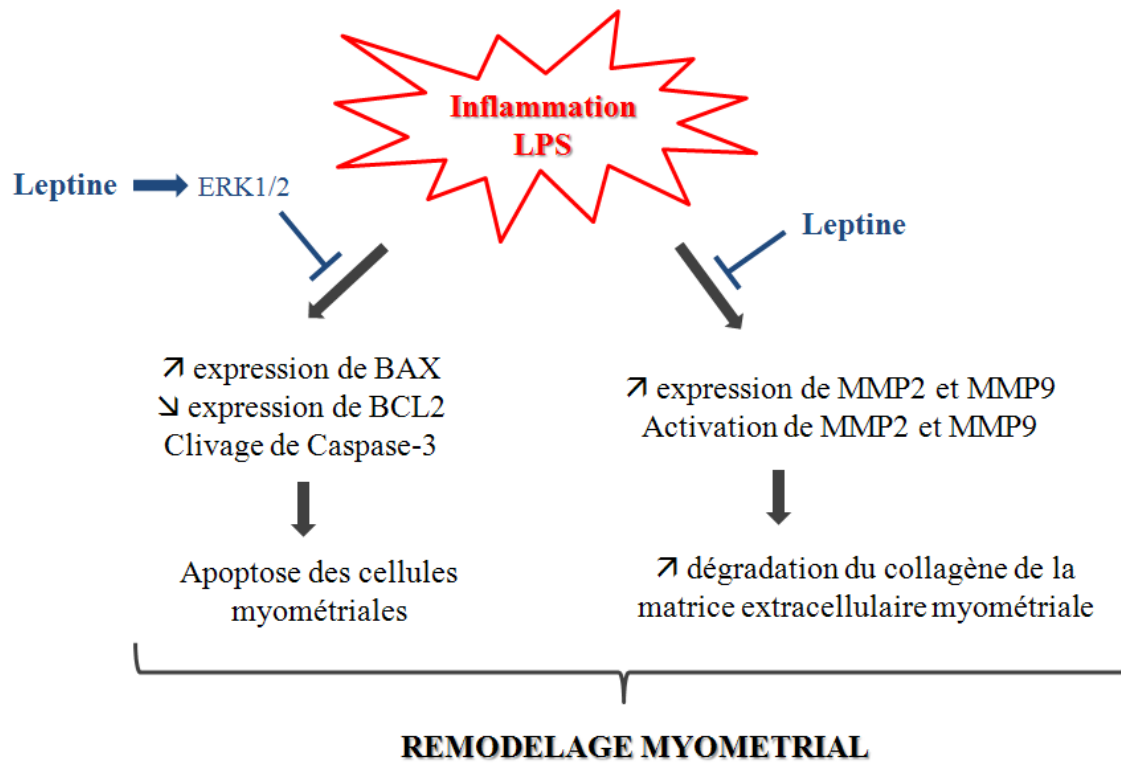


Figure 17 : Schéma récapitulatif des conclusions de ce travail.

PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail s'articulent en deux parties : une étude fondamentale et une étude clinique.

Tout d'abord, il conviendrait de poursuivre l'étude des effets de la leptine sur les mécanismes de mise en route du travail. Cette étude *in vitro* s'intéresserait aux effets de la leptine sur la prolifération et la différenciation des cellules myométriales.

L'apoptose myométriale, étudiée dans ce travail de thèse, semble correspondre à un signal permettant la différenciation des myocytes [99]. A l'approche du terme, les cellules myométriales changent de phénotype, passant d'un état quiescent, sans activité contractile efficace et associé à un état prolifératif ou hyperplasique, vers un état contractile indispensable à la mise en route du travail [99]. D'ailleurs, cette transition est associée à une régulation négative de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [100]. La phase d'hypertrophie vers laquelle évoluent les cellules myométriales est caractérisée par une augmentation de la taille des cellules et par une synthèse des protéines contractiles (γ -actine, myosine) associée à une réorganisation du cytosquelette, avec notamment une diminution de la h-caldesmone et une surexpression de la desmine [275]. On observe également une diminution des médiateurs impliqués dans la relaxation musculaire (AMP cyclique) au profit des protéines impliquées dans la contractilité musculaire, notamment le récepteur à l'ocytocine, la COX-2 et la PGF2 α [276]. Enfin, l'hypertrophie myométriale s'accompagne d'une augmentation de l'expression des jonctions gap et particulièrement de la connexine-43 permettant de synchroniser les cellules afin d'obtenir des contractions myométriales efficaces [277].

Bien que les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce changement de phénotype des cellules myométriales sont mal connus, il est établi que l'inflammation joue un rôle déterminant dans la préparation et la mise en route du travail qu'il soit à pré-terme ou à terme. Il a été notamment montré chez le singe qu'une perfusion unique d'IL-1 β est capable d'induire un accouchement dans les 48 heures [67]. En effet, l'IL-1 β active le facteur de transcription NF κ B et la COX-2, entraînant la production de prostaglandines (en particulier la PGF2 α) directement impliquées dans la genèse des contractions utérines.

Notre hypothèse de travail est que la leptine pourrait interférer avec les mécanismes de la parturition en bloquant la différenciation myométriale indispensable à la mise en route du travail.

Notre premier travail, ayant démontré les effets anti-apoptotiques de la leptine, soutient l'hypothèse d'un effet inhibiteur de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales vers un état d'hypertrophie et un phénotype contractile, puisque cette transition phénotypique semble coïncider avec une activation transitoire de l'apoptose [99]. De plus, plusieurs études ont montré l'implication de la leptine dans le contrôle du cycle et la différenciation cellulaires. Ainsi, les effets prolifératifs de la leptine ont été démontrés sur des cellules trophoblastiques [155] ainsi que sur des lignées cancéreuses de cellules endométriales [278] et mammaires [159]. D'autre part, la leptine est fortement exprimée dans des myoblastes humains indifférenciés [257] et Yu *et coll.* [258] ont montré sa capacité à inhiber la différenciation de myoblastes porcins.

Ainsi, nous proposons d'étudier les effets de la leptine sur la prolifération et sur la différenciation des cellules myométriales dans un contexte inflammatoire, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ces effets. Ce travail, en cours de réalisation, est mené sur des lignées primaires de cellules myométriales humaines, stimulées par une gamme de concentrations croissantes de leptine pendant 48 heures. Les effets de la leptine sur la prolifération cellulaire sont évalués par le nombre total et la proportion de cellules en phase S par cytométrie en flux. De plus, l'effet de la leptine sur l'expression des cyclines, protéines régulant le cycle cellulaire est étudié par Western Blotting.

