

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

UFR de Médecine et de Pharmacie, INSERM U866, Lipides Nutrition Cancer

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Marina BARRICHON

Le 30 Septembre 2015

**Etude de l'influence de la leptine sur les mécanismes cellulaires de la mise en route du travail dans un modèle d'accouchement prématuré :
Approches pharmacologiques**

Directrice de thèse : Pr Monique DUMAS

Co-encadrant de thèse : Dr Frédéric LIRUSSI

Jury :

Pr Muriel DORET

Présidente du Jury

Pr Monique DUMAS

Directrice de thèse

Pr Carmen GARRIDO

Examineur

Dr Frédéric LIRUSSI

Co-encadrant

Dr Céline MEHATS

Rapporteur

Dr Zahra TANFIN

Rapporteur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements à mon Directeur de thèse, Madame le Professeur Monique DUMAS, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et avoir dirigé mon travail de thèse. Je la remercie pour son soutien et pour la grande liberté dont j'ai pu bénéficier dans mes choix, ce qui m'a permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également le Docteur Frédéric LIRUSSI, d'avoir co-encadré ce travail. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée et pour ses nombreux conseils lors de nos fréquents « tête-à-tête », durant lesquels j'ai beaucoup appris, mais jamais pleuré... Merci pour toutes ces heures consacrées à ce travail de recherche. Je suis à la fois très honorée et ravie d'avoir travaillé à ses côtés, car outre son appui scientifique, il a toujours été présent pour me soutenir et me conseiller tout au long de l'élaboration de cette thèse. Je le remercie pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome dans mon travail. J'ai été sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension et je le remercie pour tous ces moments partagés, aussi bien sur le plan professionnel que personnel (merci de m'avoir fait découvrir tes talents de cuisinier !!).

J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ces travaux. Je remercie Madame le Professeur Muriel DORET, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur et Présidente du jury. Je remercie Mesdames les Docteurs Zahra TANFIN et Céline MEHATS qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je les remercie pour le temps consacré à ce travail et pour leur participation à mon jury de thèse. Je remercie Madame le Docteur Carmen GARRIDO pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, m'avoir suivi dans le cadre de mon comité de suivi de thèse et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie pour tous vos précieux conseils.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Marc BARDOU pour avoir cru en moi. Je n'oublie pas que vous êtes le premier à m'avoir donné ma chance et je vous en suis très reconnaissante. Je

vous remercie également pour votre aide précieuse pour l'obtention d'échantillons humains auprès de la maternité du CHU de Dijon et de la clinique Sainte-Marthe.

Un merci tout particulier à Maeva, ma collègue et amie, pour avoir toujours été là pour moi, aussi bien dans la vie professionnelle que personnelle. Merci pour ton soutien dans les moments difficiles et tes précieux conseils qui m'ont aidée dans mes choix. Merci pour tes multiples encouragements et pour l'aide inconditionnelle que tu m'as apportée. J'espère poursuivre cette amitié encore longtemps (Ce qui devrait être possible si nous ne retombons pas enceinte en même temps...).

Merci à Tarik, pour le partage de ses connaissances scientifiques, pour son aide tout au long de ma thèse et pour tous ces cafés pris au Relay H. Je te remercie tout particulièrement de ne pas m'avoir abandonné à l'aéroport et de m'avoir « protégé » contre les « Tyler armés ». Merci pour tous ces moments de rires!

Un grand merci à toute l'équipe « Garrido » et plus particulièrement Maria, pour sa bonne humeur permanente et pour tout le temps passé à mes côtés à compter des cellules, changer des milieux, et tout cela en chanson... J'espère apprendre à te connaître davantage. Merci également à Clémentine et Romain pour avoir toujours veillé à ce que mon alimentation soit saine et équilibrée en m'apportant gâteaux et bonbons.... Merci pour toutes ces discussions partagées. Une petite dédicace à Margaux, nouveau membre de l'équipe du premier étage. Voilà, tu es dans les remerciements, tu ne peux plus m'eng.....! J'espère te connaître davantage.

Un grand merci à tous mes ami(e)s ; mes amies d'enfance Mathilde et Julie, aux infirmières Maud, Camille, Amandine, à mon amie Laura, aux couples Mike et Cha, Maud et Miloud, Irfan et Marie, Etienne et Sandrine, Mike et Arnaud, Ben et Gwen, à Pierre, et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour tous ces moments passés ensemble qui m'ont permis d'oublier un peu mes travaux de thèse. Merci pour votre soutien durant ses quatre années.

Merci à la famille FICHOT, Brigitte et Claude, ma seconde famille depuis maintenant plus de vingt ans. Merci aussi à Wilou pour tous nos moments de rire.

Merci à Nico, mon tonton préféré, pour nos bons moments passés à la campagne qui m'ont permis de décompresser et à lâcher prise. Merci pour toutes nos discussions et nos fous rires mais aussi pour toutes tes créations culinaires...

Je remercie également les plus petits qui auront su me faire sourire à chacune de leur visite; la petite reine des neiges Lena, les petits manouches de la Vingeanne Rudy et Laura, et le petit chevelu Liam.

Je tiens également à remercier ma famille ; ma mamounette et mon beau-papa pour m'avoir toujours épaulé dans cette rude aventure. Merci de votre soutien dans mes choix. Merci d'être tout simplement là, dans les bons comme dans les mauvais moments et d'avoir satisfait le moindre de mes caprices. Merci mon beau-papa pour avoir su me faire sourire même dans les moments les plus difficiles et pour tous tes bons petits plats. Merci maman pour avoir supporté mon sale caractère durant ces 27 années... Merci à vous deux d'être des parents et grands-parents géniaux qui ont toujours su m'épauler dans ma vie professionnelle et personnelle. Je vous aime.

Merci à mon fils Kéziah qui m'a permis de rentrer dans le vif du sujet !! Merci à toi pour m'avoir appris à être efficace dans mon travail en me tenant éveillée la nuit...en ne dormant que trois heures... Je te remercie pour ton si beau sourire et ta petite tête de crapule qui m'ont permis de tenir dans les moments les plus difficiles. Je t'aime mon p'tit bébé chat.

Enfin, je tiens à adresser un immense merci à mon chéri, Cédric, pour m'avoir soutenu et supporté durant ces quatre années. Merci pour ta patience et ta compréhension. Je te remercie de m'avoir accordé confiance et écoute à tout moment. Je te remercie aussi de m'avoir apporté ton équilibre, ta force tranquille et ton réconfort. Tu es un chéri et un papa extraordinaire. A moi de te soutenir dans la dernière ligne droite de ta nouvelle aventure ferroviaire! Je t'aime.

RESUME

Le développement de nouvelles stratégies de prise en charge de la Menace d'Accouchement Prématuré (MAP) constitue un enjeu important de Santé Publique, la seule stratégie disponible reposant sur l'inhibition des contractions utérines par des tocolytiques ne permettant pas de reporter l'accouchement de plus de 48 heures. Bien que les mécanismes physiopathologiques menant à la MAP restent mal élucidés, il a été établi que l'induction du travail s'accompagne d'une transition des cellules myométriales d'une phase proliférative vers une phase contractile. Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés au potentiel effet de la leptine, une hormone ayant été proposée pour avoir des propriétés tocolytiques, sur la prolifération et la différenciation des cellules myométriales. Nous avons mis en évidence que la leptine est capable d'induire une prolifération cellulaire, associée ou non à l'induction d'une signalisation pro-inflammatoire. En effet, la première partie de ce travail nous a permis de mettre en évidence que la leptine à 50 ng/ml est capable d'activer la voie de signalisation pro-inflammatoire IL-6R/NFκB, décrite pour jouer un rôle dans la mise en route du travail alors que la leptine à 6.25 ng/ml stimule la voie de signalisation OB-R/ERK1/2, en faveur de la prolifération cellulaire. De plus, des résultats préliminaires sur la différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie ont suggéré que la leptine à 6.25 ng/ml est capable de s'opposer à cette transition alors que la leptine à 50 ng/ml induit une réorganisation du cytosquelette, une synthèse des protéines COX2 et Cx43, ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique, étapes indispensables à la genèse de contractions myométriales. Ce travail apporte ainsi un argument supplémentaire en faveur d'un potentiel rôle de la leptine dans la prévention de la MAP, en maintenant les cellules dans un état prolifératif et en s'opposant à leur différenciation. De plus, ce travail fournit de nouvelles informations quant à la compréhension des différents troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses, une association entre obésité maternelle et dépassements de terme ou à l'inverse, accouchements prématurés, ayant été mise en évidence.

Mots clés : leptine, obésité, accouchement, cellules myométriales, prolifération, différenciation

ABSTRACT

Maternal obesity is associated with a wide spectrum of adverse pregnancy outcomes leading to higher rates of postdate pregnancies or preterm deliveries. Finding new strategies for the management of the Threat of Preterm Labor (TPL) is an important Public Health issue. Indeed, the only available strategy, the use of tocolytic drugs to inhibit uterine contractions, does not allow delaying parturition for more than 48 hours. The physio-pathological mechanisms leading to TPL remain poorly understood, but it has been shown that labor onset is associated with a remodeling of the utero-placental sphere along with a phenotypic switch of myometrial smooth muscle cell from a proliferative to a contractile phenotype. In this work, we investigated the effect of leptin, an adipokine synthesized by the placenta during pregnancy and that has been proposed for the management of preterm labor, as it is able to prevent *in vitro* uterine contractility, on human myometrial cell proliferation and differentiation. In this work, we demonstrated that leptin induces myometrial cell proliferation, with or without the induction of pro-inflammatory signaling. Indeed, we highlight that leptin at 50 ng/ml is able to activate IL-6R/NFκB pro-inflammatory pathway described to play a role in the onset of labor while leptin at 6.25 ng/ml stimulates OB-R/ERK1/2 signaling pathway, leading to cell proliferation. In addition, preliminary results on myometrial cell differentiation have suggested that leptin at 6.25 ng/ml is able to oppose this transition to a hypertrophic state, whereas leptin at 50 ng/ml induces cytoskeletal reorganization, COX2 and Cx43 protein expression and increased calcium influx, leading to effective myometrial contractions. At 25 ng/ml, leptin inhibits cell proliferation and does not seem to trigger the different steps preceding contractions. Finally, this work emphasizes the potential value of leptin in the pharmacological management of TPL and it also strengthens the hypothesis that leptin might be a contributory factor in the delivery disorders observed in obese women.

Keywords: leptin, obesity, delivery, myometrial cells, proliferation, differentiation

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES.....	13
ABREVIATIONS.....	14
INTRODUCTION.....	17
PARTIE I : L'ACCOUCHEMENT PREMATURE	17
I. Définition	17
II. Epidémiologie	18
III. Physiologie du travail.....	19
1. Généralités	19
2. Organisation de la sphère utéroplacentaire	19
a. Utérus.....	19
b. Membranes fœtales.....	21
c. Placenta.....	22
IV. Causes d'accouchement prématuré	24
1. Accouchement induit	24
2. Accouchement spontané.....	24
a. Chorioamniotite : principale cause d'accouchement prématuré spontané avec membranes intactes.....	25
b. Rupture prématurée des membranes fœtales (RPM).....	26
3. Facteurs de risque	27
V. Complications associées à la prématurité	28
VI. Prise en charge de l'accouchement prématuré : les tocolytiques.....	29
1. Les inhibiteurs calciques.....	30
2. Les β 2-mimétiques	30
3. L'antagoniste du récepteur à l'ocytocine.....	31
4. Le sulfate de magnésium.....	31
PARTIE II : MECANISMES DE L'ACCOUCHEMENT	33
I. Remodelage des tissus gestationnels	33
1. Rupture des membranes fœtales.....	34
2. Dilatation du col	35
3. Contraction du myomètre	36

a.	Ultrastructure des cellules myométriales	37
b.	Contractions myométriales efficaces	39
i.	Organisation de l'appareil contractile	39
ii.	Bases moléculaires de la contraction myométriale	40
iii.	Régulation de l'interaction actine/myosine	45
iv.	Synchronisation des cellules myométriales	46
II.	Rôle de l'inflammation dans la mise en route du travail	47
1.	Acteur cellulaire.....	47
2.	Acteurs moléculaires	48
a.	Cytokines pro-inflammatoires.....	49
b.	Stress oxydant	51
c.	Signalisation associée à l'inflammation: NFκB	53
3.	Modification du statut phénotypique des cellules myométriales	56
a.	Phase d'hyperplasie associée à la quiescence utérine.....	57
b.	Transition en phase d'hypertrophie associée au remodelage utérin	60
PARTIE III : OBESITE ET TROUBLES DE L'ACCOUCHEMENT.....		63
I.	Obésité.....	63
1.	Généralités	63
a.	Définition.....	63
b.	Prévalence de l'obésité	65
2.	Physiopathologie de l'obésité	66
a.	Expansion du tissu adipeux	66
b.	Rôle endocrine du tissu adipeux	67
i.	Adipokines pro-inflammatoires.....	67
ii.	Adipokines anti-inflammatoires.....	68
II.	Conséquences de l'obésité chez la femme enceinte	69
1.	Troubles de la fécondité.....	70
2.	Troubles de la grossesse.....	70
3.	Troubles de l'accouchement	71
a.	Accouchements prématurés	71
b.	Accouchements post-terme	72
PARTIE IV : LA LEPTINE ET SES RECEPTEURS.....		75
I.	La leptine.....	75
1.	Généralités	75

2.	Fonction principale.....	76
a.	Fonction principale.....	76
b.	Autres fonctions.....	77
3.	Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine.....	78
II.	Récepteurs à la leptine.....	80
1.	Généralités.....	80
2.	Structure et distribution tissulaire des récepteurs à la leptine.....	80
a.	Structure des récepteurs.....	80
i.	Isoforme longue OB-RL du récepteur.....	81
ii.	Isoformes courtes OB-RS du récepteur.....	81
iii.	Isoforme soluble OB-Rsol du récepteur.....	81
b.	Distribution tissulaire des récepteurs.....	82
III.	Voies de signalisation.....	83
1.	Dimérisation et internalisation du récepteur.....	83
2.	Voies de signalisation.....	83
a.	Voie de signalisation JAK/STAT.....	84
b.	Voie de signalisation des MAPK.....	85
c.	Voie de signalisation PI3K/AKT.....	85
d.	Autre voie de signalisation.....	86
3.	Régulateurs négatifs des voies de signalisation.....	87
IV.	Leptine et fonctions biologiques.....	88
1.	Hyperleptinémie.....	88
2.	Résistance à la leptine.....	89
V.	Leptine et grossesse.....	91
1.	Variation du taux de leptine pendant la grossesse.....	91
a.	Leptine maternelle.....	91
b.	Leptine placentaire.....	93
c.	Leptine fœtale.....	94
d.	Expression des récepteurs à la leptine pendant la grossesse.....	95
2.	Rôle de la leptine pendant la grossesse.....	96
a.	Chez la mère.....	96
b.	Au niveau placentaire.....	96
c.	Chez le fœtus.....	98
3.	Effets de la leptine sur les différentes phases de l'accouchement.....	98

a.	Phase de prolifération	99
b.	Phase d'hypertrophie	101
c.	Phase de contractions utérines	102
OBJECTIFS		103
MATERIEL ET METHODES		104
I.	Drogues utilisées	104
II.	Recueil des prélèvements	104
III.	Culture cellulaire	105
1.	Culture primaire de cellules myométriales humaines.....	105
2.	Culture primaire et différenciation de monocytes humains	106
a.	Purification des PBMC sur Ficoll	106
b.	Sélection des monocytes par adhésion différentielle	107
c.	Mise en culture et différenciation des monocytes en macrophages.....	107
3.	Culture et différenciation des cellules immortalisées THP-1	108
4.	Co-cultures cellules myométriales/macrophages	108
IV.	Protocoles de stimulation	110
1.	Projet leptine et prolifération	110
a.	Etude de la prolifération cellulaire et de la phase du cycle impliquée	110
b.	Etude des voies de signalisation.....	111
2.	Projet leptine et différenciation des cellules myométriales	112
V.	Cytométrie en flux	113
VI.	Western blot	114
1.	Extraction et dosage protéiques	114
2.	Western blot.....	114
VII.	Immunofluorescence	116
1.	Immunomarquages	116
2.	Marquage DAPI.....	116
VIII.	Tests fonctionnels	117
1.	Test de communication intercellulaire: Lucifer yellow	117
2.	Test de signalisation calcique : Imagerie calcique.....	117
3.	Test de contractilité : Matrices de collagène	118
IX.	Interaction protéine/protéine (Octet)	118
X.	Dosages ELISA	119
1.	Dosage OB-Rsol	119

2. Dosage IL-6	120
XI. Analyse statistique	121
RESULTATS.....	122
PARTIE I : PROJET LEPTINE ET PROLIFERATION DES CELLULES MYOMETRIALES HUMAINES	122
I. Introduction article I	122
II. Article I.....	123
III. Conclusion article I.....	141
PARTIE II : PROJET LEPTINE ET DIFFERENCIATION DES CELLULES MYOMETRIALES HUMAINES	144
I. Introduction article II	144
II. Résultats article II.....	147
III. Conclusion article II.....	156
CONCLUSION GENERALE.....	159
PERSPECTIVES	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164
ANNEXES.....	182
I. Articles	182
II. Communications orales	183
III. Communications affichées.....	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des adultes en fonction de l'IMC selon l'OMS.....	64
Tableau 2 : Recommandation de l'institution de Médecine sur la prise de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC.....	64
Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette étude.....	115

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification de la prématurité en fonction de l'âge gestationnel.....	17
Figure 2 : Organisation de la sphère utéro-placentaire	23
Figure 3 : Remodelage des tissus gestationnels lors de la mise en route du travail.....	34
Figure 4 : Relaxation et contraction des cellules myométriales humaines.....	44
Figure 5 : Voie de signalisation canonique de NFκB.....	55
Figure 6 : Phases du cycle cellulaire	58
Figure 7 : Transition des cellules myométriales en phase d'hypertrophie	61
Figure 8 : Adipokines sécrétées par le tissu adipeux.....	69
Figure 9 : Rôle pléiotropique de la leptine	78
Figure 10 : Les différentes isoformes du récepteur à la leptine	82
Figure 11 : Principales voies de signalisation couplées au récepteur à la leptine	87
Figure 12 : Evolution des concentrations plasmatiques de leptine au cours de la grossesse.	92
Figure 13 : Protocole de co-culture cellules myométriales/macrophages	109