Concernant les effets de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales, l'expression des protéines considérées comme marqueurs d'hypertrophie, telles que la γ -actine, la myosine, la desmine, la connexine-43 et le récepteur à l'ocytocine, sera étudiée par Western Blotting. Ces tests seront réalisés sur des cellules pré-stimulées par de l'IL-1 β , utilisé pour mimer l'inflammation. D'autre part, l'impact de ces stimulations sur l'apparition d'un phénotype contractile sera évalué *in vitro* par un test de contractilité sur matrice de collagène en réponse à l'ocytocine ainsi que par l'évaluation par immunofluorescence de la fonctionnalité des jonctions gap. Enfin, les voies de signalisation impliquées dans ces effets seront étudiées grâce à l'utilisation d'inhibiteur spécifique de chacune des voies activées.

Nous attendons de ce travail de compléter les connaissances sur les effets de la leptine sur les événements myométriaux de la parturition afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des troubles de l'accouchement chez les femmes enceintes obèses.

Le second volet des perspectives de ce travail est une étude clinique portant sur les mécanismes impliqués dans les accouchements post-termes chez les patientes obèses.

L'obésité maternelle est associée à une régulation complexe de l'accouchement. En effet, il est décrit que les dépassements de terme sont plus fréquents chez les femmes obèses [40, 44, 45]. Au contraire, d'autres études suggèrent que l'obésité maternelle est associée à une augmentation du risque de prématurité [40, 42, 47-49]. A l'exception de l'induction prématurée du travail pour raisons médicales, les mécanismes à l'origine de ces deux situations pathologiques restent partiellement méconnus.

La mise en route du travail est associée à une réaction inflammatoire systémique, avec une activation des neutrophiles et des monocytes circulants [61]. De plus, l'infiltration du myomètre par les leucocytes activés et la sécrétion par ces derniers de cytokines pro-inflammatoires génèrent une réaction inflammatoire locale, indispensable à la mise en route du travail [62, 65, 279].

Une seule étude s'est intéressée à l'impact de l'obésité maternelle sur la réponse inflammatoire systémique et locale (placentaire) associée à la parturition chez les femmes obèses à terme [280]. Challier *et coll.* [280] ont mis en évidence une inflammation systémique chez les patientes obèses, en rapportant une élévation des taux sériques d'IL-6 et de CRP ainsi que de l'expression génique d'IL-6, de TNF α et de CD68 (marqueur monocyttaire de différenciation macrophagique) dans les cellules mononuclées du sang périphérique de ces patientes [280]. De plus, cette étude a montré une augmentation de l'infiltration macrophagique et de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par ces derniers dans des placentas issus de femmes obèses par rapport à des tissus de femmes de poids normal. Cependant, l'impact de l'obésité maternelle sur l'infiltration leucocytaire du myomètre n'a jamais été étudié.

Dans ce contexte, le but de ce travail sera de rechercher si les accouchements post-termes chez les femmes obèses sont associés à une modification (i) de l'activation des leucocytes circulants, (ii) de l'infiltration du myomètre par ces cellules activées et (iii) des taux circulants et tissulaires de leptine et de cytokines pro-inflammatoires, par rapport aux femmes de poids normal.

Pour cela, nous proposons d'étudier chez des patientes obèses accouchant post-terme, les mécanismes inflammatoires systémiques et myométriaux associés à la mise en route du travail. Tout d'abord, la caractérisation et la quantification des leucocytes circulants activés seront

réalisées par cytométrie en flux, après marquage avec des anticorps spécifiques de chaque population leucocytaire. Le niveau d'activation leucocytaire sera évalué par l'expression des marqueurs à la surface des leucocytes (CD11a/b, CD62L, CD64) par cytométrie en flux. L'expression génique et protéique de marqueurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1) dans les leucocytes sera évaluée par RT-qPCR et Western Blotting, respectivement. Après isolement des neutrophiles, leur capacité de migration sera étudiée à l'aide d'une chambre de migration après stimulation par un agent chimiotactique de synthèse, la N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP). De la même façon, l'isolement et la mise en culture des cellules mononuclées du sang périphérique permettra de tester leur réactivité en réponse à divers stimuli (étude de la synthèse de MCP-1 en réponse à une stimulation par du LPS, par exemple).

En parallèle des expériences précédentes réalisées sur les leucocytes circulants, nous étudierons le niveau d'infiltration leucocytaire dans le myomètre et le type cellulaire impliqué. Pour cela, les tissus seront digérés à la collagénase, puis chaque population leucocytaire sera identifiée à l'aide d'anticorps spécifiques et quantifiée par cytométrie en flux. De plus, nous étudierons le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires de chaque population de leucocytes infiltrés, après isolement par tri magnétique.

Enfin, les taux circulants et myométriaux de leptine, d'IL-1 β , d'IL-6, de CRP ultrasensible, de MCP-1 et d'IL-8 seront dosés par ELISA.

Ce second travail nous apportera une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les troubles de l'accouchement post-terme chez les femmes obèses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* World Health Organ Tech Rep Ser, 2000, **894**, p. i-xii, 1-253.
- [2] Agrawal S, Van Dessel E, Akin F, et al. *Laparoscopic adjustable banded sleeve gastrectomy as a primary procedure for the super-super obese (body mass index > 60 kg/m²).* *Obes Surg*, 2010, **20**, p. 1161-3.
- [3] Alanis MC, Goodnight WH, Hill EG, et al. *Maternal super-obesity (body mass index > or = 50) and adverse pregnancy outcomes.* *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2010, **89**, p. 924-30.
- [4] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. *Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey.* *BMJ*, 2000, **320**, p. 1240-3.
- [5] Han TS, Sattar N, Lean M. *ABC of obesity. Assessment of obesity and its clinical implications.* *BMJ*, 2006, **333**, p. 695-8.
- [6] Kuehn BM. *Guideline for pregnancy weight gain offers targets for obese women.* *Jama*, 2009, **302**, p. 241-2.
- [7] Bessesen DH. *Update on obesity.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, **93**, p. 2027-34.
- [8] Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, et al. *Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010.* *JAMA*, 2012, **307**, p. 491-7.
- [9] Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, et al. *Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review.* *BMC Public Health*, 2008, **8**, p. 200.
- [10] Maillard G, Charles MA, Thibault N, et al. *Trends in the prevalence of obesity in the French adult population between 1980 and 1991.* *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999, **23**, p. 389-94.
- [11] INSERM., TNS-HEALTHCARE., ROCHE. *Obépi 2009 - enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité* 2009, [en ligne], [établi le 20/10/2009], Disponible sur: http://www.roche.fr/fmfiles/re7199006/cms2_cahiers_obesite/AttachedFile_10160.pdf.
- [12] Amouyel P. *Présentation des tous premiers résultats de l'étude Mona lisa.* [en ligne], [dernière mise à jour : 03/08/2011], Disponible sur: http://www.pasteur-lille.fr/fr/recherche/u744/resultat/dossier_presse_monalisa.pdf.
- [13] Chu SY, Kim SY, Bish CL. *Prepregnancy obesity prevalence in the United States, 2004-2005.* *Matern Child Health J*, 2009, **13**, p. 614-20.
- [14] Usha Kiran TS, Hemmadi S, Bethel J, et al. *Outcome of pregnancy in a woman with an increased body mass index.* *BJOG*, 2005, **112**, p. 768-72.
- [15] Zhang J, Bricker L, Wray S, et al. *Poor uterine contractility in obese women.* *BJOG*, 2007, **114**, p. 343-8.
- [16] Ducarme G, Rodrigues A, Aissaoui F, et al. *[Pregnancy in obese patients: which risks is it necessary to fear?].* *Gynecol Obstet Fertil*, 2007, **35**, p. 19-24.
- [17] Hamon C, Fanello S, Catala L, et al. *[Maternal obesity: effects on labor and delivery: Excluding other diseases that might modify obstetrical management].* *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2005, **34**, p. 109-14.
- [18] Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, et al. *Genes, lifestyles and obesity.* *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, **28 Suppl 3**, p. S29-36.
- [19] Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. *From monogenic to polygenic obesity: recent advances.* *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2010, **19**, p. 297-310.
- [20] Sobal J, Stunkard AJ. *Socioeconomic status and obesity: a review of the literature.* *Psychol Bull*, 1989, **105**, p. 260-75.
- [21] Despres JP, Lemieux I. *Abdominal obesity and metabolic syndrome.* *Nature*, 2006, **444**, p. 881-7.
- [22] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study.* *Circulation*, 2007, **116**, p. 39-48.
- [23] Chaston TB, Dixon JB. *Factors associated with percent change in visceral versus subcutaneous abdominal fat during weight loss: findings from a systematic review.* *Int J Obes (Lond)*, 2008, **32**, p. 619-28.
- [24] Drolet R, Richard C, Sniderman AD, et al. *Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women.* *Int J Obes (Lond)*, 2008, **32**, p. 283-91.

- [25] de Ferranti S, Mozaffarian D. *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. Clin Chem, 2008, **54**, p. 945-55.
- [26] Trayhurn P. *The biology of obesity*. Proc Nutr Soc, 2005, **64**, p. 31-8.
- [27] Trayhurn P, Wood IS. *Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity*. Biochem Soc Trans, 2005, **33**, p. 1078-81.
- [28] Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, **19**, p. 972-8.
- [29] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al. *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 1995, **95**, p. 2409-15.
- [30] Trayhurn P. *Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat*. Acta Physiol Scand, 2005, **184**, p. 285-93.
- [31] Rasouli N, Kern PA. *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008, **93**, p. S64-73.
- [32] Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003, **112**, p. 1796-808.
- [33] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003, **112**, p. 1821-30.
- [34] Chung S, Lapoint K, Martinez K, et al. *Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes*. Endocrinology, 2006, **147**, p. 5340-51.
- [35] Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss*. Diabetes, 2005, **54**, p. 2277-86.
- [36] Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. *Endocrinology of adipose tissue - an update*. Horm Metab Res, 2007, **39**, p. 314-21.
- [37] Lundgren CH, Brown SL, Nordt TK, et al. *Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease*. Circulation, 1996, **93**, p. 106-10.
- [38] Deruelle P. *[Obesity and pregnancy]*. Gynecol Obstet Fertil, 2011, **39**, p. 100-5.
- [39] Metwally M, Li TC, Ledger WL. *The impact of obesity on female reproductive function*. Obes Rev, 2007, **8**, p. 515-23.
- [40] Cedergren MI. *Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome*. Obstet Gynecol, 2004, **103**, p. 219-24.
- [41] Kumari AS. *Pregnancy outcome in women with morbid obesity*. Int J Gynaecol Obstet, 2001, **73**, p. 101-7.
- [42] Weiss JL, Malone FD, Emig D, et al. *Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study*. Am J Obstet Gynecol, 2004, **190**, p. 1091-7.
- [43] Robinson HE, O'Connell CM, Joseph KS, et al. *Maternal outcomes in pregnancies complicated by obesity*. Obstet Gynecol, 2005, **106**, p. 1357-64.
- [44] Denison FC, Price J, Graham C, et al. *Maternal obesity, length of gestation, risk of postdates pregnancy and spontaneous onset of labour at term*. BJOG, 2008, **115**, p. 720-5.
- [45] Vahratian A, Zhang J, Troendle JF, et al. *Maternal prepregnancy overweight and obesity and the pattern of labor progression in term nulliparous women*. Obstet Gynecol, 2004, **104**, p. 943-51.
- [46] Doherty DA, Magann EF, Francis J, et al. *Pre-pregnancy body mass index and pregnancy outcomes*. Int J Gynaecol Obstet, 2006, **95**, p. 242-7.
- [47] Baeten JM, Bukusi EA, Lambe M. *Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women*. Am J Public Health, 2001, **91**, p. 436-40.
- [48] Han YS, Ha EH, Park HS, et al. *Relationships between pregnancy outcomes, biochemical markers and pre-pregnancy body mass index*. Int J Obes (Lond), 2011, **35**, p. 570-7.
- [49] McDonald SD, Han Z, Mulla S, et al. *Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses*. BMJ, 2010, **341**, p. c3428.