ABREVIATIONS

aa: acide aminé	COX: Cyclo-oxygénase
ADU: Unité Densitométrique Arbitraire	CRE: cAMP Responsive Element
AgRP: Agouti-Related Peptide	CRH: Cytokin Receptor Homology
AMM: Autorisation de Mise sur le Marché	CRP: C-Reactive Protein
AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique	Cx43: Connexine 43
AMPK: AMP-Activated Protein Kinase	CXCL12: C-X-C motif chemokine 12
BAX: BCL2-Associated X protein	DAG: DiAcylGlycérol
BCL2: B-Cell Lymphoma 2	DAPI: 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique	DIO: Diet-Induced Obesity
BSA: Albumine Sérique Bovine	DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium
CaM: Calmoduline	ERK: Extracellular signal Regulated Kinase
CAPs: Contraction-Associated Proteins	GMPc: Guanosine Monophosphate cyclique
CART: Cocaine and Amphetamine Related Transcript	GPCR: G-protein coupled receptor
CDK: Cycline Dependent Kinase	Grb2: Growth factor receptor binding protein
CHU: Centre Hospitalier Universitaire	GRE: Glucocorticoïdes Responsive Element
CICR: Calcium-Induced-Calcium Release	HSP: Heat Shock Protein
	ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

IICR: Inositol triphosphate Induced-Calcium-Release

IKK: IκB Kinase

IL: Interleukine

IL-6R: Interleukin-6 receptor

IMC: Indice de Masse Corporelle

IOM: Institute of Medicine

IP3: inositol triphosphate

IRS: Insulin Receptor Substrate

JAK: Janus Kinase

LPS: Lipopolysaccharide

MAP: Menace d'Accouchement Prématuré

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCP1: Monocyte Chemoattractant Protein-1

MEK: Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase

MLC: Myosin Light Chain

MLCK: Myosin Light Chain Kinase

MLCP: Myosin Light Chain Phosphatase

MMPs: Matrix MetalloProteinases

mTor: Mammalian Target Of Rapamycine

NAC: N-Acétyl Cystéine

NEMO: NFκB Essential MODulator

NFκB: Nuclear Factor-kappa B

NO: Monoxyde d'azote

NPY: NeuroPeptide Y

OB-R: Récepteur à la leptine

OB-RL: Isoforme longue de OB-R

OB-RS: Isoforme courte de OB-R

OB-Rsol: Isoforme soluble de OB-R

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OXTR: Oxytocine Receptor

PBMC: Peripheral Blood mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDE-1: Phosphodiesterase-1

PKC1: Phosphoinositide-Dependent Kinase 1

PFA: Paraformaldéhyde

PG: Prostaglandine

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase	SA: Semaine d'Aménorrhée
PIP3: Phosphatidylinositol triphosphate	SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
PKA: Protein Kinase A	SHP-2: SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase
PKB: Protein Kinase B	SNAT: System A sodium dependant neutral amino acids transport
PKC: Protein Kinase C	SOCS3: Suppressor of Cytokine Signalling-3
PKG: Protein Kinase G	SOD: SuperOxide Dismutase
PLC: Phospholipase C	SOS: Son of Sevenless
PLE3: Placental Leptin Enhancer Element 3	SP-1: Specificity Protein-1
POMC: Pro-OpioMelanoCortine	STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B	TBS-T: Tris-Buffered Saline – 0,1% Tween-20
RCIU: Retard de Croissance Intra-Utérin	TIMPs: Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
RHD: Rel Homology Domain	TNF: Tumor Necrosis Factor
ROC: Receptor Operated Channels	VOC: Voltage Operated Channels
ROS: Reactive Oxygen Species	
RPM: Rupture Prématurée des Membranes	
RyR: Ryanodine Receptor	

INTRODUCTION

PARTIE I : L'ACCOUCHEMENT PREMATURE

I. Définition

Une naissance prématurée est définie, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme « toute naissance vivante survenant avant 37 semaines d'aménorrhée (SA) révolues, mais supérieure à 22 SA, et d'un poids de naissance supérieur à 500g » ; la durée normale d'une grossesse menée à terme étant de 40 à 41 SA [1].

Il existe une classification de la prématurité selon l'âge gestationnel, déterminant quatre degrés de prématurité (Figure 1). On distingue ainsi la prématurité tardive (de 34 à 37 SA, 60% des naissances prématurées) ; la prématurité modérée (de 32 à 34 SA, 20% des naissances prématurées) ; la grande prématurité (de 28 à 32 SA, 15% des naissances prématurées) et la prématurité extrême (avant 28 SA, 5% des naissances prématurées) [1-2].

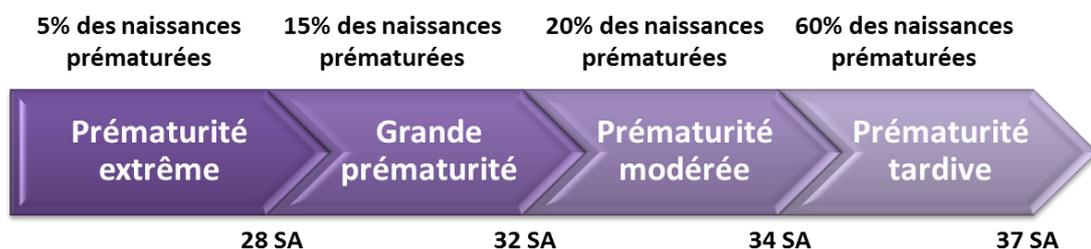


Figure 1 : Classification de la prématurité en fonction de l'âge gestationnel [1-2].

II. Epidémiologie

La prématurité est un problème majeur de Santé Publique puisqu'elle est responsable de 75% de la mortalité périnatale et de 50% de la morbidité infantile à long terme [2]. En effet, elle constitue la première cause de mortalité néonatale et la deuxième cause majeure de décès chez les enfants de moins de cinq ans, après la pneumonie [1].

D'après l'OMS, la prévalence mondiale de la prématurité est estimée à 15 millions de naissances, soit environ 10% des naissances totales, et serait responsable de plus d'un million de décès chaque année [1]. Plus de 60% des naissances prématurées surviennent en Afrique et en Asie du Sud. Dans les pays les plus pauvres, on observe une moyenne de 12% de nouveau-nés prématurés, contre 9% dans les pays à revenus plus élevés [1]. En Europe, on estime qu'environ 7% des naissances sont prématurées [3], taux globalement plus faible que celui retrouvé aux Etats-Unis, où la prématurité touche 12 à 13% des naissances [4]. En France, la prématurité touche 6,6% des naissances vivantes, soit environ 60 000 enfants par an. Ainsi, chaque année, 35 000 enfants naissent entre 35 et 36 SA, 13 000 entre 32 et 34 SA et 13 000 avant 32 SA [5]. Ce taux est en augmentation régulière et place la France au 10^{ème} rang européen.

Au cours des vingt dernières années, la prévalence de la prématurité n'a cessé d'augmenter. Diverses raisons permettent d'expliquer ce phénomène, notamment l'augmentation de l'âge maternel et des pathologies gestationnelles associées telles que le diabète et l'hypertension, ainsi que l'utilisation accrue de traitements contre l'infertilité entraînant des taux plus élevés de grossesses multiples. D'autre part, l'amélioration de la prise en charge des prématurés serait associée à une augmentation de la prématurité induite pour raison médicale [2].

III. Physiologie du travail

1. Généralités

Le travail, qu'il soit prématuré ou à terme, est défini par une association de modifications cervicales (modifications du col en terme de longueur, consistance et dilatation) et de contractions utérines douloureuses et régulières (au moins une contraction toutes les cinq minutes, durée de 30 secondes minimum) qui conduiront à la mise en route du travail [6].

La mise en route du travail nécessite donc une activité pleinement contractile de l'utérus, précédée par la dilatation du col utérin et la rupture des membranes fœtales. L'initiation de ces phénomènes nécessite un remaniement important de la sphère utéro-placentaire en fin de grossesse. Bien que les mécanismes menant à l'induction du travail restent peu connus, il est maintenant clairement admis que la mise en route du travail, qu'elle soit prématurée ou non, est associée à une réaction inflammatoire au niveau des tissus gestationnels. En effet, l'initiation du travail est associée à une migration des leucocytes et des macrophages au niveau de la sphère utéro-placentaire menant à une sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires.

2. Organisation de la sphère utéroplacentaire

a. Utérus

L'utérus est un organe creux de l'appareil génital féminin, situé au centre de la cavité pelvienne, au-dessus du vagin, entre la vessie et le rectum. Il joue un rôle primordial dans les différentes étapes de la reproduction (cycle, fécondation, gestation, accouchement) et subit ainsi d'importantes transformations morphologiques et fonctionnelles, notamment au cours de la grossesse. En effet, pendant la grossesse, l'utérus croît de sa taille non gravide de 7,5 x 5,0 x 2,5 cm à

28 x 24 x 21 cm. Son poids passe de 30-60 g à 1000 g en fin de grossesse. C'est un organe en forme de poire à sommet inférieur, revêtu de péritoine dans sa plus grande partie. Il est constitué de deux parties séparées par l'isthme [7].

La partie supérieure est constituée de deux parties ; le fond et le corps de l'utérus. Le fond de l'utérus est la partie surplombant l'ouverture des deux trompes utérines ou trompes de Fallope. Le corps, situé entre les ouvertures des trompes utérines et l'isthme, possède des parois épaisses et constitue la principale partie contractile de l'utérus. Au cours du travail, ses contractions poussent le fœtus vers le bas, distendent le segment inférieur de l'utérus et dilatent le col. La partie inférieure de l'utérus, appelée col ou cervix, est une région étroite et cylindrique. Il est constitué d'un canal avec un orifice interne en haut, le séparant de la cavité utérine, et un orifice externe en bas, qui constitue la jonction avec le vagin. L'isthme est une petite partie resserrée de l'utérus, se situant au-dessus de l'orifice interne du col [8].

La paroi utérine est constituée de trois couches ; une couche séreuse extérieure de recouvrement (périmètre), une couche moyenne, épaisse, constituée de fibres musculaires (myomètre) et une couche muqueuse interne constituée de glandes et de stroma de soutien, directement ancrée au myomètre (endomètre). La couche séreuse péritonéale recouvre l'utérus et s'étend pour former les ligaments larges qui maintiennent l'utérus dans la cavité pelvienne. L'endomètre, très vascularisé, subit d'importantes modifications structurales durant la gestation. Enfin le myomètre, principalement formée de fibres musculaires lisses arrangées en faisceaux entrecroisés, intriquées dans des lames de tissu conjonctif, a un rôle de soutien et participe à la transmission des forces contractiles engendrées par les cellules musculaires lisses. 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 englobe également le système vasculaire et nerveux ainsi que d'autres types cellulaires, les fibroblastes. Le myomètre est constitué de trois couches: une couche interne ou circulaire, composée de fibres musculaires orientées

parallèlement au stroma endométrial, formant un anneau entourant la cavité utérine ; une couche intermédiaire, très vascularisée, dont les fibres sont entrelacées et dans laquelle cheminent les vaisseaux sanguins ; une couche externe ou longitudinale, épaisse au niveau du fond utérin, qui s'affine au niveau du col. De nombreuses anastomoses entre les faisceaux de fibres des différentes couches assurent leur cohésion [8].

b. Membranes fœtales

Les membranes fœtales, constituant une interface entre la mère et le fœtus, tapissent la cavité amniotique et contiennent le fœtus ainsi que le liquide amniotique (Figure 2). Elles ont une structure pluristratifiée particulière leur conférant la capacité de se distendre, leur permettant ainsi de s'adapter à l'expansion du volume fœtal et amniotique liée au déroulement normal de la grossesse. Elles jouent un rôle d'absorption des chocs, de protection vis-à-vis des infections, et d'échanges/communications entre la mère et le fœtus [9-10].

Les membranes fœtales sont composées d'une juxtaposition de trois structures : deux feuillets accolés, l'amnios et le chorion, d'origine fœtale, et la décidue, d'origine maternelle (Figure 2). L'amnios, membrane la plus interne, au contact du liquide amniotique, ne contient ni vaisseaux ni terminaison nerveuse. Il est riche en collagène, lui conférant ainsi une grande solidité et élasticité. Son rôle est d'assurer le renouvellement du liquide amniotique. Le chorion, membrane la plus externe, non vascularisé, est en contact étroit avec la décidue avec laquelle il forme l'interface fœto-maternelle. 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. Il existe ainsi une interface entre le chorion et la décidue, permettant la diffusion de nutriments du versant maternel vers le versant fœtal. Difficilement dissociables, ils sont souvent désignés sous le terme de chorio-décidue. La décidue est composée de

cellules maternelles et d'un abondant tissu extracellulaire. Une zone intermédiaire, appelée couche spongieuse, sépare l'amnios du chorion, [9-10].

c. Placenta

Le placenta représente une interface d'échange entre la mère et le fœtus. Il comprend une face maternelle et une phase fœtale ou choriale recouverte par l'amnios. Il se situe à distance du col et on retrouve en son centre le cordon ombilical, comprenant une veine et deux artères, incluses dans un réseau fibrillaire conjonctif, le tout entouré d'une gaine amniotique (Figure 2). En raison de l'organisation vasculaire et de sa composante endocrine, le placenta est l'organe qui assure d'une part les échanges respiratoires et métaboliques du fœtus avec l'organisme maternel et d'autre part permet le développement et le fonctionnement des structures indispensables au maintien de la grossesse. Il joue également un rôle dans la protection fœtale contre les agressions infectieuses et toxiques. Le placenta au terme de la grossesse mesure 20 cm de diamètre, 3 cm d'épaisseur et pèse environ 500 g [10].

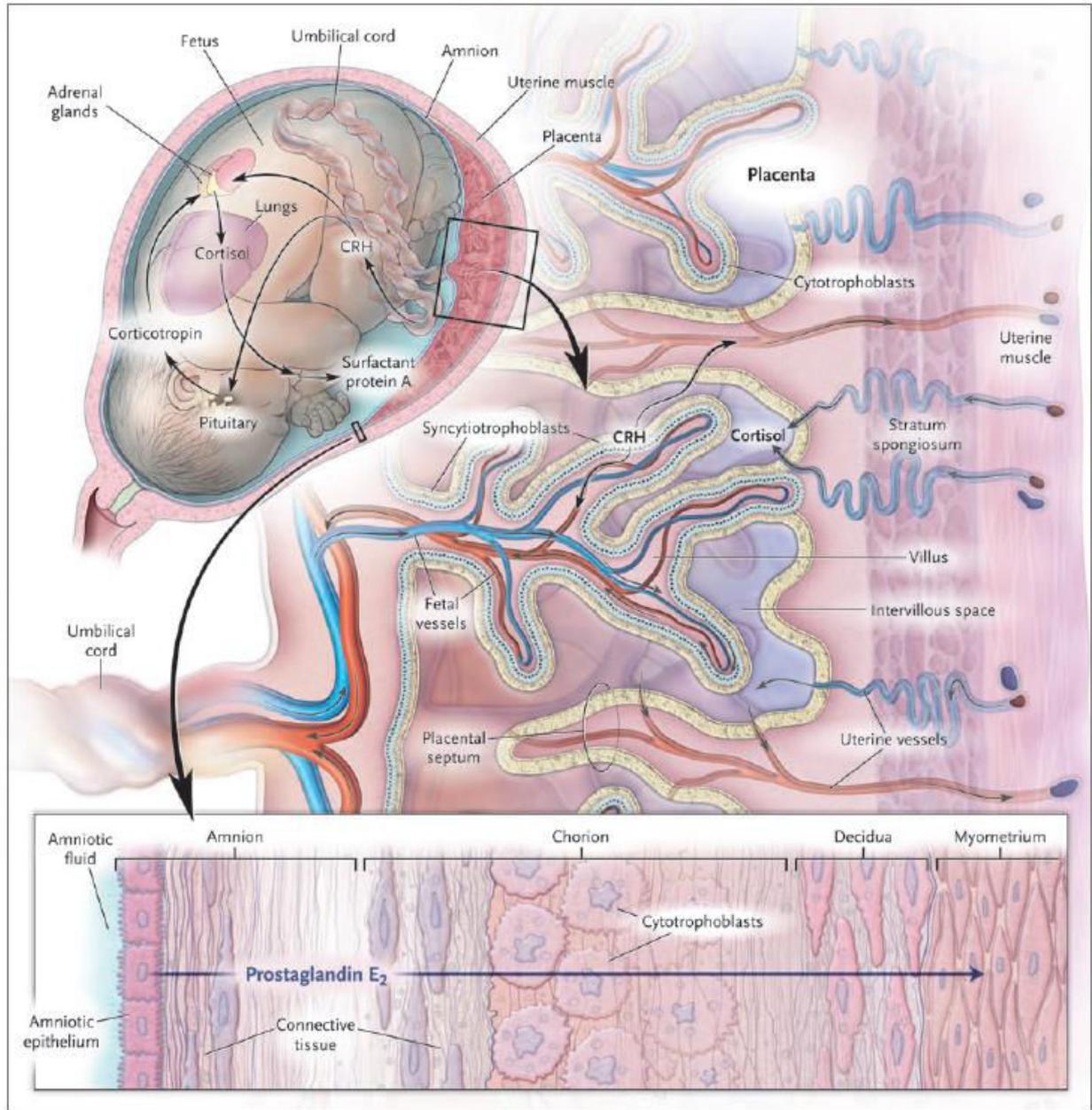


Figure 2 : Organisation de la sphère utéro-placentaire [10]

IV. Causes d'accouchement prématuré

Les causes d'accouchements prématurés peuvent être classés en deux grandes catégories ; les accouchements induits, pour raisons médicales, et les accouchements spontanés, avec ou sans rupture des membranes fœtales.

1. Accouchement induit

La prématurité induite représente environ 20% des naissances prématurées [3]. Elle est la conséquence d'une décision médicale, motivée par une situation obstétricale pouvant mettre en jeu le pronostic vital maternel et/ou fœtal et nécessitant ainsi une naissance rapide. Les pathologies rencontrées sont essentiellement le retard de croissance intra-utérin (RCIU), la pré-éclampsie, le placenta prævia ou encore la chorioamniotite [2]. Du fait des circonstances pathologiques, le mode d'accouchement est souvent une césarienne.

2. Accouchement spontané

La prématurité spontanée est la conséquence d'un travail prématuré, précédé ou non par une rupture prématurée des membranes fœtales (RPM). Seuls 20 à 45% des accouchements prématurés surviennent après une rupture prématurée des membranes. La prématurité spontanée représente la majorité des accouchements avant terme soit 65% environ des accouchements prématurés. Parmi les accouchements prématurés spontanés, les infections représentent les causes les plus courantes. En effet, il a été suggéré qu'une infection bactérienne atteignant l'utérus et le liquide amniotique pourrait déclencher une inflammation et par conséquent un travail prématuré et/ou une rupture prématurée des membranes [2].