- [50] Hendler I, Goldenberg RL, Mercer BM, *et al.* *The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth.* Am J Obstet Gynecol, 2005, **192**, p. 882-6.
- [51] Smith GC, Shah I, Pell JP, *et al.* *Maternal obesity in early pregnancy and risk of spontaneous and elective preterm deliveries: a retrospective cohort study.* Am J Public Health, 2007, **97**, p. 157-62.
- [52] Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, *et al.* *Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis.* JAMA, 2009, **301**, p. 636-50.
- [53] Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, *et al.* *Maternal obesity and risk for birth defects.* Pediatrics, 2003, **111**, p. 1152-8.
- [54] Martorell R, Stein AD, Schroeder DG. *Early nutrition and later adiposity.* J Nutr, 2001, **131**, p. 874S-880S.
- [55] Schack-Nielsen L, Michaelsen KF, Gamborg M, *et al.* *Gestational weight gain in relation to offspring body mass index and obesity from infancy through adulthood.* Int J Obes (Lond), 2010, **34**, p. 67-74.
- [56] Whitaker RC. *Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy.* Pediatrics, 2004, **114**, p. e29-36.
- [57] Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, *et al.* *Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity.* N Engl J Med, 1997, **337**, p. 869-73.
- [58] Mehats C, Schmitz T, Marcellin L, *et al.* *[Biochemistry of fetal membranes rupture.].* Gynecol Obstet Fertil, **39**, p. 365-369.
- [59] Smith R. *Parturition.* N Engl J Med, 2007, **356**, p. 271-83.
- [60] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, *et al.* *The preterm parturition syndrome.* BJOG, 2006, **113 Suppl 3**, p. 17-42.
- [61] Yuan M, Jordan F, McInnes IB, *et al.* *Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour.* Mol Hum Reprod, 2009, **15**, p. 713-24.
- [62] Osman I, Young A, Ledingham MA, *et al.* *Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term.* Mol Hum Reprod, 2003, **9**, p. 41-5.
- [63] Esplin MS, Peltier MR, Hamblin S, *et al.* *Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor.* Placenta, 2005, **26**, p. 661-71.
- [64] Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, *et al.* *Cell adhesion molecule expression in the cervix and myometrium during pregnancy and parturition.* Obstet Gynecol, 2001, **97**, p. 235-42.
- [65] Young A, Thomson AJ, Ledingham M, *et al.* *Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term.* Biol Reprod, 2002, **66**, p. 445-9.
- [66] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, *et al.* *Inflammation in preterm and term labour and delivery.* Semin Fetal Neonatal Med, 2006, **11**, p. 317-26.
- [67] Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, *et al.* *Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model.* Am J Obstet Gynecol, 2006, **195**, p. 1578-89.
- [68] Hirsch E, Filipovich Y, Mahendroo M. *Signaling via the type I IL-1 and TNF receptors is necessary for bacterially induced preterm labor in a murine model.* Am J Obstet Gynecol, 2006, **194**, p. 1334-40.
- [69] Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, *et al.* *Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys.* Am J Obstet Gynecol, 2003, **188**, p. 252-63.
- [70] Hanna N, Hanna I, Hleb M, *et al.* *Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts.* J Immunol, 2000, **164**, p. 5721-8.
- [71] Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, *et al.* *Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta.* Am J Reprod Immunol, 2006, **55**, p. 19-27.

- [72] Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, et al. *Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, **144 Suppl 1**, p. S2-10.
- [73] Curry TE, Jr., Osteen KG. *The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle.* Endocr Rev, 2003, **24**, p. 428-65.
- [74] Li W, Alfaidy N, Challis JR. *Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor.* J Clin Endocrinol Metab, 2004, **89**, p. 2897-904.
- [75] Roh CR, Oh WJ, Yoon BK, et al. *Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells.* Mol Hum Reprod, 2000, **6**, p. 96-102.
- [76] Watari M, Watari H, DiSanto ME, et al. *Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells.* Am J Pathol, 1999, **154**, p. 1755-62.
- [77] Schonbeck U, Mach F, Libby P. *Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing.* J Immunol, 1998, **161**, p. 3340-6.
- [78] Riley SC, Leask R, Denison FC, et al. *Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition.* J Endocrinol, 1999, **162**, p. 351-9.
- [79] Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. *Role of matrix metalloproteinases in preterm labour.* BJOG, 2005, **112 Suppl 1**, p. 19-22.
- [80] Athayde N, Edwin SS, Romero R, et al. *A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes.* Am J Obstet Gynecol, 1998, **179**, p. 1248-53.
- [81] Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, et al. *Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system.* Biol Reprod, 2002, **67**, p. 1952-8.
- [82] Mehats C, Schmitz T, Marcellin L, et al. *[Biochemistry of fetal membranes rupture.].* Gynecol Obstet Fertil, 2011, **39**, p. 365-369.
- [83] Osmer RG, Adelman-Grill BC, Rath W, et al. *Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition.* J Obstet Gynaecol (Tokyo 1995), 1995, **21**, p. 185-94.
- [84] Winkler M, Rath W. *Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition.* J Perinat Med, 1999, **27**, p. 45-60.
- [85] Choi SJ, Jung KL, Oh SY, et al. *Cervicovaginal matrix metalloproteinase-9 and cervical ripening in human term parturition.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, **142**, p. 43-7.
- [86] Stygar D, Wang H, Vladic YS, et al. *Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix.* Biol Reprod, 2002, **67**, p. 889-94.
- [87] Osmer RG, Blaser J, Kuhn W, et al. *Interleukin-8 synthesis and the onset of labor.* Obstet Gynecol, 1995, **86**, p. 223-9.
- [88] Ito A, Sato T, Iga T, et al. *Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts.* FEBS Lett, 1990, **269**, p. 93-5.
- [89] Sato T, Ito A, Mori Y. *Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts.* Biochem Biophys Res Commun, 1990, **170**, p. 824-9.
- [90] Fata JE, Ho AT, Leco KJ, et al. *Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors.* Cell Mol Life Sci, 2000, **57**, p. 77-95.
- [91] Monga M, Sanborn BM. *Uterine contractile activity. Introduction.* Semin Perinatol, 1995, **19**, p. 1-2.
- [92] Choi SJ, Oh S, Kim JH, et al. *Changes of nuclear factor kappa B (NF-kappaB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human myometrium before and during term labor.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2007, **132**, p. 182-8.

- [93] O'Brien M, O'Shaughnessy D, Ahamide E, et al. *Differential expression of the metalloproteinase MMP3 and the alpha5 integrin subunit in human myometrium at labour*. Mol Hum Reprod, 2007, **13**, p. 655-61.
- [94] Lirussi F, O'Brien M, Wendremaire M, et al. *SAR150640, a selective beta3-adrenoceptor agonist, prevents human myometrial remodelling and activation of matrix metalloproteinase in an in vitro model of chorioamnionitis*. Br J Pharmacol, 2010, **159**, p. 1354-66.
- [95] Gao F, Chen XL, Wei P, et al. *Expression of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -3 at the implantation site of rhesus monkey during the early stage of pregnancy*. Endocrine, 2001, **16**, p. 47-54.
- [96] Li QL, Illman SA, Wang HM, et al. *Matrix metalloproteinase-28 transcript and protein are expressed in rhesus monkey placenta during early pregnancy*. Mol Hum Reprod, 2003, **9**, p. 205-11.
- [97] Manase K, Endo T, Chida M, et al. *Coordinated elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution*. Reprod Biol Endocrinol, 2006, **4**, p. 32.
- [98] Shum JK, Melendez JA, Jeffrey JJ. *Serotonin-induced MMP-13 production is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and ERK1/2 in rat uterine smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2002, **277**, p. 42830-40.
- [99] Shynlova O, Oldenhof A, Dorogin A, et al. *Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation*. Biol Reprod, 2006, **74**, p. 839-49.
- [100] Charpigny G, Leroy MJ, Breuiller-Fouche M, et al. *A functional genomic study to identify differential gene expression in the preterm and term human myometrium*. Biol Reprod, 2003, **68**, p. 2289-96.
- [101] Bukowski R, Hankins GD, Saade GR, et al. *Labor-associated gene expression in the human uterine fundus, lower segment, and cervix*. PLoS Med, 2006, **3**, p. e169.
- [102] Havelock JC, Keller P, Muleba N, et al. *Human myometrial gene expression before and during parturition*. Biol Reprod, 2005, **72**, p. 707-19.
- [103] Leong AS, Norman JE, Smith R. *Vascular and myometrial changes in the human uterus at term*. Reprod Sci, 2008, **15**, p. 59-65.
- [104] Leppert PC. *Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone*. Am J Obstet Gynecol, 1998, **178**, p. 713-25.
- [105] Salamonsen LA. *Tissue injury and repair in the female human reproductive tract*. Reproduction, 2003, **125**, p. 301-11.
- [106] Lirussi F, Rakotoniaina Z, Madani S, et al. *ADRB3 adrenergic receptor is a key regulator of human myometrial apoptosis and inflammation during chorioamnionitis*. Biol Reprod, 2008, **78**, p. 497-505.
- [107] Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, et al. *Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells*. Biol Reprod, 2007, **76**, p. 769-76.
- [108] Mesiano S, Welsh TN. *Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition*. Semin Cell Dev Biol, 2007, **18**, p. 321-31.
- [109] Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, et al. *Inflammatory processes in preterm and term parturition*. J Reprod Immunol, 2008, **79**, p. 50-7.
- [110] Mitchell MD, Romero RJ, Edwin SS, et al. *Prostaglandins and parturition*. Reprod Fertil Dev, 1995, **7**, p. 623-32.
- [111] Olson DM, Mijovic JE, Sadowsky DW. *Control of human parturition*. Semin Perinatol, 1995, **19**, p. 52-63.
- [112] Lee SE, Romero R, Park IS, et al. *Amniotic fluid prostaglandin concentrations increase before the onset of spontaneous labor at term*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2008, **21**, p. 89-94.
- [113] Romero R, Baumann P, Gonzalez R, et al. *Amniotic fluid prostanoid concentrations increase early during the course of spontaneous labor at term*. Am J Obstet Gynecol, 1994, **171**, p. 1613-20.

- [114] Bry K, Hallman M. *Transforming growth factor-beta opposes the stimulatory effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on amnion cell prostaglandin E2 production: implication for preterm labor.* Am J Obstet Gynecol, 1992, **167**, p. 222-6.
- [115] Hertelendy F, Romero R, Molnar M, et al. *Cytokine-initiated signal transduction in human myometrial cells.* Am J Reprod Immunol, 1993, **30**, p. 49-57.
- [116] Lundin-Schiller S, Mitchell MD. *Prostaglandin production by human chorion laeve cells in response to inflammatory mediators.* Placenta, 1991, **12**, p. 353-63.
- [117] Mitchell MD, Edwin S, Romero RJ. *Prostaglandin biosynthesis by human decidual cells: effects of inflammatory mediators.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990, **41**, p. 35-8.
- [118] Romero R, Durum S, Dinarello CA, et al. *Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion.* Prostaglandins, 1989, **37**, p. 13-22.
- [119] Kniss DA. *Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology.* J Soc Gynecol Investig, 1999, **6**, p. 285-92.
- [120] Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, et al. *Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells.* Eur J Pharmacol, 1991, **192**, p. 189-91.
- [121] Dudley DJ, Edwin SS, Mitchell MD. *Macrophage inflammatory protein-1 alpha regulates prostaglandin E2 and interleukin-6 production by human gestational tissues in vitro.* J Soc Gynecol Investig, 1996, **3**, p. 12-6.
- [122] Sangha RK, Walton JC, Ensor CM, et al. *Immunohistochemical localization, messenger ribonucleic acid abundance, and activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in placenta and fetal membranes during term and preterm labor.* J Clin Endocrinol Metab, 1994, **78**, p. 982-9.
- [123] Brown NL, Alvi SA, Elder MG, et al. *Interleukin-1beta and bacterial endotoxin change the metabolism of prostaglandins E2 and F2alpha in intact term fetal membranes.* Placenta, 1998, **19**, p. 625-30.
- [124] Pomini F, Patel FA, Mancuso S, et al. *Activity and expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured chorionic trophoblast and villous trophoblast cells and in chorionic explants at term with and without spontaneous labor.* Am J Obstet Gynecol, 2000, **182**, p. 221-6.
- [125] Pomini F, Caruso A, Challis JR. *Interleukin-10 modifies the effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD+-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast and chorion trophoblast cells.* J Clin Endocrinol Metab, 1999, **84**, p. 4645-51.
- [126] Wathes DC, Borwick SC, Timmons PM, et al. *Oxytocin receptor expression in human term and preterm gestational tissues prior to and following the onset of labour.* J Endocrinol, 1999, **161**, p. 143-51.
- [127] Terzidou V, Blanks AM, Kim SH, et al. *Labor and inflammation increase the expression of oxytocin receptor in human amnion.* Biol Reprod, 2011, **84**, p. 546-52.
- [128] Phaneuf S, Europe-Finner GN, Varney M, et al. *Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in human myometrial cells: involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins.* J Endocrinol, 1993, **136**, p. 497-509.
- [129] Molnar M, Rigo J, Jr., Romero R, et al. *Oxytocin activates mitogen-activated protein kinase and up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human myometrial cells.* Am J Obstet Gynecol, 1999, **181**, p. 42-9.
- [130] Terzidou V, Lee Y, Lindstrom T, et al. *Regulation of the human oxytocin receptor by nuclear factor-kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta.* J Clin Endocrinol Metab, 2006, **91**, p. 2317-26.
- [131] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994, **372**, p. 425-32.
- [132] Ahima RS, Flier JS. *Leptin.* Annu Rev Physiol, 2000, **62**, p. 413-37.
- [133] Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, et al. *The biology of leptin: a review.* J Anim Sci, 1998, **76**, p. 1405-20.