Dans la majorité des cas, la prématurité spontanée fait donc suite à des infections mais également à des anomalies maternelles telles que des béances cervico-isthmiques, un placenta

prævia, un hydramnios ou des malformations utérines. Cependant, parmi les mécanismes impliqués dans le travail prématuré spontané, seule l'infection intra-amniotique présente une relation causale directe avec l'accouchement prématuré spontané [11].

a. Chorioamniotite : principale cause d'accouchement prématuré spontané avec membranes intactes

Le travail prématuré à membranes intactes concerne près d'un tiers des accouchements prématurés. Les antécédents obstétricaux pathologiques, le jeune âge maternel et la situation sociale défavorisée sont les facteurs de risque de travail prématuré à membranes intactes les plus classiquement reportés dans la littérature. Le travail prématuré à membranes intactes concernerait 69% des accouchements avant 24 SA, 44% des accouchements entre 24 et 26 SA et 25% des accouchements entre 27 et 37 SA [12].

Il existe une forte corrélation entre chorioamniotite (infection des membranes fœtales et du liquide amniotique) et naissances prématurées [13]. En effet, la chorioamniotite est l'infection la plus fréquemment associée au travail et à la naissance prématurés [14]. On estime ainsi qu'environ 25 à 40% des naissances prématurées sont associées à une chorioamniotite manifeste [15] avec des taux observés jusqu'à 79% dans le cas de prématurités extrêmes [16]. Certains auteurs pensent que la colonisation ascendante de la sphère utéroplacentaire par des mycoplasmes tels que *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* se produirait dans la période péri-conceptionnelle, avant la fermeture des membranes fœtales [17]. Ces micro-organismes sont généralement de faible virulence et colonisent le liquide amniotique sur une période prolongée [18]. D'un point de vue histologique, la chorioamniotite est définie par une réponse inflammatoire maternelle associée à une infiltration de macrophages au niveau des membranes fœtales, avec ou sans réponse inflammatoire de la part du fœtus. Ceci est associé à une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires

telles que l'interleukine 1 β (IL-1 β), le Tumor Necrosis Factor α (TNF α), l'IL-6 et l'IL-8, dans le liquide amniotique, la décidue, le myomètre et les membranes fœtales [19], entraînant une production de prostaglandines (PG) par ces tissus, pouvant ainsi provoquer l'accouchement.

b. Rupture prématurée des membranes fœtales (RPM)

La rupture prématurée des membranes survient dans la majorité des cas lors de grossesses à terme. Cependant, le phénomène peut également se produire avant terme (2-3%) et entraîner des conséquences néfastes pour le fœtus. En effet, dans 60% des cas, la RPM s'accompagne d'un accouchement dans les 24 heures, et expose donc au risque de prématurité. La littérature ne donne pas une définition univoque de la RPM, mais on retient comme critère diagnostique principal, toute rupture avérée de la poche des eaux avant le début du travail, quel que soit le terme de la grossesse. Deux critères sont alors pris en considération ; un critère anatomique (ouverture de l'amnios et du chorion) et un critère chronologique (situation de la RPM par rapport au début du travail et non par rapport au terme) [20].

Les membranes fœtales se dégradent et se renouvellent tout au long de la grossesse, accompagnant ainsi la croissance du fœtus. Cet équilibre entre formation et dégradation permet d'assurer la solidité des membranes. Or, dans certains cas, l'équilibre se rompt et peut aboutir à une rupture des membranes. Ainsi, la RPM est souvent due à une fragilisation des constituants des membranes, pouvant être liée à une infection (le plus fréquent), une modification hormonale, un stress oxydatif ou des facteurs mécaniques (hydramnios, grossesse gémellaire) [21].

De plus, la RPM majore le risque d'infection aussi bien pour la mère (chorioamniotite) que pour l'enfant et donc le risque de survenue d'un travail prématuré. La RPM pourra donc constituer une indication pour déclencher l'accouchement. Ainsi, en tenant compte des accouchements spontanés et induits, la RPM représente environ 30% des naissances prématurées [3].

3. Facteurs de risque

Parmi les facteurs favorisant la survenue d'un accouchement prématuré, on retrouve des facteurs physiologiques. Les antécédents d'accouchements prématurés constituent l'un des principaux facteurs de risque connu de prématurité. Les femmes ayant un antécédent d'accouchement prématuré présentent ainsi un risque d'accoucher à nouveau prématurément 1,5 à 2 fois plus élevé comparé à des femmes sans antécédent de prématurité [22-23].

On retrouve également l'âge extrême ainsi que le poids extrême. En effet, une femme âgée de moins de 16 ans ou de plus de 35 ans présente un risque plus élevé d'accoucher prématurément [24]. Concernant le poids, il a été mis en évidence que l'obésité est un facteur de risque d'accouchement prématuré. Plusieurs études ont ainsi montré que les femmes présentant une obésité de grade II ou III ont un risque accru d'accoucher prématurément [25-26]. L'association entre le surpoids ou l'obésité de grade I et l'accouchement prématuré est moins pertinente [27]. D'autre part, il a également été mis en évidence une augmentation du taux de naissances prématurées chez les femmes présentant un IMC (Indice de Masse Corporelle) faible ($<19,8 \text{ kg/m}^2$) [28-29].

Des malformations utérines, une parité élevée, des antécédents d'interruption volontaire de grossesse ou de fausses couches peuvent également être des facteurs de risque de survenue d'un accouchement prématuré [30].

Parmi les facteurs de risques favorisant la survenue d'un accouchement prématuré, on retrouve également des facteurs socioéconomiques, tel que l'intervalle entre deux grossesses. En effet, Shelley *et coll.* [31] ont mis en évidence une association entre un intervalle entre deux grossesses inférieur à 18 mois et la fréquence des accouchements prématurés. De plus, lorsque l'intervalle entre deux grossesses est inférieur à cinq mois, le risque de prématurité extrême est augmenté [32].

L'origine ethnique est également un facteur de risque d'accouchement prématuré. Une étude américaine a ainsi montré que les femmes afro-américaines sont plus susceptibles d'accoucher prématurément que les femmes hispaniques, qui le sont elles-mêmes plus que les femmes caucasiennes [4].

D'autres facteurs tels que des conditions socio-économiques ou des conditions de vie familiale défavorables, le tabac, le stress, le diabète, l'hypertension artérielle ou la dépression peuvent également jouer un rôle dans la survenue d'une naissance prématurée [2].

V. Complications associées à la prématurité

La prématurité est la principale cause de morbidité et de mortalité périnatale [3]. En effet, les enfants nés prématurément sont sujets à de nombreuses complications, d'autant plus graves que la naissance est survenue précocement. On retrouve notamment des pathologies respiratoires. En effet, les détresses respiratoires représentent environ 28% des décès liés à la prématurité. Elles peuvent être dues à une maladie des membranes hyalines, elle-même due à l'immaturation pulmonaire observée chez les prématurés, ou à une dysplasie pulmonaire, définie par une oxygène-dépendance à 4 semaines ou à 36 semaines chez les enfants nés prématurément [33]. Des séquelles neurologiques peuvent également être observées, telles que la leucomalacie para-ventriculaire (lésion ischémique de la substance blanche), l'hémorragie intraventriculaire, la paralysie cérébrale ou des retards du développement [34-35]. On retrouve également plus fréquemment des infections chez les nouveau-nés nés prématurément que chez les nouveau-nés nés à terme. Ces infections, responsables de 12 à 28% des morts néonatales peuvent être causées par des pathogènes maternels (infections materno-fœtales à streptocoque B ou colibacilles) ou d'origine nosocomiale (staphylocoque doré ou entérobactéries). D'autres troubles sont également observés, tels que des troubles gastro-intestinaux (intolérance alimentaire, entérocolite ulcéro-nécrosante) ou des troubles

cardiaques pouvant nécessiter une prise en charge médicale ou chirurgicale. Globalement, les enfants prématurés présentent plus de réadmissions et de problèmes de santé dans les semaines suivant la première sortie, et plus de la moitié seront admis à l'hôpital dans les deux premières années de vie (soit deux fois plus que les enfants nés à terme), du fait, principalement, des affections des voies respiratoires.

VI. Prise en charge de l'accouchement prématuré : les tocolytiques

Utilisés au cours de la menace d'accouchement prématuré, les tocolytiques ont pour objectif de retarder le travail prématuré afin d'améliorer le pronostic néonatal, en maintenant la vie *in utero*, en diminuant ou en inhibant totalement les contractions utérines (tocolyse), entre la 22^{ème} et la 37^{ème} semaine de grossesse. En pratique, les traitements tocolytiques retardent l'accouchement d'environ 48 heures et rarement plus de sept jours [36]. Ce délai permet ainsi de prendre deux mesures visant à améliorer le pronostic néonatal en cas d'accouchement prématuré ; l'administration à la mère de corticoïdes destinée à améliorer la maturité fœtale, notamment pulmonaire, et/ou d'organiser un transfert de la mère dans une maternité offrant un niveau de soins adapté à l'état de l'enfant à naître. Les tocolytiques sont utilisés jusqu'à la 37^{ème} semaine de grossesse, et ce tant que la poursuite de la grossesse présente des avantages pour la mère et pour l'enfant. En effet, la tocolyse ne se justifie pas lorsque le risque de complications *in utero* pour le fœtus est plus important que le risque de complications néonatales *ex utero*. L'inhibition des contractions utérines est donc pour cette raison contre-indiquée en cas d'infection intra-utérine, de pré-éclampsie, de décollement placentaire ou de souffrance fœtale.

Il existe différentes classes de tocolytiques, les plus répandus étant les inhibiteurs calciques, les β 2-mimétiques, l'antagoniste du récepteur à l'ocytocine, et le sulfate de magnésium.

1. Les inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs calciques sont de plus en plus utilisés en première intention en raison d'une bonne tolérance materno-fœtale comparativement aux β 2-mimétiques, bien que n'ayant pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la menace d'accouchement prématuré [37].

La nicardipine (Loxen[®]) et la nifédipine (Adalate[®]) sont des inhibiteurs calciques sélectifs des canaux calciques voltage-dépendants de type L. Ils inhibent ainsi la contraction des fibres musculaires lisses en empêchant l'ouverture de ces canaux calciques et donc l'entrée du calcium dans les cellules myométriales. La réduction des concentrations de calcium intracellulaire prévient alors l'action de l'enzyme Myosin Light Chain Kinase (MLCK) et donc les contractions myométriales [38]. La nifédipine est l'inhibiteur de canaux calciques le plus étudié et plusieurs études supportent son efficacité pour la tocolyse [39-40].

2. Les β 2-mimétiques

Parmi les agents tocolytiques, les β 2-mimétiques ont largement été utilisés, en particulier dans les pays aux ressources limitées. Cependant, ils présentent de nombreux effets indésirables maternels et fœtaux. En effet, parmi les effets secondaires, on retrouve une tachycardie modérée ou sévère, des tremblements et vertiges, des vomissements ou encore une hypotension [41].

Dans cette classe de tocolytiques, on retrouve notamment le salbutamol (Salbumol[®]), généralement utilisé en deuxième intention en cas d'échec de la nicardipine. Les β 2-mimétiques exercent donc leur effet en stimulant les récepteurs β 2-adrénergiques, qui sont couplés à une protéine Gs, stimulant l'adénylate cyclase, entraînant une production d'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) et donc une relaxation du muscle utérin. Il est intéressant de noter que la concentration en récepteurs β 2-adrénergiques diminue graduellement avec la durée de la tocolyse. Cette désensibilisation du récepteur limite la durée d'action de ces agents et justifie ainsi une

utilisation de courte durée [38]. Les β 2-mimétiques sont contre-indiqués en cas de pathologies cardiaques, de grossesse multiple ou d'hémorragie utérine.

3. L'antagoniste du récepteur à l'ocytocine

L'atosiban (Tractocile®), un antagoniste du récepteur à l'ocytocine est la principale molécule utilisée dans le traitement de la menace d'accouchement prématuré. L'inhibition du récepteur à l'ocytocine entraîne une diminution de l'influx du calcium depuis le réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, aboutissant à une inhibition de la contraction musculaire. L'atosiban est souvent utilisé en première intention en cas de grossesse multiple. Il possède l'AMM en Europe dans la prévention de l'accouchement prématuré entre 26 et 35 semaines de grossesse [42].

4. Le sulfate de magnésium

Le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) est utilisé couramment aux États-Unis comme tocolytique de première intention. Il est en revanche rarement utilisé en France en raison de ses effets indésirables et de son efficacité limitée. Ses effets myorelaxants sont cependant mieux connus sur les fibres musculaires lisses vasculaires que sur le muscle utérin. Dans leur étude de 2014, Crowther *et coll.* [43] ont comparé l'effet du sulfate de magnésium à un placebo, à l'absence de traitement, ou à une variété d'agents tocolytiques alternatifs et ont mis en évidence une inefficacité du sulfate de magnésium pour retarder l'accouchement ou prévenir l'accouchement prématuré.

Cependant, il est important de noter un changement de paradigme quant à la prise en charge des menaces d'accouchements prématurés. En effet, les tocolytiques les plus couramment utilisés retardent l'accouchement de 48 heures et rarement de plus de sept jours, et présentent de nombreux effets indésirables. De plus, par définition, ils agissent en s'opposant aux contractions utérines, un évènement associé à la mise en route du travail. Une nouvelle stratégie est donc de développer des agents capables d'agir au niveau des phases précédant la mise en route du travail, telles que la prolifération des cellules myométriales ainsi que leur transition en phase d'hypertrophie, avant le début de la synthèse du matériel contractile.

PARTIE II : MECANISMES DE L'ACCOUCHEMENT

La mise en route du travail nécessite une activité pleinement contractile de l'utérus, associée à une dilatation du col utérin, ainsi qu'à une rupture des membranes fœtales. L'induction de ces phénomènes nécessite un remaniement important de la sphère utéroplacentaire en fin de grossesse. Il est maintenant admis, chez l'homme, que la mise en route du travail, qu'il soit prématuré ou à terme, nécessite la mise en place d'un processus inflammatoire au niveau des tissus gestationnels.

I. Remodelage des tissus gestationnels

A l'approche du terme, les tissus gestationnels subissent un remodelage intense indispensable au bon déroulement de l'accouchement, se traduisant par l'apparition de contractions utérines synchrones, la rupture des membranes fœtales et la dilatation cervicale (Figure 3). Ce remodelage et le déclenchement des contractions utérines sont des phénomènes générés par les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β et le TNF α , et mettent en jeu un groupe de protéines associées aux contractions appelées CAPs (Contraction-Associated Proteins).

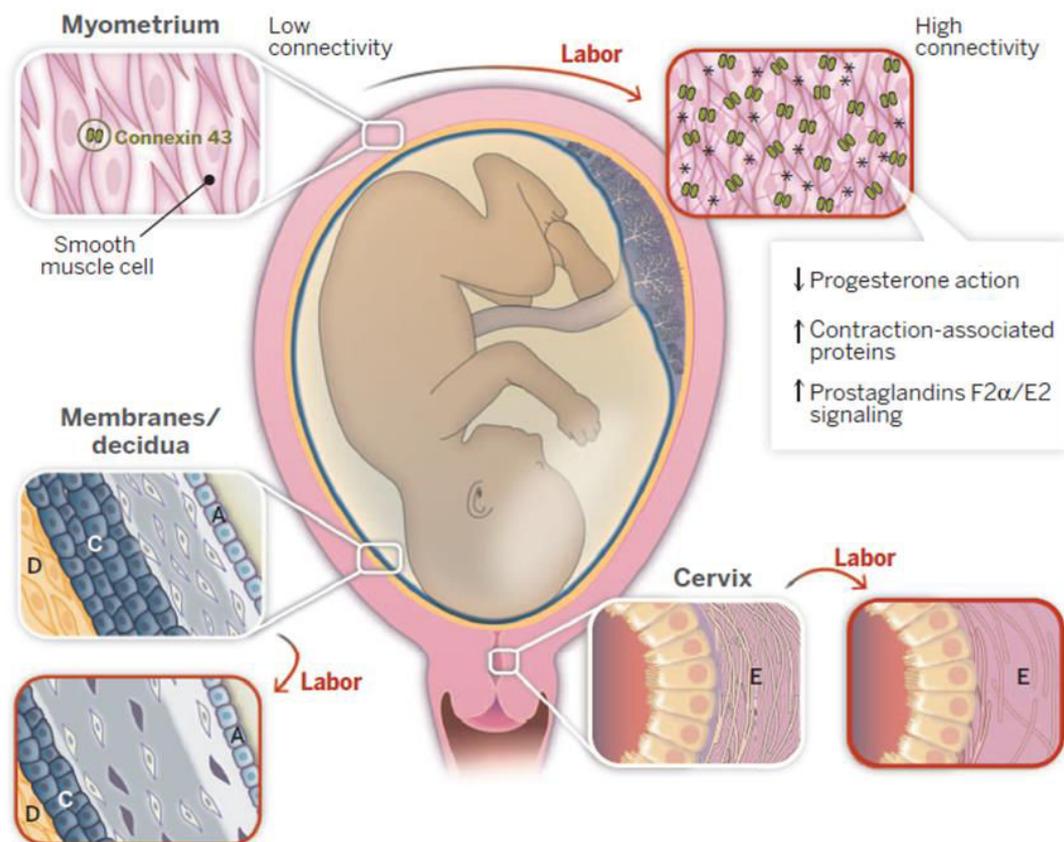


Figure 3 : Remodelage des tissus gestationnels lors de la mise en route du travail [44]

1. Rupture des membranes fœtales

La rupture des membranes fœtales se déroule selon la séquence d'évènements suivante ; une distension des membranes fœtales avec une perte d'élasticité, la séparation de l'amnios du chorion au niveau de la couche spongieuse, la fracture du chorion, la distension puis la rupture de l'amnios. Normalement, la rupture des membranes se produit après le début des contractions, mais dans 10% des accouchements à terme et dans 40% des accouchements prématurés, la rupture survient avant les contractions. La dégradation membranaire met en jeu deux mécanismes principaux ; l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, et le remodelage de la matrice extracellulaire composée essentiellement de collagène, impliquant des enzymes ayant une activité

protéolytique dirigée contre le collagène, les métalloprotéases de la matrice (Matrix metalloprotéinases ou MMPs) [45]. Les MMPs peuvent être inhibées par des inhibiteurs spécifiques du tissu ou « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMPs). L'intégrité des membranes se maintient au cours de la grossesse en partie grâce à la combinaison des faibles activités des MMP1 et MMP9 et une concentration relativement importante de TIMP1, inhibiteur des formes activées de MMP1 et MMP9 [46]. Au moment de l'accouchement, MMP2, qui est exprimée dans l'amnios tout au long de la grossesse, est surexprimée lors de la mise en route du travail. MMP9 quant à elle est exprimée sélectivement en fin de grossesse et constitue la MMP la plus exprimée au cours du travail [47-48]. Tout au long de la grossesse, il existe un équilibre entre le processus de dégradation et de renouvellement membranaire qui assure la solidité membranaire et permet une adaptation à la croissance fœtale. Dans certaines conditions, il peut exister un déséquilibre de ces mécanismes entraînant une fragilisation des membranes fœtales, pouvant aboutir à leur rupture prématurée et donc entraîner un accouchement prématuré.