- [134] Zhang F, Basinski MB, Beals JM, *et al.* Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 1997, **387**, p. 206-9.
- [135] Grasso P, Leinung MC, Ingher SP, *et al.* In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice: localization of leptin activity to domains between amino acid residues 106-140. *Endocrinology*, 1997, **138**, p. 1413-8.
- [136] Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, *et al.* Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, **3**, p. 716-24.
- [137] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1995, **1**, p. 1155-61.
- [138] Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, *et al.* Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **228**, p. 733-8.
- [139] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995, **83**, p. 1263-71.
- [140] Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, *et al.* Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*, 1996, **2**, p. 585-9.
- [141] Liu C, Liu XJ, Barry G, *et al.* Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor. *Endocrinology*, 1997, **138**, p. 3548-54.
- [142] Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*, 1997, **272**, p. 6093-6.
- [143] Li RH, Yu MM, Cheung AN, *et al.* Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol*, 2004, **95**, p. 299-306.
- [144] Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, *et al.* Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 1997, **272**, p. 32686-95.
- [145] Kastin AJ, Pan W, Maness LM, *et al.* Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides*, 1999, **20**, p. 1449-53.
- [146] Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 2006, **393**, p. 7-20.
- [147] Ge H, Huang L, Pourbahrami T, *et al.* Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 2002, **277**, p. 45898-903.
- [148] Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal*, 2002, **14**, p. 655-63.
- [149] Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, *et al.* STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, 2003, **421**, p. 856-9.
- [150] Shan J, Nguyen TB, Totary-Jain H, *et al.* Leptin-enhanced neointimal hyperplasia is reduced by mTOR and PI3K inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, p. 19006-11.
- [151] Mattioli B, Giordani L, Quaranta MG, *et al.* Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *FEBS Lett*, 2009, **583**, p. 1102-6.
- [152] Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, *et al.* IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*, 2000, **407**, p. 377-82.
- [153] Starr R, Willson TA, Viney EM, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 1997, **387**, p. 917-21.
- [154] Saxena NK, Titus MA, Ding X, *et al.* Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J*, 2004, **18**, p. 1612-4.
- [155] Magarinos MP, Sanchez-Margalet V, Kotler M, *et al.* Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod*, 2007, **76**, p. 203-10.
- [156] Saxena NK, Sharma D, Ding X, *et al.* Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 2007, **67**, p. 2497-507.
- [157] Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, *et al.* Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer*, 2006, **13**, p. 629-40.
- [158] Uddin S, Bu R, Ahmed M, *et al.* Leptin receptor expression and its association with PI3K/AKT signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2010, **51**, p. 1305-14.

- [159] Yin N, Wang D, Zhang H, et al. *Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin*. Cancer Res, 2004, **64**, p. 5870-5.
- [160] Perez-Perez A, Maymo J, Duenas JL, et al. *Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway*. Arch Biochem Biophys, 2008, **477**, p. 390-5.
- [161] Quinton ND, Laird SM, Tuckerman EM, et al. *Expression of leptin receptor isoforms in vitro: lack of effects of leptin on endometrial cytokine and MMP production*. Am J Reprod Immunol, 2003, **50**, p. 224-31.
- [162] Yeh WL, Lu DY, Lee MJ, et al. *Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production*. Glia, 2009, **57**, p. 454-64.
- [163] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, et al. *Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion*. Mol Hum Reprod, 2000, **6**, p. 951-8.
- [164] Lee MP, Madani S, Sekula D, et al. *Leptin increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and does not alter collagen production in rat glomerular mesangial cells*. Endocr Res, 2005, **31**, p. 27-37.
- [165] Madani S, De Girolamo S, Munoz DM, et al. *Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 2006, **69**, p. 716-25.
- [166] Cao Q, Mak KM, Lieber CS. *Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells*. J Hepatol, 2007, **46**, p. 124-33.
- [167] Bilbao MG, Di Yorio MP, Faletti AG. *Differential effects of leptin on ovarian metalloproteinases and their tissue inhibitors between in vivo and in vitro studies*. J Endocrinol, 2011, **209**, p. 65-74.
- [168] Cao Q, Mak KM, Ren C, et al. *Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H2O2-dependant MAPK pathways*. J Biol Chem, 2004, **279**, p. 4292-304.
- [169] Cao Q, Mak KM, Lieber CS. *Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H2O2-dependent MAPK pathways*. J Cell Biochem, 2006, **97**, p. 188-97.
- [170] Zibadi S, Cordova F, Slack EH, et al. *Leptin's regulation of obesity-induced cardiac extracellular matrix remodeling*. Cardiovasc Toxicol, 2011, **11**, p. 325-33.
- [171] Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, et al. *Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro*. Am J Obstet Gynecol, 2006, **195**, p. 504-9.
- [172] Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, et al. *Leptin causes vasodilation in humans*. Hypertens Res, 2002, **25**, p. 161-5.
- [173] Nickola MW, Wold LE, Colligan PB, et al. *Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO*. Hypertension, 2000, **36**, p. 501-5.
- [174] Singhal A, Farooqi IS, Cole TJ, et al. *Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease?* Circulation, 2002, **106**, p. 1919-24.
- [175] Nair P, Radford K, Fanat A, et al. *The effects of leptin on airway smooth muscle responses*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, **39**, p. 475-81.
- [176] Coleman DL. *Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice*. Diabetologia, 1973, **9**, p. 294-8.
- [177] Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. Cell, 1996, **84**, p. 491-5.
- [178] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995, **269**, p. 540-3.
- [179] Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996, **379**, p. 632-5.
- [180] Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, et al. *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. Nat Genet, 1996, **14**, p. 95-7.