2. Dilatation du col

Les contractions utérines vont entraîner deux phénomènes ; l'effacement du col par diminution progressive de son épaisseur et de sa longueur, ainsi que la dilatation du col, grâce à la pression exercée par la présentation du fœtus et la poche des eaux. Le col devient alors mou et court grâce aux modifications du tissu conjonctif du stroma cervical. En effet, ces mécanismes impliquent un remodelage intense mettant en jeu des processus analogues à ceux observés dans la rupture des membranes fœtales. De nombreux travaux ont ainsi décrit une activation leucocytaire dans ce tissu au moment du travail [49-50] ainsi qu'une activation de différentes MMPs, notamment de MMP2, majoritairement sécrétée par les fibroblastes, et de MMP9, sécrétée par les leucocytes [51-52].

3. Contraction du myomètre

Le développement de contractions utérines régulières et synchrones est un évènement essentiel du travail. En plus d'initier le travail, les contractions permettent l'effacement et la dilatation du col ainsi que la progression du fœtus jusqu'à la sortie des voies génitales. La contractilité des cellules myométriales est principalement déterminée par les niveaux de calcium libre intracellulaire et l'état de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine MLC (Myosin Light Chain), deux phénomènes régulés par les protéines CAPs elles-mêmes régulées par les variations d'expression de la progestérone et des œstrogènes. De plus, il est important de noter que contrairement à de nombreux modèles animaux, aucune variation du taux de progestérone et d'œstrogènes n'a été observée chez la femme en travail [53-54].

Parmi les CAPs, on retrouve notamment les récepteurs à l'ocytocine (OXTR) et à la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) [55]. La mise en route du travail est donc associée à une augmentation de la sensibilité du myomètre aux prostaglandines et à l'ocytocine. Les PGE₂ et PGF_{2α}, principales prostaglandines stimulantes, sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique *via* la cyclo-oxygénase (COX) dont il existe 2 isoformes : la COX1 constitutive et la COX2 induite par les médiateurs de l'inflammation. La régulation du métabolisme de l'acide arachidonique semble essentielle à la mise en route du travail. Il a ainsi été mis en évidence une augmentation des concentrations de prostaglandines PGE₂ et PGF_{2α}, et d'acide arachidonique, dans le liquide amniotique [56] ainsi que dans les tissus utérins [57-58] au moment du travail. Le travail est également associée à une augmentation de la sensibilité du myomètre à l'ocytocine. En effet, les récepteurs à l'ocytocine ont été mis en évidence dans les tissus gestationnels à l'exception du placenta [59]. L'ocytocine est capable de stimuler les contractions utérines soit de façon directe par l'activation de son récepteur, soit de façon indirecte par la stimulation de la COX2. En effet, Blanks et Thornton [60] ont mis en évidence que le myomètre pouvait être activé par la fixation de l'ocytocine

à son récepteur spécifique OXTR, dont l'expression augmente juste avant la mise en route du travail. La liaison de l'ocytocine à son récepteur entraîne alors l'activation de la phospholipase C (PLC) à l'origine d'une augmentation de la concentration en calcium libre intracellulaire menant à l'induction des contractions myométriales. L'ocytocine est également capable de stimuler la synthèse des prostaglandines via COX2, au niveau des cellules myométriales [61]. Enfin, la connexine-43 (Cx43), impliquée dans la formation des jonctions gap, joue également un rôle lors des contractions myométriales. Au moment du travail, la formation de ces jonctions gap confère ainsi aux cellules myométriales la capacité de se contracter de façon synchrone [10].

a. Ultrastructure des cellules myométriales

Le cytoplasme des cellules myométriales est constitué d'une machinerie contractile (filaments fins, filaments intermédiaires et filaments épais) et de composants structuraux (corps denses, réticulum sarcoplasmique, mitochondrie). Les filaments présents dans le cytoplasme des cellules myométriales ont deux fonctions. D'une part, les filaments constitutifs du cytosquelette, ou filaments intermédiaires, forment un réseau maillé qui permet le maintien de la forme de la cellule et lui confère sa résistance lors des contractions, sans participer directement au processus contractile. D'autre part, les filaments contractiles sont les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. C'est leur interaction qui permet la contraction de la cellule myométriale.

- *Structures intracellulaires*

Les corps denses sont des structures réparties dans tout le cytoplasme. Ils sont riches en α -actinine, et servent de point d'ancrage aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires, contribuant ainsi à la constitution du cytosquelette. On retrouve également des corps denses au niveau membranaire. La liaison de deux corps denses membranaires de cellules voisines forme une jonction

intermédiaire permettant le couplage mécanique entre les cellules [62]. Au niveau membranaire, les jonctions gap, structures perméables aux ions et aux petites molécules, assurent le couplage chimique et électrique entre les cellules. Le réticulum sarcoplasmique, présent dans les cellules musculaires lisses, a un rôle fondamental dans la régulation de la concentration en calcium intracellulaire. En effet, il représente le principal site de stockage du calcium. Enfin, les mitochondries sont le site du métabolisme oxydatif, dont l'activité augmente au cours de la grossesse.

- Appareil contractile

Plus de 80% du volume de la cellule myométriale sont occupés par l'appareil contractile impliquant des myofilaments d'actine et de myosine, avec six fois plus d'actine que de myosine. Les filaments fins (7 nm) sont composés principalement de monomères d'actine globulaire, organisés en double hélice, mais également de tropomyosine, de calponine et de caldesmone. Les filaments épais (16 nm) sont constitués d'hélices de myosine disposées parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule. Les filaments d'actine et de myosine associés se lient aux corps denses, attachés à la membrane par des filaments intermédiaires (10 nm) de desmine, majoritaire, et de vimentine [63]. Les filaments intermédiaires n'ont pas d'action contractile propre mais semblent jouer un rôle dans la constitution du cytosquelette, en association avec les corps denses auxquels ils sont ancrés [64]. En effet, lorsque les complexes actine/myosine se contractent, leur attachement aux corps denses provoque le raccourcissement de la cellule. L'organisation de la cellule facilite ainsi la réorganisation spatiale de la machinerie contractile afin d'optimiser le développement de la force durant la contraction, assurée par l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine.

b. Contractions myométriales efficaces

i. Organisation de l'appareil contractile

- Myosine

La famille des myosines constitue une large famille de protéines qui partagent la capacité de se lier à l'actine et possède une activité enzymatique ATPase. Dans la cellule musculaire lisse, on retrouve surtout des molécules de myosine de type II. Plusieurs centaines de molécules de myosine s'assemblent pour former les filaments épais. La molécule de myosine est un complexe hexamérique de 470 kDa, constituée de deux chaînes lourdes de 220 kDa chacune, associées au niveau de leurs têtes globulaires à deux paires de chaînes légères. Chacune des chaînes lourdes a une conformation globulaire dans sa partie N-terminale et une queue hélicoïdale commune. A chaque tête globulaire sont donc associées deux chaînes légères, l'une de 17 kDa (MLC17), dit chaîne essentielle, et l'autre de 20 kDa (MLC20) phosphorylable, dite chaîne régulatrice. La MLC17 apporte une stabilité structurale alors que la MLC20 a un rôle de pivot au niveau de la régulation de l'interaction actine/myosine et donc de la contraction. La tête globulaire de la myosine renferme deux sites nécessaires à sa fonction motrice ; un site d'interaction avec l'actine et un site enzymatique à activité ATPase permettant l'hydrolyse de l'ATP [65].

- Actine

L'actine monomérique (actine G ou globulaire) est une protéine soluble de 42 kDa, pouvant polymériser afin de former des filaments d'actine (actine F ou filamenteuse). En effet, dans la cellule, environ 80% d'actine est polymérisée en filaments. Les filaments d'actine sont formés de deux chaînes linéaires qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice. L'actine est une protéine ubiquitaire, partie intégrante du cytosquelette sous-membranaire. C'est le composant

majeur des filaments fins (30 à 50% des protéines myofibrillaires totales). Il existe trois isoformes d'actine (α , β , γ) principalement exprimées dans les cellules myométriales. Les filaments fins de la machinerie contractile, constitués des formes α et γ , vont glisser le long des filaments de myosine pour raccourcir la cellule pendant la contraction [66]. La forme β de l'actine constitue une protéine structurale importante du cytosquelette et se situe juste en dessous de la membrane plasmique. L'actine β peut jouer un rôle dans le développement de la tension mécanique générée, en renforçant la membrane plasmique [67]. Il a été montré que l'expression de l'actine de type α et de l'actine de type β reste inchangée durant la grossesse alors que l'actine de type γ voit son expression augmentée et une localisation altérée à l'approche du terme [68-69].

ii. Bases moléculaires de la contraction myométriale

Le processus contraction/relaxation du myomètre dépend essentiellement de l'augmentation du calcium dans le cytoplasme de la cellule myométriale et de l'interaction actine/myosine régulée par des processus de phosphorylation/déphosphorylation de la myosine (Figure 4).

- Concentration en calcium libre intracellulaire

La contraction nécessite dans un premier temps une augmentation de calcium intracellulaire, régulée par plusieurs mécanismes. Le contrôle de la machinerie contractile par le calcium fait intervenir différentes étapes de contrôle intermédiaire ainsi que des seconds messagers. Ainsi l'augmentation de la concentration en calcium libre cytoplasmique peut être soit directe *via* un influx de calcium extracellulaire, soit indirecte par mise en jeu d'un second messenger qui libère le calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique. En effet, les niveaux de calcium intracellulaires peuvent être augmentés *via* l'entrée de calcium à travers la membrane cellulaire à partir du milieu extracellulaire et/ou *via* la libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique [70]. Il a été montré que les concentrations intracellulaires de calcium étaient augmentées lors des contractions myométriales,

ces concentrations devant être de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} M pour entraîner l'activation de la chaîne légère de myosine MLCK.

- Influx de calcium à partir du milieu extracellulaire.

La dépolarisation de la membrane, induite par des potentiels d'action, met en jeu les canaux calciques dépendants du voltage (Voltage Operated Channels, VOC), dont l'ouverture permet la diffusion passive du calcium extracellulaire vers le cytoplasme. En effet, la concentration extracellulaire de calcium étant environ cinq fois supérieure à celle du calcium intracellulaire, un influx rapide et massif de calcium a lieu, du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire [71]. Le myomètre contient majoritairement des canaux calciques dépendants du voltage, de type L (L pour Long lasting). Le canal calcique de type L fait partie de la famille des canaux ioniques et est caractérisé par sa sensibilité aux DiHydroPyridines. Son expression est maximale en fin de grossesse. La liaison d'un agoniste à son récepteur membranaire peut également provoquer l'ouverture d'un canal calcique récepteur dépendant (Receptor Operated Channels, ROC), et/ou l'activation de la phospholipase C, la formation d'inositol triphosphate (IP3) qui provoque la libération du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique.

- Libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique.

L'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique est également liée à une libération de calcium à partir des compartiments intracellulaires (réticulum sarcoplasmique) en rapport avec le métabolisme des phosphoinositides membranaires. La libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique fait intervenir deux mécanismes, l'un mettant en jeu les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique (RyR) et l'autre mettant en jeu les récepteurs à l'IP3 (IP3R).

Le premier, appelé IICR (Inositol triphosphate Induced-Calcium-Release), fait intervenir la liaison d'un agoniste tel que l'ocytocine, les prostaglandines ou l'endothéline-1, à son récepteur membranaire spécifique, couplé à une protéine G (GPCR, G-protein coupled receptor). En effet, la liaison d'un

agoniste à son récepteur situé dans la membrane plasmique des cellules myométriales active la protéine G trimérique et déclenche ainsi une cascade d'évènements, commençant par la stimulation de la PLC. La PLC activée est alors capable d'hydrolyser le phosphatidyl 4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et IP₃. L'IP₃ est le second messenger qui libère le calcium intracellulaire stocké dans le réticulum sarcoplasmique [72]. L'IP₃ se fixe sur un récepteur couplé à un canal calcique, augmentant ainsi sa probabilité d'ouverture et permettant l'efflux de calcium dans le cytoplasme. Il en résulte une dépolarisation de la membrane entraînant l'activation et l'ouverture des canaux voltage-dépendant de type L, se trouvant sur la membrane des cellules myométriales.

Le second mécanisme, appelé CICR (Calcium-Induced-Calcium Release) met en jeu des canaux sensibles au calcium, connus sous le nom de récepteurs à la ryanodine, présents dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, induite par l'entrée de calcium par les VOC, sensibilise d'autres canaux calciques, qui vont s'ouvrir, créant ainsi une boucle d'amplification [73]. Le calcium libre va pouvoir se lier à la calmoduline et déclencher la cascade d'évènements aboutissant à l'interaction actine/myosine et donc à la contraction myométriale.

- Interaction des protéines contractiles

La force contractile dépend de l'activation des chaînes légères MLC₂₀ de myosine. Il existe un équilibre entre l'activation de la myosine par une kinase, la MLCK, enzyme clé de la contraction, et sa désactivation par une phosphatase, la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). Quand la concentration en calcium libre dans le cytoplasme est faible (10^{-7} M), l'équilibre est en faveur de la MLCP (relaxation), alors qu'en présence d'une forte concentration de calcium (10^{-5} M), l'activité MLCK prédomine et phosphoryle la myosine (contraction) [62]. Suite à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, quatre ions calcium (Ca^{2+}) se lient à la protéine cytosolique appelée calmoduline (CaM) et change ainsi sa configuration. Le complexe Ca^{2+} -CaM ainsi formé se fixe sur la

MLCK et l'actine [74]. Il a été mis en évidence une association entre l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et la phosphorylation de la MLC20 dans le muscle lisse utérin, en réponse à divers stimuli contractiles dans différentes espèces telles que le rat [75-76] et l'humain [77-78]. La MLCK activée va alors phosphoryler les chaînes légères régulatrices de la myosine MLC20 sur la sérine19. Cette phosphorylation s'accompagne de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par l'activité ATPase des têtes de myosine qui se chargent alors en énergie et changent d'orientation. En effet, les têtes de myosine subissent une flexion permettant ainsi leur fixation à l'actine, avec libération d'un groupement phosphate (Pi). L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi fournit alors l'énergie nécessaire à l'interaction actine/myosine et donc à la contraction. Les filaments de myosine glissent alors sur les filaments d'actine entraînant ainsi le raccourcissement de la cellule myométriale [79] (Figure 4).

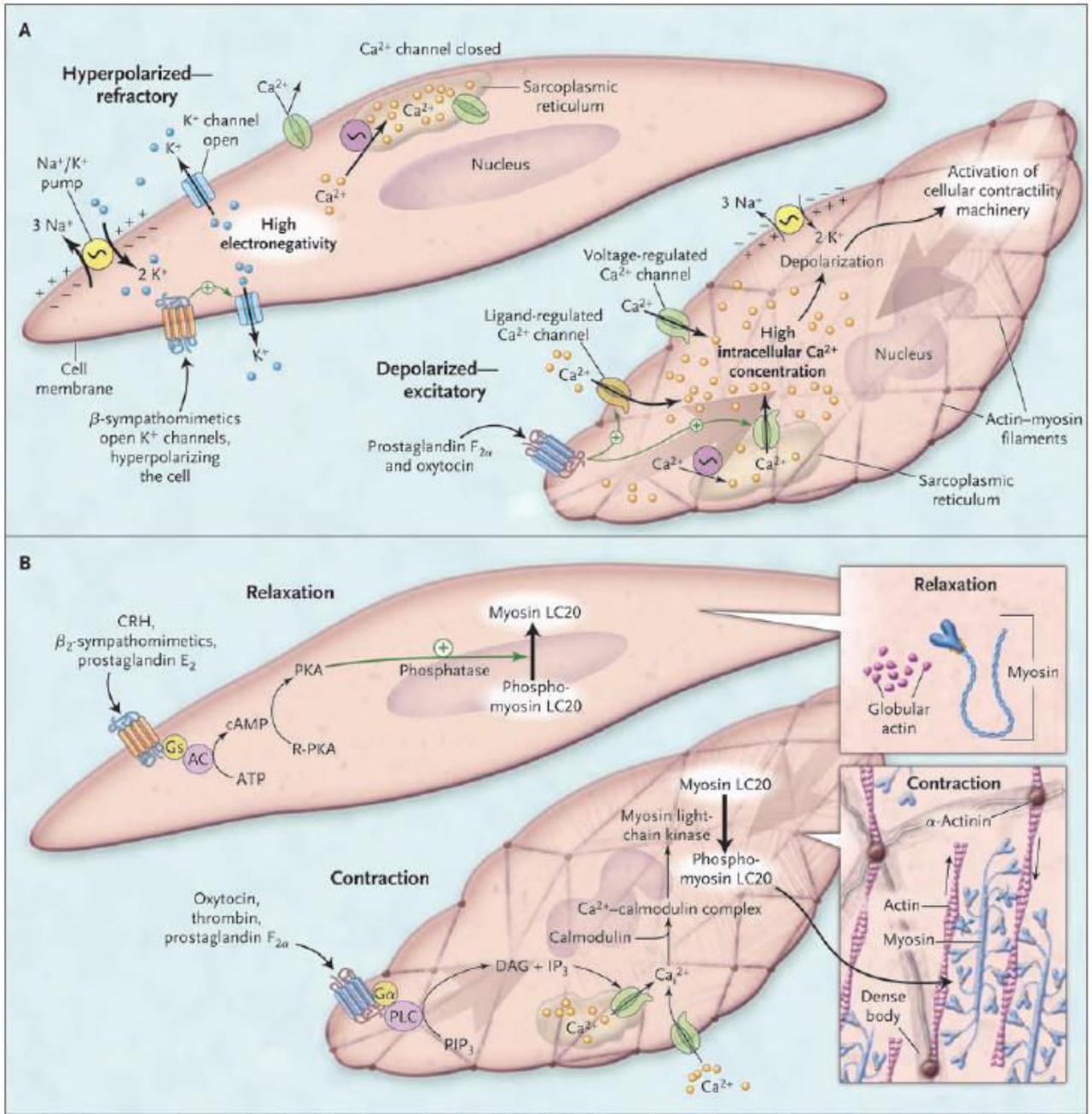


Figure 4 : Relaxation et contraction des cellules myométriales humaines [10]

iii. Régulation de l'interaction actine/myosine

Le contrôle de l'activité contractile du muscle utérin pendant la grossesse nécessite l'action de systèmes de régulation puissants et multiples agissant sur l'expression de signaux et de protéines des voies de transduction, de récepteurs, de protéines G et de protéines effectrices (enzymes, canaux ioniques), qui modulent les taux de seconds messagers.

- Régulation par les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc)

Parmi les facteurs régulant l'interaction actine/myosine, les seconds messagers jouent un rôle très important. En effet, l'AMPc et le GMPc provoquent la relaxation tandis que l'IP3 et le calcium, comme expliqué précédemment, initient la contraction. En effet, les voies de l'AMPc et du GMPc sont des voies importantes dans le myomètre gestant, puisqu'elles favorisent dans un premier temps le maintien de la quiescence utérine, puis, dans un second temps, ont un rôle essentiel lors du travail, en produisant des périodes de relaxation, nécessaires pour rétablir une bonne circulation fœtale [10]. Il a été mis en évidence une concentration élevée de GMPc dans des explants de myomètres issus de femmes enceintes comparés à des femmes non enceintes, et que ces niveaux étaient diminués lors de la mise en travail spontanée [80]. En effet, l'AMPc et le GMPc sont capables d'activer les protéines kinase A (PKA) et G (PKG) respectivement, menant à l'activation des pompes à calcium dépendantes de l'ATP, aussi bien membranaires que sarcoplasmiques, permettant la diminution de la concentration calcique dans le cytoplasme. Enfin, la PKA peut également stimuler l'ouverture de canaux potassiques (qu'ils soient ATP ou Ca^{2+} dépendants), permettant ainsi de diminuer l'excitabilité cellulaire ainsi que la propagation cellulaire. La PKG quant à elle peut également induire l'activation de la MLCP et donc favoriser la relaxation.

- Régulation par d'autres protéines

D'autres protéines sont également impliquées dans la régulation de l'interaction actine/myosine telles que la caldesmone et la calponine. En effet, ces protéines, associées à l'actine, ont la capacité d'inhiber l'activité ATPase présente au niveau des têtes de myosine [81-82]. La caldesmone est une protéine de 87 kDa capable de se lier à l'actine et à la calmoduline. Elle contient également un site d'inhibition de l'activité ATPase [83]. Quand le taux de calcium est très bas, la caldesmone forme un complexe avec l'actine et la tropomyosine, ce qui empêche la myosine d'accéder à l'actine. Cette liaison dépend de sa phosphorylation par diverses kinases. En effet, il a été mis en évidence que la phosphorylation de la caldesmone par ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) s'oppose à l'effet inhibiteur de la caldesmone sur l'interaction actine/myosine et que l'expression de ERK et de la caldesmone phosphorylée étaient augmentées lors de la mise en route du travail, aussi bien chez le rongeur que chez l'humain [84-85]. De plus, il a été montré que la caldesmone est phosphorylée au pic de contractions myométriales et déphosphorylée lors des périodes de relaxation entre les contractions individuelles [86]. La calponine, protéine monomérique de 34 kDa, est également capable d'inhiber l'activité ATPase de la myosine selon un processus similaire à celui de la caldesmone [87]. La calponine est activement impliquée dans la régulation de la contraction myométriale dépendante du calcium par son pouvoir inhibiteur de l'activité ATPase du complexe actine/myosine, sans affecter l'état de phosphorylation de la myosine.

iv. Synchronisation des cellules myométriales

L'accouchement se caractérise par l'apparition de contractions utérines intenses, régulières et coordonnées. Il semble que chaque cellule myométriale soit capable de s'activer spontanément, leur conférant ainsi un rôle de « pacemaker », se caractérisant par une dépolarisation de la membrane cellulaire, aboutissant à la survenue d'un potentiel d'action. Cependant, les cellules peuvent également présenter un potentiel d'action sans dépolarisation membranaire, en cas

d'activité électrique propagée. Les jonctions gap, permettant le transport d'ions, de métabolites et l'échange de seconds messagers entre les cytoplasmes de cellules adjacentes, assurent un couplage électrique intercellulaire et permettent ainsi la transmission des potentiels d'action d'une cellule à l'autre. La synchronisation des contractions se fait donc grâce à la connexion des cellules myométriales *via* les jonctions gap. Elles sont composées de protéines appelées connexines, dont la principale est la connexine 43. Les connexines au niveau de la membrane cellulaire des cellules adjacentes s'alignent afin de créer une ouverture symétrique entre les cytoplasmes. Chaque ouverture comprend de multiples canaux, chaque canal étant composé de six connexines alignées symétriquement, formant ainsi une structure hexagonale avec la cellule adjacente [88]. Il a été montré que l'expression de la Cx43 était augmentée à terme et au moment du travail. De plus, le nombre et la taille des jonctions gap sont fortement augmentés pendant la grossesse, notamment au moment de la mise en route du travail, puis déclinent subitement dans le 24 heures suivant l'accouchement [89]. De plus, il est important de noter que dans le myomètre non gestant, les connexines sont peu nombreuses, voire absentes. Enfin, une augmentation du nombre de jonctions gap est observée chez les femmes ayant accouché prématurément, contrairement aux femmes accouchant après terme, pour lesquelles un retard dans la formation des jonctions gap a été mis en évidence [90].

II. Rôle de l'inflammation dans la mise en route du travail

1. Acteur cellulaire

Il est maintenant clairement établi chez l'homme que la mise en route du travail est associée à une réaction inflammatoire au niveau des tissus gestationnels déclenchée par l'infiltration massive de leucocytes au niveau de la sphère utéro-placentaire. En effet, les leucocytes circulants maternels

vont infiltrer les tissus reproducteurs (myomètre et col utérin) et vont être recrutés au niveau de l'interface materno-fœtale (chorion, amnios, décidue), lors de la mise en route du travail [49, 91].

Un influx massif de macrophages et de granulocytes a ainsi été mis en évidence lors de la mise en route du travail au niveau du myomètre [92]. Après la mise en route du travail, la décidue est également infiltrée [93]. Au niveau du col, une infiltration de macrophages a également été démontrée. Cependant, cette infiltration a lieu avant la mise en route du travail, et aucun autre influx n'a été mis en évidence après cette mise en route [94]. Le recrutement des macrophages au niveau des tissus gestationnels se fait *via* des mécanismes de chimiotactisme caractérisés par une augmentation de l'expression tissulaire de chémokines et de molécules d'adhésion [95-97]. La chémokine MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), est ainsi responsable du recrutement des monocytes. En effet, MCP1 est un médiateur majeur de l'infiltration des monocytes/macrophages, aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques. De plus, le rôle de MCP1 a été suggéré par sa présence dans le myomètre et les membranes fœtales lors du travail à terme, ainsi que dans le liquide amniotique lors du travail prématuré [98]. De plus, notre équipe a mis en évidence une augmentation du nombre de monocytes, dit classiques ($CD14^+CD16^-MCP1^+$) lors de la mise en route du travail [99]. Yuan *et coll.* [100] ont également mis en évidence que la mise en route du travail, qu'il soit prématuré ou à terme, est régulée par une augmentation du nombre et de l'activité des monocytes du sang périphérique, *via* une surexpression des molécules d'adhésion telles que CD11a et CD11b [100], facilitant ainsi leur migration dans les tissus gestationnels.

2. Acteurs moléculaires

Bellopragada *et coll.* ont mis en évidence une centaine de gènes significativement augmentés dans les tissus gestationnels, en association avec le travail à terme, ces gènes étant principalement

impliqués dans la régulation du chimiotactisme, de l'inflammation, et des cytokines pro-inflammatoires [101].

a. Cytokines pro-inflammatoires

Il a été mis en évidence une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires lors de la mise en route du travail, dans le myomètre, le col de l'utérus et les membranes fœtales. Ces cytokines, principalement secrétées par les lymphocytes ayant infiltrés ces tissus [100], vont jouer un rôle important dans la modulation des différents processus de l'accouchement, notamment dans la maturation cervicale *via* la stimulation de la synthèse de prostaglandines et de MMPs ainsi que dans l'activité myométriale, *via* la régulation de la production de prostaglandines dépendante de COX2. Les cytokines jouent également un rôle dans les accouchements prématurés, ces derniers pouvant être induits par l'IL-1 β ou le TNF α exogènes. En effet il a été mis en évidence une expression augmentée de l'IL-1 β dans le sang périphérique de femmes en travail. De plus, l'IL-1 β amplifie les contractions du myomètre *via* l'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium [102] et la stimulation de l'expression de COX2 et donc la synthèse de prostaglandines [103]. Ces résultats ont été renforcés par une étude *in vivo* dans un modèle de primate non humain. Sadowski *et coll.* [104] ont ainsi démontré que l'injection intra-amniotique d'IL-1 β induit des contractions myométriales à l'origine d'un travail prématuré. En effet, une induction systématique de la mise en route du travail est observée dans les 48 heures suivant l'injection. Les auteurs ont de plus mis en évidence, en réponse à l'IL-1 β ou au TNF α , une élévation intra-amniotique des concentrations des cytokines IL-8, IL-6 et TNF α , une augmentation de l'expression de MMP9 et des prostaglandines, ainsi qu'une infiltration leucocytaire [104]. Aucune variation de ces marqueurs n'a été mise en évidence en réponse à d'autres cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8.

Au niveau des membranes fœtales, 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, jouant ainsi un rôle dans le remodelage des membranes à terme [47]. En effet, les leucocytes vont sécréter des MMPs permettant la dégradation du collagène et donc la rupture des membranes, mais ils vont également sécréter des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α qui vont induire une sécrétion et une activation accrues des MMPs [105-106]. La production d'IL-8, d'IL-6, d'IL-1 β et de TNF α est ainsi augmentée au niveau des membranes fœtales et du liquide amniotique lors du travail [107].

Au niveau du col de l'utérus, l'invasion leucocytaire se produisant à terme est également associée à une augmentation des concentrations de cytokines telles que l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α , ainsi qu'à une augmentation de l'expression de chémokines [101]. Il a été mis en évidence une augmentation de leur expression dans des biopsies de tissu cervical de femmes en travail comparé à des femmes non en travail [49, 108]. En effet, ces cytokines vont jouer un rôle dans le remodelage cervical, également caractérisé par une dégradation du collagène, en modulant la production des MMPs et/ou des TIMPs [109]. Ainsi, des concentrations élevées d'IL-8 ont été observées dans le col pendant sa maturation et sont corrélées à l'expression de MMP8 et MMP9 [110].

Au sein du myomètre gestant, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, lors de la mise en route du travail, stimulant les contractions utérines. Tribe *et coll.* ont ainsi montré que l'IL-1 β est capable de stimuler l'entrée du calcium dans les cellules myométriales, augmentant directement leur capacité de contraction [102]. D'autres études ont également montré que l'IL-1 β et le TNF α stimulent la production d'acide arachidonique et l'expression de COX2, augmentant ainsi la production de prostaglandines [111]. Srikhajon *et coll.* ont de plus démontré, dans des lignées primaires de cellules myométriales humaines, que le myomètre en travail est capable de produire des quantités importantes de cytokines et de chémokines, cette

surexpression coïncidant avec l'influx de leucocytes observé dans ce tissu lors de la mise en route du travail [101, 112].

b. Stress oxydant

Il a été mis en évidence une association étroite entre inflammation et stress oxydant. En effet, durant la réponse inflammatoire, des taux élevés de ROS (Reactive Oxygen Species) sont produits en même temps que des cytokines pro-inflammatoires. De plus, les cytokines TNF α et IL-1 β ainsi que le LPS (Lipopolysaccharide) sont capables d'induire la production de ROS. Inversement, il a été mis en évidence que les ROS sont capables d'induire l'expression des cytokines.

Les ROS ou espèces réactives de l'oxygène sont produites par de nombreuses sources exogènes dont le dioxygène (O₂), l'ozone (O₃), l'irradiation, l'exposition aux UV, les polluants ou encore la fumée de cigarette [113]. La production endogène des ROS passe par deux grandes voies métaboliques : tout d'abord par la voie mitochondriale [114], durant la phosphorylation oxydative (voie de production de l'ATP par transfert d'électrons, ou chaîne respiratoire), et d'autre part par le métabolisme de l'oxygène par des enzymes telles que les NADPH oxydases ou les NO synthases [115-117]. Les ROS peuvent être classées en deux groupes; les espèces radicalaires, comprenant notamment l'anion superoxyde radical (O₂⁻), le radical hydroxyl (OH[·]), le monoxyde d'azote radical (NO[·]), et les espèces non radicalaires constituées du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'O₂ et de l'O₃.

Les ROS sont présentes à des niveaux modérés dans tous les systèmes biologiques. Dans des conditions normales, le milieu intracellulaire est pro-oxydant, nécessitant une synthèse continue de défenses anti-oxydantes. Lorsque les capacités anti-oxydantes sont dépassées, un phénomène appelé stress oxydant, se produit. En effet, le stress oxydant est un phénomène biochimique dans

lequel se produit un déséquilibre entre une production accrue de ROS, principalement l' $O_2^{\cdot -}$ et le NO, et le système de défenses anti-oxydantes impliquant les vitamines, les catalases, la superoxyde dismutase (SOD) et le glutathion. La production excessive de ROS, espèces hautement réactives, qui n'est pas suffisamment compensée par les défenses anti-oxydantes, conduit à un état de stress oxydant dans les cellules, affectant ainsi de nombreux processus biologiques. En effet, le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, le diabète et les maladies cardiovasculaires [118-119].

De plus, du fait du lien étroit entre la signalisation inflammatoire et l'induction du stress oxydant, l'implication du stress oxydant dans la régulation de la grossesse (implantation, développement du placenta) et des complications associées (RPM, pré éclampsie), est désormais bien étudiée. En effet, La production de ROS et le stress oxydant peuvent déclencher un large panel de réponses, allant de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la croissance à l'inflammation, l'apoptose et le remodelage tissulaire, des mécanismes dont la régulation durant la grossesse et lors de l'induction du travail, est primordiale. Des études ont ainsi démontré une implication des ROS en début de grossesse, dans l'implantation ainsi que la placentation, mais également une implication du stress oxydant dans la physiopathologie de complications de la grossesse liées à une mauvaise placentation (avortement spontané, pré éclampsie, retard de croissance intra-utérin) [120-121]. Il a ainsi été mis en évidence un rôle du stress oxydant au cours de la grossesse ainsi que lors de la mise en route du travail qu'il soit prématuré ou à terme [122-123]. Des études ont ainsi démontré une implication des ROS dans la rupture prématurée des membranes fœtales. En effet, les ROS participent à la régulation de l'expression des MMPs, ainsi qu'à la régulation de leur activité, notamment celle de MMP2 et de MMP9, que ce soit directement, par S-nitrosylation ou indirectement, par l'intermédiaire de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) ou encore par activation de NF κ B. Ainsi, Woods *et coll.* [124] ont mis en évidence, sur un modèle *in vitro* d'explants de chorion et d'amnios, que les ROS sont nécessaires pour induire

l'expression de MMP9, et que des traitements avec de la N-Acétyl Cystéine (NAC), stimulant la synthèse de glutathion, pouvaient s'opposer à l'expression de MMP9 induite *in vivo* par le LPS. Ceci suggère un potentiel rôle du stress oxydant dans la physiopathologie du travail prématuré [125]. De plus, notre équipe a mis en évidence au sein du myomètre, que l'inflammation induite par le LPS conduit à un stress oxydant, entraîné par les macrophages uniquement, avec activation des NADPH oxydases et production de ROS, ces dernières agissant sur le myomètre *via* la signalisation NFκB. Ces résultats soulignent un rôle central du stress oxydant dans l'activation du myomètre induite par une inflammation et pourrait donc être impliqué dans les processus physiologiques menant à l'induction du travail [126].

Enfin, il est important de noter que NFκB représente le premier facteur de transcription reconnu comme sensible au statut Redox intracellulaire. En effet, dans des systèmes où la production de glutathion est inhibée, une exacerbation de la réponse NFκB au TNFα est observée. Inversement, l'inhibition de la production de ROS par la NAC se traduit par une inhibition de l'activation de NFκB, qu'elle soit induite par le LPS, l'IL-1β ou le TNFα.

c. Signalisation associée à l'inflammation: NFκB

- Généralités

Le facteur de transcription NFκB joue un rôle clé dans de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'immunité, la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cinq membres de la famille NFκB ont été décrits ; p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel. Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine hautement conservé, le domaine RHD (Rel Homology Domain) responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN. Toutes les protéines de la famille NFκB peuvent former des homo- ou hétéro-dimères, *in vivo*, à l'exception de la protéine RelB qui est

retrouvée sous forme d'hétérodimères seulement, la forme la plus étudiée étant l'hétérodimère p50/p65.

- Voie de signalisation NFκB

Trois voies de signalisation ont principalement été décrites, reposant toutes sur l'induction d'une cascade d'activation de kinases, la génération d'un dimère NFκB et l'induction de l'activité transcriptionnelle. La principale voie, et la plus étudiée, est la voie classique ou canonique. Elle est activée par un grand nombre de stimuli tels que le TNFα, l'IL-1β, le LPS, ou des stimulations antigéniques.

L'activité de NFκB est essentiellement régulée par son interaction avec les protéines inhibitrices IκB. En effet, dans son état inactif, les dimères NFκB sont associés à l'une des trois protéines IκB ; IκBα, IκBβ ou IκBε, qui séquestre les complexes NFκB dans le cytoplasme de la cellule. Lors d'une stimulation, le complexe IKK (IκB Kinase), complexe multi-protéique composé de deux sous-unités catalytiques IKKα, IKKβ et de la sous-unité régulatrice NEMO (NFκB essential modulator = IKKγ), est activé. Le complexe IKK activé phosphoryle les protéines inhibitrices IκB, conduisant à leur poly-ubiquitination, déclenchant ainsi leur dégradation par le protéasome 26S. Les dimères NFκB ainsi libérés sont ensuite activés *via* des modifications post-traductionnelles et vont alors transloquer dans le noyau où ils se fixent sur des séquences promotrices spécifiques et induisent la transcription de gènes cibles [127] (Figure 5).