- [181] O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, *et al.* Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology*, 2003, **144**, p. 3757-64.
- [182] Clement K, Vaisse C, Lahlou N, *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 1998, **392**, p. 398-401.
- [183] Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, *et al.* Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*, 2007, **356**, p. 237-47.
- [184] Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, *et al.* Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity. *Mol Genet Metab*, 2011, **102**, p. 461-4.
- [185] Considine RV, Considine EL, Williams CJ, *et al.* Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest*, 1995, **95**, p. 2986-8.
- [186] Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, *et al.* Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med*, 1995, **1**, p. 950-3.
- [187] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 1996, **334**, p. 292-5.
- [188] van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, *et al.* Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001, **25**, p. 1759-66.
- [189] Lin S, Thomas TC, Storlien LH, *et al.* Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, **24**, p. 639-46.
- [190] Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*, 1999, **20**, p. 1341-5.
- [191] Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, *et al.* Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, 1996, **348**, p. 159-61.
- [192] Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, *et al.* Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*, 1996, **2**, p. 589-93.
- [193] Liu ZJ, Bian J, Liu J, *et al.* Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Horm Metab Res*, 2007, **39**, p. 489-94.
- [194] Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, *et al.* Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*, 1996, **98**, p. 1277-82.
- [195] Ogier V, Ziegler O, Mejean L, *et al.* Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, **26**, p. 496-503.
- [196] van Dielen FM, van 't Veer C, Buurman WA, *et al.* Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**, p. 1708-16.
- [197] El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, *et al.* Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 2000, **105**, p. 1827-32.
- [198] Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, *et al.* Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1998, **1**, p. 619-25.
- [199] Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, *et al.* Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med*, 2004, **10**, p. 734-8.
- [200] Mori H, Hanada R, Hanada T, *et al.* Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med*, 2004, **10**, p. 739-43.
- [201] Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, *et al.* Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell*, 2002, **2**, p. 497-503.
- [202] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 1999, **283**, p. 1544-8.
- [203] Misra VK, Trudeau S. *The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy.* Obesity (Silver Spring), 2011, **19**, p. 416-21.
- [204] Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, *et al.* Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1997, **47**, p. 101-6.

- [205] Henson MC, Castracane VD, O'Neil JS, *et al.* *Serum leptin concentrations and expression of leptin transcripts in placental trophoblast with advancing baboon pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab, 1999, **84**, p. 2543-9.
- [206] Seeber RM, Smith JT, Waddell BJ. *Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat.* Biol Reprod, 2002, **66**, p. 1762-7.
- [207] Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, *et al.* *Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy.* Am J Obstet Gynecol, 1998, **178**, p. 1010-5.
- [208] Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. *The known and unknown of leptin in pregnancy.* Am J Obstet Gynecol, 2006, **194**, p. 1537-45.
- [209] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, *et al.* *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.* Nat Med, 1997, **3**, p. 1029-33.
- [210] Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. *Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term.* Obstet Gynecol, 1998, **92**, p. 1020-8.
- [211] Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, *et al.* *Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones.* Am J Obstet Gynecol, 1998, **179**, p. 1128-32.
- [212] Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, *et al.* *Placental leptin.* Rev Reprod, 2000, **5**, p. 18-24.
- [213] Linnemann K, Malek A, Sager R, *et al.* *Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 2000, **85**, p. 4298-301.
- [214] Yura S, Sagawa N, Ogawa Y, *et al.* *Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells.* J Clin Endocrinol Metab, 1998, **83**, p. 3609-14.
- [215] Farley DM, Choi J, Dudley DJ, *et al.* *Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity.* Placenta, 2010, **31**, p. 718-24.
- [216] Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, *et al.* *Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin.* J Clin Endocrinol Metab, 2001, **86**, p. 2409-13.
- [217] Jaquet D, Leger J, Levy-Marchal C, *et al.* *Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations.* J Clin Endocrinol Metab, 1998, **83**, p. 1243-6.
- [218] Akerman F, Lei ZM, Rao CV. *Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes.* Gynecol Endocrinol, 2002, **16**, p. 299-306.
- [219] Schubring C, Kiess W, Englaro P, *et al.* *Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight.* J Clin Endocrinol Metab, 1997, **82**, p. 1480-3.
- [220] Smith JT, Waddell BJ. *Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in ob-ra, ob-rb, and ob-re with gestational age and suppression by glucocorticoids.* Biol Reprod, 2002, **67**, p. 1204-10.
- [221] Edwards DE, Bohm RP, Jr., Purcell J, *et al.* *Two isoforms of the leptin receptor are enhanced in pregnancy-specific tissues and soluble leptin receptor is enhanced in maternal serum with advancing gestation in the baboon.* Biol Reprod, 2004, **71**, p. 1746-52.
- [222] Challier J, Galtier M, Bintein T, *et al.* *Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies.* Placenta, 2003, **24**, p. 92-9.
- [223] Lewandowski K, Horn R, O'Callaghan CJ, *et al.* *Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies.* J Clin Endocrinol Metab, 1999, **84**, p. 300-6.
- [224] Ladyman SR, Grattan DR. *Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat.* Endocrinology, 2005, **146**, p. 3868-74.
- [225] Szczepankiewicz D, Wojciechowicz T, Kaczmarek P, *et al.* *Leptin and its receptors in the course of pregnancy in the rat.* Int J Mol Med, 2006, **17**, p. 95-9.
- [226] Ladyman SR, Grattan DR. *Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy.* Endocrinology, 2004, **145**, p. 3704-11.

- [227] Butte NF. *Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus*. Am J Clin Nutr, 2000, **71**, p. 1256S-61S.
- [228] Maffei C, Moghetti P, Vettor R, et al. *Leptin concentration in newborns' cord blood: relationship to gender and growth-regulating hormones*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999, **23**, p. 943-7.
- [229] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, et al. *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, p. 11073-8.
- [230] Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997, **387**, p. 903-8.
- [231] Mounzih K, Qiu J, Ewart-Toland A, et al. *Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state*. Endocrinology, 1998, **139**, p. 5259-62.
- [232] Sagawa N, Mori T, Masuzaki H, et al. *Leptin production by hydatidiform mole*. Lancet, 1997, **350**, p. 1518-9.
- [233] Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, et al. *Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia*. J Clin Endocrinol Metab, 1998, **83**, p. 3225-9.
- [234] Ning Y, Williams MA, Muy-Rivera M, et al. *Relationship of maternal plasma leptin and risk of pre-eclampsia: a prospective study*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2004, **15**, p. 186-92.
- [235] Laml T, Hartmann BW, Preyer O, et al. *Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender in pregnancies complicated by pre-eclampsia*. Gynecol Endocrinol, 2000, **14**, p. 442-7.
- [236] Lepercq J, Catalano P, Hauguel de Mouzon S. *[Leptin in pregnancy: facts, questions and future]*. Gynecol Obstet Fertil, 2007, **35**, p. 89-95.
- [237] Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, et al. *Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin*. Diabetes, 1998, **47**, p. 847-50.
- [238] Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, et al. *Increased plasma leptin in gestational diabetes*. Diabetologia, 2001, **44**, p. 164-72.
- [239] Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, et al. *Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus*. Obstet Gynecol, 2004, **103**, p. 519-25.
- [240] Gross GA, Solenberger T, Philpott T, et al. *Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers*. Am J Perinatol, 1998, **15**, p. 243-7.
- [241] Maffei M, Volpe L, Di Cianni G, et al. *Plasma leptin levels in newborns from normal and diabetic mothers*. Horm Metab Res, 1998, **30**, p. 575-80.
- [242] Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, et al. *Organ culture of amniochorionic membrane in vitro*. Am J Reprod Immunol, 1994, **32**, p. 184-7.
- [243] Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. *Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy*. Arch Histol Jpn, 1978, **41**, p. 267-74.
- [244] Huda SS, Brodie LE, Sattar N. *Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences*. Semin Fetal Neonatal Med, 2010, **15**, p. 70-6.
- [245] Vahratian A. *Prevalence of overweight and obesity among women of childbearing age: results from the 2002 National Survey of Family Growth*. Matern Child Health J, 2009, **13**, p. 268-73.
- [246] Arrowsmith S, Wray S, Quenby S. *Maternal obesity and labour complications following induction of labour in prolonged pregnancy*. BJOG, 2011, **118**, p. 578-88.
- [247] Ovesen P, Rasmussen S, Kesmodel U. *Effect of prepregnancy maternal overweight and obesity on pregnancy outcome*. Obstet Gynecol, 2011, **118**, p. 305-12.
- [248] Hassan SS, Romero R, Haddad R, et al. *The transcriptome of the uterine cervix before and after spontaneous term parturition*. Am J Obstet Gynecol, 2006, **195**, p. 778-86.
- [249] Reti NG, Lappas M, Riley C, et al. *Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol, 2007, **196**, p. 484 e1-10.
- [250] Hendler I, Blackwell SC, Mehta SH, et al. *The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2005, **193**, p. 979-83.