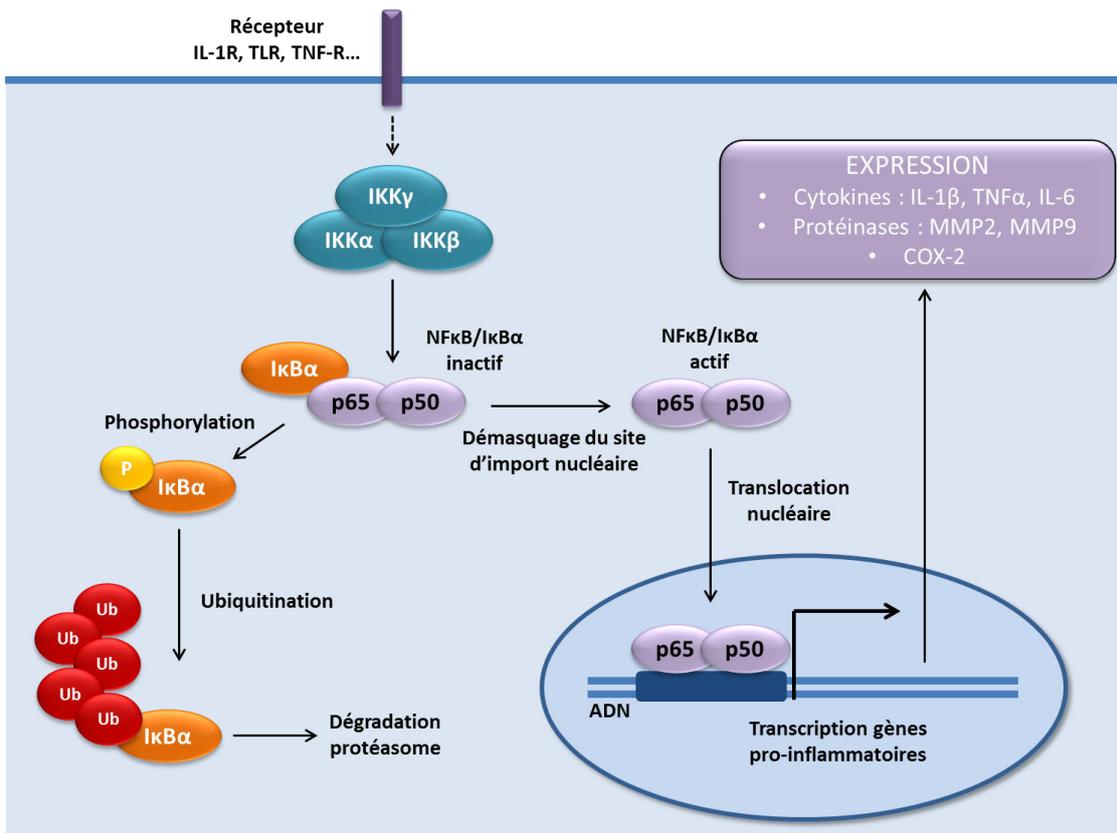


Figure 5 : Voie de signalisation canonique de NFκB

- Signalisation NFκB et induction du travail

Le facteur de transcription NFκB est impliqué dans l'expression de différents marqueurs associés au travail, lui conférant un rôle dans la synthèse de prostaglandines, le remodelage des tissus gestationnels et la production de cytokines [128].

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de NFκB lors de la mise en route du travail, qu'il soit à terme ou avant terme. En effet, une augmentation de l'activité de NFκB a été observée au sein du myomètre [129] et des membranes fœtales [130], associée à une augmentation de l'expression de certaines CAPs telles que COX2 et OXTR [131]. De plus, il a été montré que l'inhibition de NFκB inhibe le travail prématuré induit par le LPS chez la souris [132] et les contractions utérines induites par l'IL-1β dans un modèle de primates non humain [104]. NFκB

semble également jouer un rôle dans l'induction de la synthèse des MMP1, MMP3, et MMP9 et donc dans le remodelage des tissus reproducteurs [133].

Les cytokines IL-1 β , IL-8, IL-6 et TNF α , dont les taux sont augmentés dans le liquide amniotique au moment du travail, présentent des éléments de réponse pour NF κ B [134]. En effet, il a été mis en évidence que la phosphorylation de la sous-unité p65 était une étape importante permettant l'initiation de la transcription en facilitant la liaison du facteur de transcription aux régions promotrices de différentes CAPs, notamment OXTR [135], PGF_{2 α} R [136] et COX2 [137] ainsi que des cytokines pro-inflammatoires [138] et chémokines [139]. De plus, l'inhibition de NF κ B est associée à une diminution de l'expression de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF α dans des explants de placenta, de chorio-décidue et d'amnios traités par du LPS [140]. Enfin, il a été mis en évidence que NF κ B est requis pour la transcription de l'IL-8 (impliquée dans le recrutement leucocytaire) au niveau du col utérin [141].

3. Modification du statut phénotypique des cellules myométriales

Durant la gestation le myomètre présente un phénotype synthétique favorisant l'état de quiescence contractile et la croissance de l'utérus assurant ainsi le bon développement du fœtus. En fin de grossesse, les cellules myométriales vont se différencier afin d'initier l'accouchement. En effet, des études menées sur des prélèvements de myomètres issus de rongeurs ont permis de mettre en évidence que la gestation est associée à des changements de statut phénotypique des cellules myométriales, d'un phénotype prolifératif, associé à une quiescence utérine, à un phénotype contractile, en passant par une phase intermédiaire d'hypertrophie associée à un remodelage utérin. Ces modifications vont ainsi permettre à l'utérus de se contracter de façon efficace au moment du travail [142-143].

Chez l'humain, les contraintes éthiques ne permettent pas un accès aux échantillons tout au long de la grossesse. Il est alors difficile de savoir si le modèle observé chez les rongeurs est transposable à l'homme. Cependant Charpigny *et coll.* ont mis en évidence dans une étude de génomique fonctionnelle, que la mise en route du travail est caractérisée par une régulation négative des gènes impliqués dans le développement et la prolifération cellulaire, et une régulation positive des gènes de l'inflammation, de l'apoptose et de la contraction [144]. En effet, une régulation positive de la phosphodiesterase PDE-1, dépendante de la calmoduline, a été observée à terme, comme il avait été clairement établi dans le myomètre humain [145]. Parmi les gènes associés à la contraction, une diminution significative de l'expression du récepteur GABA A, jouant un rôle dans la relaxation du myomètre et étant présent dans le myomètre humain non gestant [146], a également été mise en évidence à terme. Cette étude a de plus mis en évidence une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) à terme. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude démontrant une augmentation de cette protéine dans le myomètre humain en fin de grossesse et lors de la mise en route du travail [95]. Enfin, une régulation négative de protéines impliquées dans des voies de signalisation associées à la prolifération, telles que les membres de la famille Ras, la protéine PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase), ainsi qu'une diminution de l'expression de plusieurs facteurs de transcription ont été observées.

a. Phase d'hyperplasie associée à la quiescence utérine

Pendant la gestation, on observe donc une première phase d'hyperplasie myométriale (formation de nouvelles fibres musculaires), associée à une quiescence contractile. Chez le rat, une prolifération intense des cellules myométriales est observée durant les 14 premiers jours de gestation. Cette prolifération est associée à une augmentation de l'expression de facteurs anti-

apoptotiques tels que BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), ainsi qu'à une forte représentation de la voie de l'AMPc, impliquée dans les phénomènes de relaxation [142].

Le cycle de prolifération cellulaire est classiquement divisé en quatre phases ; G1, S, G2 et M (Figure 6). Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en quiescence, ou en phase G0. Le cycle va alors débuter par la transition des cellules de la phase de quiescence G0 vers la phase G1, dite de préparation à la réplication de l'ADN. Au cours de la phase G1, les cellules passent un point de restriction à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé. Après cette transition, la cellule entre en phase de réplication (phase S), puis en phase G2, nécessaire à la préparation en vue de la mitose, phase de division cellulaire (phase M). Le cycle cellulaire est sous contrôle de l'activité de protéines kinase, les kinases dépendantes des cyclines (CDKs, Cyclin-Dependent Kinase). Ces protéines vont jouer un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession des différentes phases du cycle. Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline). Brièvement, CDK4 et CDK6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Le complexe CDK2/cycline E prend ensuite le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par le complexe CDK2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. CDK1/cycline A intervient en G2, CDK1/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose.

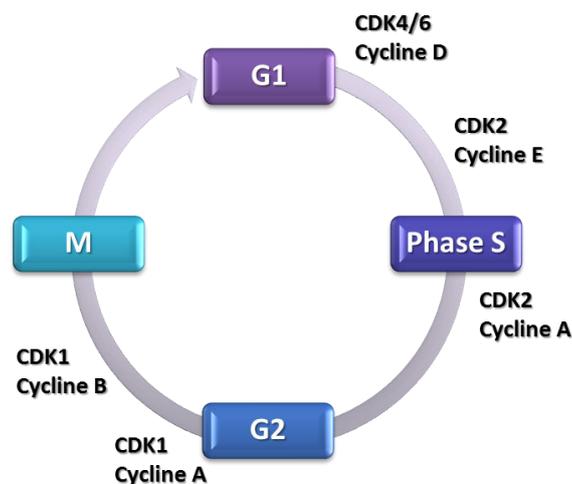


Figure 6 : Phases du cycle cellulaire

D'une manière générale, la décision d'une cellule de se diviser se produit dans la première phase de transition G0/G1, et ceci en réponse à des facteurs mitogéniques activant des récepteurs à activité tyrosine kinase, ou couplés à une protéine G. Les signalisations respectives activées par ces différents facteurs vont converger vers l'activation des Mitogen Associated Protein Kinases (MAPK), parmi lesquelles la voie de signalisation la plus étudiée est la voie ERK1/2, une voie activée par tous les signaux mitogéniques [147].

La cascade des MAP kinases ERK1/2 est une voie de signalisation fortement activée en réponse à une grande variété de stimuli externes. Elle est essentielle pour la prolifération de nombreux types cellulaires. Elle implique une cascade d'évènements de phosphorylation impliquant trois kinases: la serine/thréonine kinase Raf (MAP Kinase Kinase Kinase), les MAP Kinases Kinases MEK1 et MEK2 (Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase MEK1/2) et les effecteurs ERK1/2, qui une fois activées vont transloquer dans le noyau et entraîner l'activation de nombreux facteurs de transcription importants pour la progression du cycle cellulaire. Un rôle clé de la signalisation de ERK1/2 a ainsi été mis en évidence dans toutes les étapes de régulation de l'induction et du déroulement de la phase G1 [148]. Des études de cinétique d'activation ont démontré une activation biphasique de ERK/2, avec un premier pic d'activation soutenu dans les premières minutes, puis un second pic d'activation, moins intense, dans les heures suivant le signal mitotique et maintenu tout au long de la phase G1 [149]. De plus, il a été mis en évidence que l'inhibition de ces deux pics d'activation mène à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, Jaffer *et coll.* ont mis en évidence une activation de cette voie de signalisation ERK1/2 durant toute la phase proliférative chez le rat. Du fait de son rôle clé dans l'induction de la prolifération, l'activation de cette voie de signalisation constitue un mécanisme important dans le maintien de la quiescence utérine [150].

b. Transition en phase d'hypertrophie associée au remodelage utérin

La phase intermédiaire d'hypertrophie, également appelée phase synthétique est caractérisée par une augmentation de la taille des cellules myométriales et une accumulation progressive de protéines contractiles. Chaque fibre myométriale augmente ainsi sa taille d'un facteur dix au cours de la grossesse, passant d'une longueur de 50 à 100 μm avant la grossesse à une longueur de 500 à 800 μm en fin de gestation.

Un évènement important dans la mise en route du travail est l'activation du myomètre, engendrée par l'expression accrue des protéines CAPs. Il existe différents type de CAPs qui vont s'exprimer au cours du travail ; les protéines permettant l'interaction entre actine et myosine entraînant les contractions myométriales, celles augmentant l'excitabilité des cellules myométriales, ainsi que les protéines qui promeuvent les connexions intercellulaires permettant le développement de contractions synchronisées. L'utérus se prépare ainsi à répondre aux facteurs stimulant la contractilité utérine en augmentant l'expression des jonctions gaps et notamment l'expression de la protéine Cx43, ainsi que l'expression des récepteurs à l'ocytocine (OXTR) et des récepteurs aux prostaglandines (PGR). On observe alors une réorganisation du cytosquelette avec une expression accrue de la h-Caldesmon et de la HSP27 (Heat Shock Protein 27) phosphorylées, une augmentation de l'expression des partenaires impliquées dans la signalisation calcique (OXT, $\text{PGF}_{2\alpha}$, COX2), ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine Cx43 permettant la synchronisation des cellules [151-152] (Figure 7).

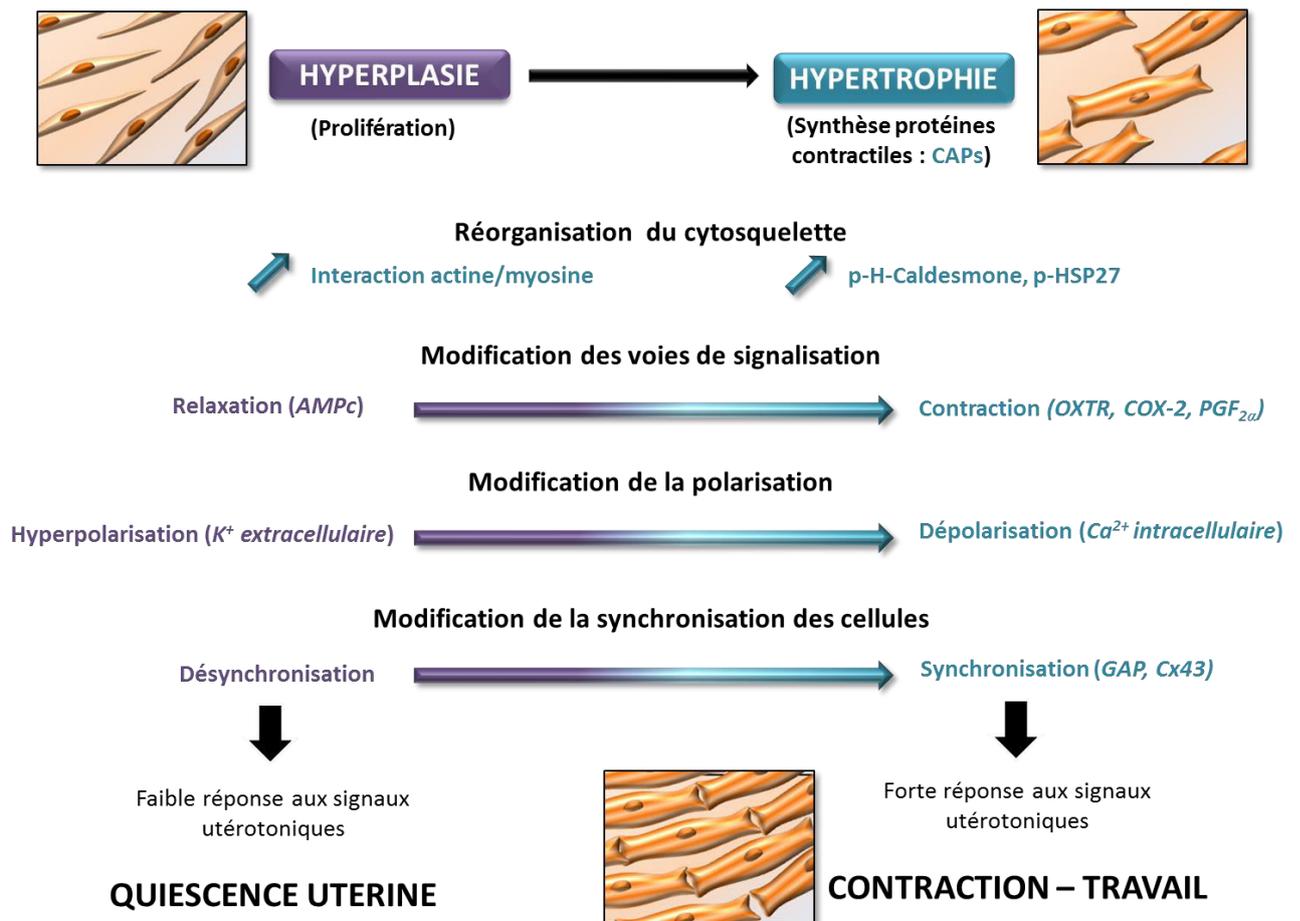


Figure 7 : Transition des cellules myométriales en phase d'hypertrophie

Parallèlement, on observe un remodelage important de la matrice extracellulaire utérine ainsi qu'une apoptose cellulaire. En effet, lors de la mise en route du travail, le remodelage tissulaire est essentiel car il permet à l'utérus de recouvrer une activité contractile efficace [143, 153]. Roh *et coll.* [154] ont ainsi rapporté une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP9 dans les cellules myométriales en travail. Ces observations ont été confirmées par Choi *et coll.* [155] qui ont montré une surexpression de MMP9 dans le myomètre après la mise en route du travail. De plus, 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 MMPs peut être activé par un signal inflammatoire [154]. Ces effets de l'IL-1 β sont liés à l'activation de NF κ B et à la dégradation d'I κ B

[155]. Par ailleurs, MMP3 qui agit à la fois comme enzyme de dégradation et comme activateur de différentes MMPs, est également surexprimée au moment du travail [156]. Notre équipe a de plus 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 [157].

Cette transition phénotypique des cellules myométriales en phase d'hypertrophie semble également coïncider avec une activation apoptotique. En effet, une activation transitoire des caspases, concomitante à une transition du statut phénotypique utérin, a ainsi été mise en évidence chez la rate gestante [142]. D'après Shynlova *et coll.*, 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 [158]. Notre équipe a également 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 (BCL2-Associated X protein) et une diminution de l'expression de BCL2 [159]. Par ailleurs, Leroy *et coll.* [160] 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.

PARTIE III : OBESITE ET TROUBLES DE L'ACCOUCHEMENT

I. Obésité

1. Généralités

a. Définition

Selon l'OMS, l'obésité correspond à une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant engendrer des conséquences néfastes pour la santé [161]. Cette pathologie multifactorielle résulte de l'interaction de facteurs génétiques, environnementaux et métaboliques, contribuant à l'expansion du tissu adipeux. En effet, l'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, menant à une augmentation de poids, se caractérisant par une augmentation du volume moyen et/ou du nombre total de cellules adipeuses [162].

Chez l'adulte, l'obésité s'évalue à partir du calcul de l'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, le calcul de l'IMC a permis de définir différents grades de l'obésité, reportées dans le tableau suivant. Quelques études ont également rapporté deux grades supplémentaires ; la « super-obésité » ($50 \leq \text{IMC} < 60 \text{ kg/m}^2$) et la « super-super obésité » ($\text{IMC} \geq 60 \text{ kg/m}^2$) [163-164].

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

Cependant, l'interprétation de l'IMC selon la classification de l'OMS n'est applicable qu'aux adultes âgés de 18 à 65 ans et n'est pas valable chez les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes très musclées.

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 utéroplacentaire. 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. L'institut de médecine (Institute of Medicine, IOM) a ainsi établi des recommandations quant à la prise de poids pendant la grossesse, en fonction de l'IMC pré-conceptionnel [165] (Tableau 2).

IMC pré-conceptionnel (kg/m ²)	Prise de poids recommandée (kg)	
	Grossesse unique	Grossesse multiple
18,5 - 24,9	11,5 - 16	17 - 25
25,0 - 29,9	7 - 11,5	14 - 23
≥ 30,0	5 - 9	11 - 19

Tableau 2 : Recommandation de l'institution de Médecine sur la prise de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC

La mesure du tour de taille, ou du rapport taille/hanche, est également couramment utilisée, en complément de l'IMC, et permet d'identifier un excès de masse grasse au niveau ventral et donc de mettre en évidence une répartition androïde des graisses. On parle ainsi d'obésité abdominale lorsque le tour de taille est supérieur à 88 cm chez la femme (rapport taille/hanche > 0,8) et supérieur à 102 cm chez l'homme (rapport taille/hanche > 1). Cette répartition du tissu adipeux au niveau de la partie supérieure du corps est plus importante chez l'homme. Chez la femme, une répartition de type gynoïde est principalement observée, avec une répartition des graisses prédominantes dans la partie inférieure du corps [166].

b. Prévalence de l'obésité

L'obésité est devenue un problème majeur de Santé Publique et est dorénavant considérée par l'OMS comme une épidémie mondiale dont la prévalence ne cesse d'augmenter. En effet, en 2014, l'obésité touchait plus de 600 millions d'adultes dans le monde et plus de 1,9 milliards de personnes présentaient un surpoids [7]. Entre 1980 et 2013, la proportion d'individus en surpoids ou obèses dans le monde a ainsi augmenté de 27,5% chez les adultes âgés de 20 ans et plus et de 47,1% chez les enfants âgés de 2 à 19 ans [167]. Autrefois considérés comme un problème propre aux pays à revenu élevé, le surpoids et l'obésité sont désormais présents dans les pays à faible ou moyen revenu. En France, l'étude ObEpi analyse tous les trois ans, et ce depuis 15 ans, la prévalence du surpoids et de l'obésité. En 2012, 32,3% des français adultes, âgés de 18 ans et plus, présentaient ainsi un surpoids, et 15% présentaient une obésité [168]. De plus, la prévalence de l'obésité était plus importante chez les femmes que chez les hommes (15,7% vs. 14,3%), touchant notamment les femmes en âge de procréer. En effet, en 2012, l'obésité concernait 6% des françaises âgées de 18 à 24 ans, 11 % des françaises âgées de 25 à 34 ans et 16% des françaises âgées de 35 à 44 ans [168].

Parallèlement à la progression générale de l'obésité, le nombre de femmes enceintes obèses augmente. Aux Etats-Unis, deux femmes sur trois présentent un surpoids ou une obésité pré-conceptionnelle [169]. Au Royaume-Uni, la prévalence de l'obésité chez les femmes enceintes varie selon les études entre 8,1% et 15% [170-171]. En France, selon une enquête de périnatalité de 2010, 9,9% des femmes enceintes présentent une obésité [172]. 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 Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Dijon étaient obèses avant de débiter leur grossesse.

2. Physiopathologie de l'obésité

a. Expansion du tissu adipeux

Le tissu adipeux blanc est un lieu de stockage énergétique très performant qui a également un rôle d'isolant thermique. Il est composé d'adipocytes adultes, de préadipocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de macrophages. L'obésité induit des altérations majeures du tissu adipeux, telles que l'hypertrophie et l'hyperplasie adipocytaires et l'accumulation de cellules immunitaires telles que les macrophages, contribuant à son expansion [173]. Dans certaines situations, les capacités de stockage des graisses dans le tissu sous-cutané sont dépassées entraînant ainsi leur dépôt au niveau viscéral et au niveau de sites ectopiques comme le tissu cardiaque, hépatique, musculaire et vasculaire [174].

b. Rôle endocrine du tissu adipeux

Longtemps considéré comme un organe inerte de stockage et de libération des lipides en fonction des besoins métaboliques, le tissu adipeux apparaît aujourd'hui comme un véritable organe endocrine capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre en sécrétant ses propres peptides de signalisation, les adipokines (Figure 8). Ces médiateurs ont un impact sur de nombreux tissus cibles et participent directement au contrôle général de la balance énergétique. En effet, la fonction principale du tissu adipeux est la mise en réserve de l'énergie sous forme de triglycérides en période d'apport énergétique, et sa libération, sous forme d'acides gras et de glycérol, en période de stress ou d'efforts, par le processus de la lipolyse. Cependant, il est maintenant connu que le tissu adipeux est également un site de synthèse d'une variété d'adipokines à action autocrine, paracrine et endocrine, qui influencent diverses fonctions telles que la fonction immunitaire, l'angiogénèse et l'homéostasie vasculaire [175-176]. En plus de la production d'adipokines, le tissu adipeux, en condition de stress, sécrète aussi des cytokines pro-inflammatoires contribuant également au contrôle de l'homéostasie énergétique.

i. Adipokines pro-inflammatoires

L'obésité se caractérise par une augmentation de la masse adipeuse dans différentes régions de l'organisme, associée à une élévation modérée mais chronique des taux circulants de médiateurs pro-inflammatoires tels que des marqueurs non spécifiques (protéine C-réactive, CRP), des cytokines (TNF α , MCP1, leptine, résistine, adiposine, visfatine), des interleukines (IL-6, IL-1 β , IL-8) ainsi que des molécules d'adhésion et du remodelage de la matrice extracellulaire (ICAM, VCAM, MMP9) [177-178] (Figure 8). Cette sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires est principalement due au recrutement des macrophages dans le tissu adipeux, *via* l'expression de la chémokine CXCL12, contribuant à favoriser l'angiogénèse [179], mais également au changement de statut phénotypique

des macrophages présents dans le tissu adipeux, en faveur d'un phénotype pro-inflammatoire M1 [180-181]. Ces phénomènes participent à l'induction et au maintien d'un état inflammatoire chronique dit de bas grade observé en cas d'obésité.

De nombreuses études menées chez les sujets obèses ont démontré une augmentation modérée mais chronique des taux circulants de différents médiateurs inflammatoires, qui sont eux-mêmes associés à une augmentation des risques métaboliques et cardiovasculaires [182]. Rao *et coll.* ont ainsi mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-6 et de la CRP chez les personnes obèses, concentrations diminuées après une perte de poids [183]. De même, une augmentation des concentrations plasmatiques de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-8 a également été rapportée, impliquant ainsi ces adipokines dans l'induction de l'inflammation de bas grade observée chez les sujets obèses [184-185]. Parmi les adipokines pro-inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux, la visfatine, dont les concentrations sont également augmentées chez les personnes obèses, est capable de stimuler la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF α [186]. Concernant l'adipsine et la résistine, les études diffèrent et rapportent des concentrations stables ou augmentées en cas d'obésité [187-188]. Enfin, une des adipokines les plus étudiées est la leptine, découverte par Zhang *et coll.* en 1994 [189]. Etant un élément essentiel de notre travail, cette cytokine pro-inflammatoire sera détaillée dans la partie IV de l'introduction.

ii. Adipokines anti-inflammatoires

Le tissu adipeux est également capable de sécréter des adipokines à propriétés anti-inflammatoires telles que l'adiponectine, l'apeline, l'IL-10 ou l'IL-1ra [190-191] (Figure 8). Etant caractérisée par un état inflammatoire chronique de bas grade, l'obésité est alors associée à une diminution de la production d'adiponectine, très exprimée par les adipocytes en situation non pathologique. En effet, les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont de l'ordre de 5 à 30

mg/ml chez les sujets minces et sont significativement diminuées chez les personnes obèses. L'adiponectine est capable de s'opposer à la production de cytokines pro-inflammatoires et de stimuler l'expression de facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 ou l'IL-1ra, en agissant directement sur les monocytes et les macrophages [192], favorisant leur polarisation vers un phénotype tolérogène M2 [193]. Enfin, l'apeline, contrairement aux autres adipokines anti-inflammatoires, voit sa concentration plasmatique augmentée au cas d'obésité [194].

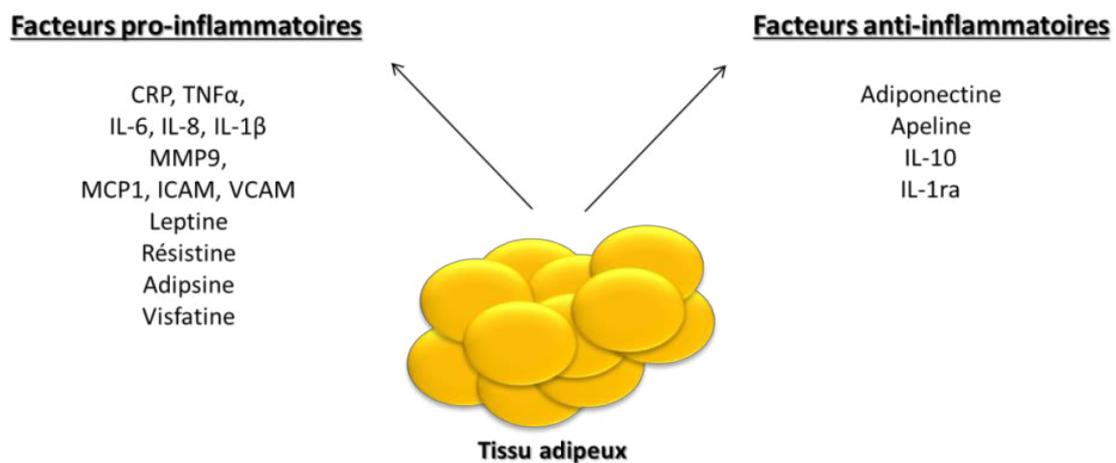


Figure 8 : Adipokines sécrétées par le tissu adipeux

II. Conséquences de l'obésité chez la femme enceinte

La plupart des conséquences de l'obésité sur la santé sont bien connues. Dans le monde, environ 3,4 millions d'adultes meurent chaque année de complications associées à l'obésité. En effet, l'obésité est un facteur de risque majeur pour de nombreuses maladies chroniques, telles que le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Toutefois, l'impact du surpoids et de l'obésité sur le système reproducteur est moins médiatisé.

1. Troubles de la fécondité

Il a été mis en évidence un impact de l'obésité sur les capacités reproductives, l'obésité étant notamment associée à une augmentation des perturbations du cycle menstruel et des troubles de l'ovulation responsables d'un allongement du délai de conception [195-196]. L'obésité est également associée à une diminution des conceptions spontanées ainsi qu'à une augmentation des avortements spontanés [197]. 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 [195-196]. Le risque de fausse couche est augmenté chez les patientes obèses, que ce soient pour les grossesses spontanées ou après une assistance médicale à la procréation [196]. De plus, cette prévalence de fausse couche est fonction de la sévérité de l'obésité. Une personne obèse présente ainsi une augmentation de 67% du risque de fausse couche [198]. Ce résultat, issu d'une méta-analyse de 16 études, est soutenu par d'autres publications dans lesquelles ce risque est particulièrement important au cours du premier trimestre, retrouvé trois fois plus élevé chez les femmes obèses comparées aux femmes de poids normal [199-200].

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 augmentation du risque de diabète et d'hypertension gestationnels ainsi que de pré-éclampsie [201-203]. Dans une cohorte de plus de 16000 patientes, Weiss *et coll.* ont montré qu'en cas d'obésité modérée et sévère, le risque relatif est respectivement 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 [203]. Une étude s'est intéressée aux femmes enceintes dites « super-obèses » (IMC ≥ 50 kg/m²). 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) [164].

3. Troubles de l'accouchement

L'obésité maternelle est associée à de nombreux troubles des mécanismes menant à l'accouchement tels qu'une mise en travail spontanée moins fréquente pouvant aboutir à des dépassements de terme. Étonnamment, l'obésité maternelle semble également associée à des accouchements prématurés, qu'ils soient induits ou spontanés.

a. Accouchements prématurés

L'association entre obésité maternelle et accouchement prématuré reste controversée. En effet, la plupart des accouchements prématurés sont médicalement indiqués en raison de troubles liés à l'obésité [28]. Cependant, certains auteurs ont rapporté une association entre l'obésité et les accouchements prématurés spontanés [27, 204]. En effet, comme mentionné précédemment, un accouchement prématuré peut être la conséquence soit d'une mise en travail spontanée et prématurée, soit d'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 l'obésité, telles que la pré-éclampsie, reconnue comme une des principales causes de mortalité maternelle et périnatale [28]. D'après Hendler *et coll.*, 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 [28]. Cnattingius *et coll.*, quant à eux, ont mis en évidence une augmentation du risque d'accouchements prématurés chez les femmes en surpoids ou obèses, qu'ils soient spontanés ou induits. En effet, le risque de prématurité spontanée extrême augmente avec l'IMC chez les femmes souffrant d'obésité

et les risques de prématurité induite extrême augmentent avec l'IMC chez les femmes souffrant d'obésité mais également chez les femmes présentant un surpoids [204]. Ces résultats sont confirmés par d'autres études [205-207] et notamment par une méta-analyse parue en 2010 regroupant 84 études, soit plus d'un million de patientes [26]. En effet, cette étude montre une augmentation du risque de prématurité spontanée ou induite avant 37 SA et notamment avant 32 SA (prématurité extrême) chez les femmes présentant une obésité de grade II ou de grade III. Cependant, dans l'étude de Baeten *et coll.* [206], 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, soulignant ainsi le fait que l'obésité peut être associée à une augmentation du risque d'accouchements prématurés spontanés.

Néanmoins, il semblerait que les femmes en surpoids ou présentant une obésité de grade I ont un risque réduit de 15% d'accoucher avant 37 SA, comparé aux femmes de poids normal. En effet, certaines études rapportent que l'obésité maternelle est associée à une diminution du risque de prématurité [28, 208] tandis que d'autres études ne montrent aucun effet de l'obésité sur ce risque [209]. Il semblerait que ces différences soient liées à l'hétérogénéité des limites définissant l'obésité et l'accouchement prématuré (spontané *versus* induit), mais aussi au manque de distinction entre les différentes causes d'accouchement prématuré ainsi qu'à l'inclusion de différents âges gestationnels dans de nombreuses études.

b. Accouchements post-terme

Selon l'OMS, une grossesse est dite à terme dépassé si elle se prolonge au-delà de 41 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 [202, 210-211]. En effet, les femmes présentant un IMC élevé ont un taux significativement plus élevé d'accoucher après terme

[212-214], contribuant au besoin accru d'induire le travail dans le cas d'une grossesse prolongée [170]. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence une association entre l'obésité et une durée de grossesse plus longue comparé aux femmes de poids normal. Arrowsmith *et coll.* rapportent ainsi une élévation du risque de grossesse prolongée en relation avec l'augmentation de l'IMC, avec un risque relatif de 1,52, 1,75 et 2,27 respectivement, pour les femmes présentant une obésité de grade I, II et III [214]. Denison *et coll.* ont de plus montré que la durée de la grossesse s'allonge proportionnellement à l'IMC pré-conceptionnel. Chez les femmes obèses, la probabilité d'une mise en travail spontanée est alors divisée d'un facteur deux par rapport aux femmes de poids normal [210].

L'obésité est alors également associée à une augmentation du taux de déclenchement du travail. Wolfe *et coll.* ont ainsi mis en évidence une fréquence de déclenchement de 34% chez les femmes obèses *versus* 28% chez les femmes de poids normal, avec un taux d'échec plus important chez les patientes obèses (29% *versus* 13%) [215]. Scott-Pillai *et coll.* ont retrouvé des résultats similaires, soulignant un risque accru de déclenchement du travail chez les femmes obèses, pouvant s'expliquer par la fréquence plus importante de pathologies associées à la grossesse (diabète, pré-éclampsie) et de dépassements de terme chez ces femmes [216]. Cedergren *et coll.* 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 [202]. Différentes études ont également démontré une augmentation du risque d'accouchement par césarienne, variant entre 1,5 et 3, chez des femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal [170, 217-218], le risque augmentant de façon proportionnelle avec l'IMC. Ducarme *et coll.* retrouvent ainsi 34,4% d'accouchements par césarienne chez les patientes obèses, contre 16,9% chez les patientes de poids normal [201].

Une des hypothèses avancées afin d'expliquer ces perturbations de la mise en route du travail est l'absence ou l'irrégularité des contractions utérines observées chez les femmes enceintes obèses [211]. L'étude *in vitro* de Zhang *et coll.* [171] réalisée sur des biopsies de myomètre montre en effet 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 [201, 219-220].

PARTIE IV : LA LEPTINE ET SES RECEPTEURS

I. La leptine

1. Généralités

Découverte en 1994 par Zhang et *coll.* [189], la leptine est une protéine de 167 acides aminés (aa), de poids moléculaire égal à 16 kDa et codée par le gène *Ob*, situé sur le chromosome 7 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris [221]. Le gène *Ob* mesure 650 kilobases, réparties en trois exons, séparés par deux introns, la région codante pour la leptine se situant sur les exons 2 et 3. L'étude des régions promotrices du gène a permis de mettre en évidence des éléments de régulation, notamment l'élément de réponse à l'AMPc (CRE, cAMP Responsive Element), aux glucocorticoïdes (GRE, Glucocorticoïdes 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) [222]. La séquence du gène *Ob* est fortement conservée chez les mammifères et la leptine humaine possède un taux d'homologie de 84% et 83% avec la leptine de souris et de rat respectivement [221]. Elle est formée de quatre hélices alpha antiparallèles caractéristiques de la famille des cytokines et possède dans la partie C-terminale, un pont disulfure entre deux cystéines (Cys⁹⁶ et Cys¹⁴⁶), crucial pour son intégrité structurale et sa stabilité [223]. Enfin, la région responsable de l'activité biologique de la leptine, identifiée en étudiant le poids et la consommation de nourriture chez des souris déficientes en leptine après injection de peptides de synthèse correspondant à différentes régions de la leptine, se situe entre les résidus 106 et 140 [224].