- [251] Chen C, Chang YC, Liu CL, *et al.* *Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway.* *Endocr Relat Cancer*, 2007, **14**, p. 513-29.
- [252] McGaffin KR, Zou B, McTiernan CF, *et al.* *Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury.* *Cardiovasc Res*, 2009, **83**, p. 313-24.
- [253] Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, *et al.* *Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**, p. 1946-50.
- [254] Markowska A, Belloni AS, Rucinski M, *et al.* *Leptin and leptin receptor expression in the myometrium and uterine myomas: Is leptin involved in tumor development?* *Int J Oncol*, 2005, **27**, p. 1505-9.
- [255] Tanaka T, Umesaki N. *Leptin regulates the proliferation and apoptosis of human endometrial epithelial cells.* *Int J Mol Med*, 2008, **22**, p. 683-9.
- [256] Sirotkin AV, Mlyncek M, Makarevich AV, *et al.* *Leptin affects proliferation-, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells.* *Physiol Res*, 2008, **57**, p. 437-42.
- [257] Solberg R, Aas V, Thoresen GH, *et al.* *Leptin expression in human primary skeletal muscle cells is reduced during differentiation.* *J Cell Biochem*, 2005, **96**, p. 89-96.
- [258] Yu T, Luo G, Zhang L, *et al.* *Leptin promotes proliferation and inhibits differentiation in porcine skeletal myoblasts.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**, p. 13-21.
- [259] Higgins CA, Martin W, Anderson L, *et al.* *Maternal obesity and its relationship with spontaneous and oxytocin-induced contractility of human myometrium in vitro.* *Reprod Sci*, 2010, **17**, p. 177-85.
- [260] Schwalm H, Dubrauszky V. *The structure of the musculature of the human uterus--muscles and connective tissue.* *Am J Obstet Gynecol*, 1966, **94**, p. 391-404.
- [261] Demir-Weusten AY, Seval Y, Kaufmann P, *et al.* *Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta.* *Acta Histochem*, 2007, **109**, p. 403-12.
- [262] Xu P, Alfaidy N, Challis JR. *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**, p. 1353-61.
- [263] Weiss A, Goldman S, Shalev E. *The matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidua and fetal membranes.* *Front Biosci*, 2007, **12**, p. 649-59.
- [264] Maymon E, Romero R, Pacora P, *et al.* *Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection.* *Am J Obstet Gynecol*, 2000, **183**, p. 887-94.
- [265] Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, *et al.* *Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity.* *J Perinat Med*, 2003, **31**, p. 12-22.
- [266] Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, *et al.* *Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases.* *Mol Hum Reprod*, 2011, **17**, p. 637-52.
- [267] Fortunato SJ, LaFleur B, Menon R. *Collagenase-3 (MMP-13) in fetal membranes and amniotic fluid during pregnancy.* *Am J Reprod Immunol*, 2003, **49**, p. 120-5.
- [268] Wendremaire M, Bardou M, Peyronel C, *et al.* *Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis.* *Am J Obstet Gynecol*, 2011, **205**, p. 363 e1-9.
- [269] Koscica KL, Ananth CV, Placido J, *et al.* *The effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on inflammation-mediated preterm delivery.* *Am J Obstet Gynecol*, 2007, **196**, p. 551 e1-3.
- [270] Hui W, Litherland GJ, Elias MS, *et al.* *Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases.* *Ann Rheum Dis*, 2011, **71**, p. 455-62.
- [271] Schulz LC, Widmaier EP. *The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion.* *Biol Reprod*, 2004, **71**, p. 1963-7.

- [272] Cheng YC, Chen LM, Chang MH, *et al.* *Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells.* Mol Cell Biochem, 2009, **325**, p. 15-23.
- [273] Rossa C, Jr., Liu M, Bronson P, *et al.* *Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase.* J Endotoxin Res, 2007, **13**, p. 85-93.
- [274] Wolf K, Sandner P, Kurtz A, *et al.* *Messenger ribonucleic acid levels of collagenase (MMP-13) and matrilysin (MMP-7) in virgin, pregnant, and postpartum uterus and cervix of rat.* Endocrinology, 1996, **137**, p. 5429-34.
- [275] Taggart MJ, Morgan KG. *Regulation of the uterine contractile apparatus and cytoskeleton.* Semin Cell Dev Biol, 2007, **18**, p. 296-304.
- [276] Sanborn BM. *Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics.* Semin Cell Dev Biol, 2007, **18**, p. 305-14.
- [277] Tabb T, Thilander G, Grover A, *et al.* *An immunochemical and immunocytologic study of the increase in myometrial gap junctions (and connexin 43) in rats and humans during pregnancy.* Am J Obstet Gynecol, 1992, **167**, p. 559-67.
- [278] Catalano S, Giordano C, Rizza P, *et al.* *Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation.* J Cell Physiol, 2009, **218**, p. 490-500.
- [279] Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, *et al.* *Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor.* Biol Reprod, 2012, **86**, p. 39.
- [280] Challier JC, Basu S, Bintein T, *et al.* *Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta.* Placenta, 2008, **29**, p. 274-81.