2. Fonction principale

a. Fonction principale

Du grec "*leptos*", signifiant "*maigre*", la leptine a pour rôle principal la régulation de la balance énergétique et du poids corporel. Reflet de l'état des réserves énergétiques, elle communique avec le système nerveux central afin d'ajuster l'apport alimentaire et les dépenses énergétiques [225]. Les principales cibles d'action de la leptine se situent au niveau du cerveau et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus, territoire cérébral renfermant les centres de la satiété et de la faim [226]. Une augmentation du taux de leptine signale ainsi au cerveau qu'un excès d'énergie est mis en réserve, provoquant alors une adaptation en diminuant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques. Cela empêche un déséquilibre de la balance énergétique, permettant de lutter contre la prise de poids et donc contre le développement de l'obésité.

Pour agir au niveau central, la leptine doit nécessairement traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin d'agir sur deux populations de neurones. Dans le noyau arqué, la leptine interagit avec un circuit neuronal complexe afin de contrôler la prise alimentaire, en stimulant l'activation de neurones exprimant des peptides anorexigènes (Pro-OpiomélanoCortine (POMC) et Cocaine and Amphetamine Related Transcript (CART)) et en inhibant l'activation de neurones synthétisant des peptides orexigènes (Neuropeptide Y, NPY et Agouti-related peptide, AgRP) [176]. Pendant le jeûne, les taux circulants de leptine diminuent rapidement, entraînant une augmentation de l'expression de NPY et AgRP et une diminution de l'expression de POMC et CART, résultant ainsi en une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique [227].

b. Autres fonctions

Depuis sa découverte, la vision initiale de la leptine comme cytokine adipocytaire régulant la balance énergétique au niveau central a largement évolué. En effet, la leptine semble être impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme glucidique et lipidique ainsi que l'homéostasie du tissu adipeux et vasculaire [226]. La leptine a également un effet spécifique sur la réponse immunitaire en exerçant des activités prolifératives et anti-apoptotiques dans de nombreux types cellulaires, notamment les lymphocytes T et les progéniteurs hématopoïétiques. Elle affecte également la production de cytokines ainsi que l'activation des monocytes/macrophages [228]. La leptine agit également comme facteur angiogénique, notamment au niveau du tissu adipeux, dans le but de permettre un apport suffisant en nutriments et en oxygène [229] (Figure 9).

De plus, la leptine semble également intervenir dans le déclenchement de la puberté, la reproduction, ainsi qu'au cours de la grossesse [230] (Figure 9). En effet, la leptine joue un rôle sur la reproduction, comme l'attestent diverses études menées notamment chez la souris. Ainsi, des souris mâles ou femelles déficients en leptine (*ob/ob*) présentent, en plus d'un phénotype obèse, une stérilité, corrigée par l'administration exogène de cette hormone [231]. De même, une stérilité est également observée chez des souris possédant une mutation du gène codant le récepteur à la leptine (*db/db*). Cependant, l'administration de leptine est incapable de restaurer la fertilité, le blocage se situant au niveau de son récepteur n'assurant plus la transduction du signal.

Ce rôle de la leptine dans la fertilité a également été observé chez l'homme. En effet, des personnes présentant un déficit en leptine ou en son récepteur, dû à une mutation de son gène, développent très tôt une obésité sévère et ne présentent pas de maturation sexuelle. Les femmes sont en aménorrhée primaire et les hommes montrent des signes d'hypogonadisme avec une absence de développement des caractères sexuels secondaires [232]. Une signalisation défectueuse de la leptine est ainsi associée à un retard ou une absence de puberté et une fertilité compromise.

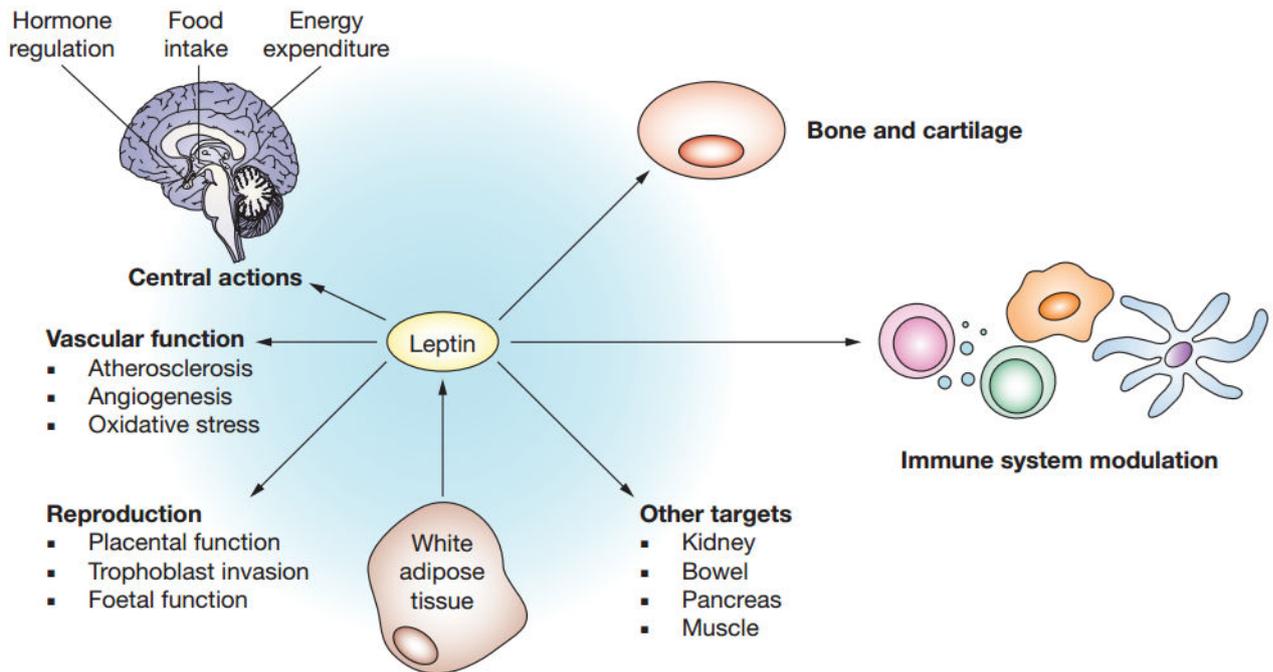


Figure 9 : Rôle pléiotropique de la leptine [226]

3. Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine

La leptine appartient à la famille des adipokines et est donc principalement synthétisée et sécrétée par les adipocytes du tissu adipeux blanc [233]. Cependant, il est maintenant établi que la leptine est également synthétisée par de nombreux autres tissus [234], tels que l'épithélium mammaire [235], le placenta [236] et les follicules ovariens [230].

Les taux de leptine circulante reflètent positivement la taille du tissu adipeux et représentent ainsi l'état des réserves énergétiques [237]. 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 [238]. Les taux circulants de leptine sont

également dépendants du statut nutritionnel du sujet et présentent des fluctuations circadiennes, avec un maximum atteint entre minuit et le début de matinée. Le jeûne diminue ainsi les taux circulants de leptine, tandis qu'une suralimentation les augmente [239]. De plus, il a été mis en évidence que la régulation de la concentration plasmatique de leptine 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 [240-241]. Au contraire, le jeûne entraîne en quelques heures une baisse du taux de leptine chez les deux espèces, et celui-ci est rétabli par la réalimentation [221]. 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.

Chez l'homme et les rongeurs, la sécrétion de leptine par les adipocytes n'est pas continue mais pulsatile, caractérisée par des pics de sécrétion de faible amplitude mais de fréquence élevée [242]. Bien que les caractéristiques pulsatiles soient identiques chez les personnes minces et obèses, il a été montré que l'amplitude des pics est plus importante chez les personnes présentant une obésité [234]. La synthèse et la sécrétion de leptine sont augmentées par les glucocorticoïdes, l'insuline et les cytokines pro-inflammatoires [243] tandis que l'activation des récepteurs β -adrénergiques, l'élévation d'AMPc intracellulaire et l'exposition au froid les diminuent [244]. De plus, la synthèse de leptine est stimulée par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β , pouvant expliquer la perte de poids observée lors de réactions infectieuses ou inflammatoires [221].

II. Récepteurs à la leptine

1. Généralités

La leptine agit en se fixant à son récepteur spécifique OB-R, appartenant à la superfamille des récepteurs aux cytokines de classe I, présentant notamment de nombreuses analogies structurelles et fonctionnelles avec le récepteur de l'interleukine 6 (IL-6R). Situé sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 1 chez l'homme, le gène OB-R code pour des isoformes du récepteur de différentes tailles, obtenues par épissage alternatif.

2. Structure et distribution tissulaire des récepteurs à la leptine

a. Structure des récepteurs

Le récepteur à la leptine est un récepteur contenant un seul domaine transmembranaire. Il est constitué d'un domaine extracellulaire d'environ 800 aa, d'un domaine membranaire de 34 aa et d'un domaine intracellulaire dont la taille diffère selon les isoformes. Dans sa partie extracellulaire, le récepteur à la leptine possède le motif peptidique Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), deux domaines CRH (Cytokin Receptor Homology) ainsi que quatre domaines fibronectine de type III, caractéristiques de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I [245]. La partie intracellulaire du récepteur ressemble plus particulièrement à la chaîne gp130, l'un des composants des récepteurs à l'IL-6 [246]. A l'heure actuelle chez l'humain, cinq isoformes du récepteur ont été dénombrées et réparties en trois catégories : l'isoforme longue (OB-RL), trois isoformes courtes (OB-RS) et une isoforme soluble (OB-Rsol) [247] (Figure 10). Chez la souris et le rat, on dénombre également 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 [221].

i. Isoforme longue OB-RL du récepteur

L'isoforme longue OB-RL du récepteur à la leptine possède un domaine intracellulaire de 302 aa. Elle semble être la forme physiologiquement active. En effet, OB-RL est dite « isoforme fonctionnelle », son domaine intracellulaire contenant les séquences permettant l'interaction avec des protéines de transduction du signal, telles que JAK2 (Janus Kinase 2), et donc nécessaires à l'activation de toutes les voies de signalisation décrites comme étant couplées au récepteur à la leptine.

ii. Isoformes courtes OB-RS du récepteur

Obtenues par épissage alternatif, les isoformes courtes possèdent un domaine intracellulaire dont la taille est réduite à 30 - 40 aa. Ne possédant pas les motifs intracellulaires nécessaires à l'activation de certaines voies de signalisation, elles étaient initialement considérées comme non fonctionnelles. Cependant, il est maintenant établi que ces isoformes courtes possèdent des capacités de signalisation réduites [248]. Il semblerait de plus qu'elles participent au passage de la leptine à travers la BHE, du sang vers le liquide céphalo-rachidien [249], mais également au transfert de la leptine du placenta vers le fœtus [250].

iii. Isoforme soluble OB-Rsol du récepteur

Bien que l'ARNm codant l'isoforme soluble OB-Rsol ait 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

ayant fixé la leptine [251]. Cette isoforme, dépourvue de domaine transmembranaire et de domaine intracellulaire, constitue la principale protéine de transport plasmatique de la leptine [245] et permet également de réguler la proportion de leptine libre dans le plasma, contrôlant ainsi son activité biologique. Elle constitue un important régulateur et peut expliquer les variations rapides du taux de leptine survenant dans les cas de satiété ou d'alimentation.

b. Distribution tissulaire des récepteurs

Initialement, l'expression de l'isoforme longue OB-RL n'a été démontrée qu'au niveau central, 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, renforçant l'hypothèse de leur implication dans le transport de la leptine à travers la BHE [245]. Le récepteur à la leptine a ensuite été mis en évidence dans de nombreux tissus périphériques, notamment au niveau des tissus de la sphère utéro-placentaire tels que le myomètre [252], l'endomètre [253] et le placenta [236]. Cette distribution ubiquitaire suggère une grande diversité des fonctions de la leptine et des processus biologiques qu'elle régule [254].

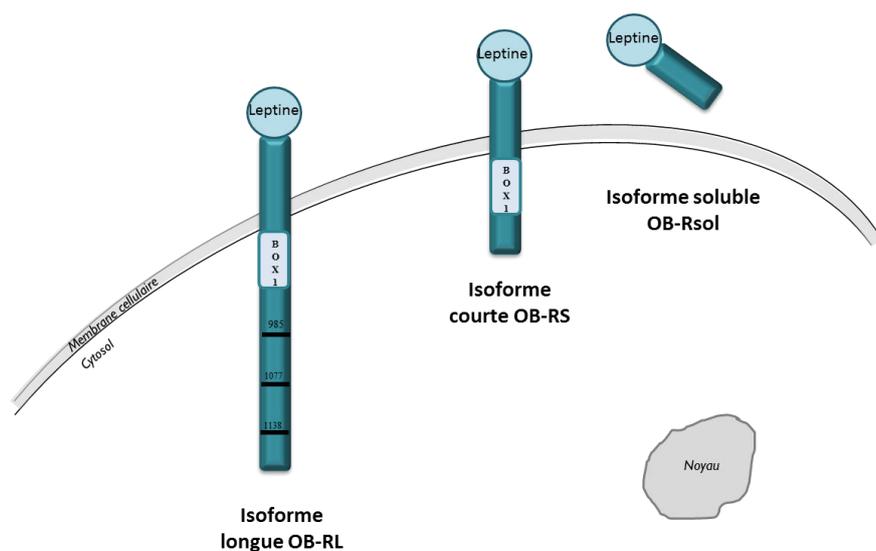


Figure 10 : Les différentes isoformes du récepteur à la leptine

III. Voies de signalisation

1. Dimérisation et internalisation du récepteur

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.

La première étape de transduction du signal de la leptine est l'homodimérisation de ses récepteurs. En effet, la fixation de la leptine sur son récepteur, selon une stœchiométrie 1:1, entraîne la formation d'homodimères indispensables à son activation [254]. Après fixation de la leptine sur son récepteur, le complexe est internalisé à partir de structures membranaires spécialisées, « les puits recouverts de clathrine ». Les récepteurs endocytés peuvent alors être recyclés à la surface de la cellule, vers la membrane plasmique, ou dégradés par les endosomes. Dans des conditions standards, seulement 5 à 25% des récepteurs à la leptine sont présents au niveau de la membrane plasmique, la majorité étant regroupée au niveau intracellulaire [245].

2. Voies de signalisation

Trois voies de signalisation ont principalement été décrites comme étant couplées au récepteur à la leptine et activées par la fixation de la leptine sur OB-R. on retrouve ainsi la voie JAK/STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), la voie PI3K/AKT, et la voie des MAPK/ERK1/2 [245].

Le récepteur à la leptine ne possédant pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, son activation n'est possible que par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase telles que les JAKs, notamment JAK2 [255], impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables de la survie et de la prolifération cellulaires. L'interaction entre les récepteurs activés

par la leptine et les protéines JAK2 se fait *via* les domaines conservés du récepteur à la leptine, notamment le domaine «box1» [256]. La liaison du ligand entraîne donc une auto-phosphorylation de JAK2 qui s'active et phosphoryle trois résidus tyrosines (Y^{985} , Y^{1077} , Y^{1138}) présents uniquement sur l'isoforme longue OB-RL. Ceci permet le recrutement d'autres molécules de signalisation conduisant à l'activation des trois voies de signalisation principalement décrites.

a. Voie de signalisation JAK/STAT

Une fois le récepteur activé par la fixation du ligand et par la phosphorylation de ses résidus tyrosines par JAK2, les protéines STATs, notamment STAT3 et STAT5, vont être recrutées par interaction entre les tyrosines phosphorylées Y^{1077} et Y^{1138} de OB-RL, et leur domaine SH2 (Src-like Homology 2) [257]. La tyrosine Y^{1077} va permettre l'activation de STAT5 alors que la tyrosine Y^{1138} va permettre l'activation de STAT3. Ces dernières sont alors phosphorylées par JAK2, puis, après leur dissociation du récepteur, les protéines STATs activées migrent dans le noyau où elles vont se rassembler en homodimères et agir comme facteur de transcription de gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire, ainsi que dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel (Figure 11). Les isoformes courtes du récepteur ne possèdent pas les sites de phosphorylation nécessaires à la liaison des facteurs STATs et sont donc incapables d'activer cette voie [258]. STAT5 est connu pour jouer un rôle dans les phénomènes de la reproduction alors que STAT3 semble être le médiateur des principaux effets de la leptine sur l'homéostasie énergétique et sur les fonctions neuroendocrines [259], mais semble également jouer un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose [260].

b. Voie de signalisation des MAPK

Contrairement à la voie JAK/STAT, la voie des MAPK peut être activée par l'isoforme longue et les isoformes courtes du récepteur à la leptine. Son activation peut être initiée selon deux voies distinctes, *via* le domaine intracellulaire phosphorylé du récepteur ou indépendamment de celui-ci [248]. En effet, l'activation de OB-RL par la leptine entraîne le recrutement de JAK2 et donc sa phosphorylation sur la tyrosine Y⁹⁸⁵, permettant ainsi l'activation de la protéine SHP-2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase). Les isoformes courtes du récepteur ne possédant pas de site de phosphorylation, l'activation de SHP-2 se fait directement *via* JAK2 [261]. Dans les deux cas, l'activation de la protéine SHP-2 est indispensable et permet le recrutement de la protéine adaptatrice Grb-2 (Growth factor receptor binding protein 2) qui active ensuite la protéine SOS (Son of Sevenless). Cette protéine active à son tour une autre protéine, Ras, déclenchant ainsi la cascade d'activation des MAPK [262]. L'activation de Ras entraîne celle de la protéine Raf qui est alors capable d'activer la protéine MEK1/2. Cette dernière active ensuite la protéine ERK1/2 qui migre alors dans le noyau et agit sur l'expression de gènes cibles spécifiques tels que *c-fos* et *egr-1*, impliqués dans les phénomènes de survie, de prolifération et de différenciation cellulaires [261] (Figure 11). A l'instar des cytokines, la leptine est également capable d'activer les protéines p38MAPK et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), impliquées dans des phénomènes de stress cellulaire.

c. Voie de signalisation PI3K/AKT

L'activation des protéines IRS1/2 (Insulin Receptor Substrate 1/2) est la première étape de cette voie. Les isoformes courtes du récepteur à la leptine activent IRS1/2 par interaction directe avec la protéine JAK2 alors que l'isoforme longue les active *via* son domaine intracellulaire préalablement phosphorylé par JAK2 [256]. Ces protéines activent alors la protéine PI3K [263], qui active à son tour les protéines kinases B (PKB ou AKT) ou C (PKC), *via* différents intermédiaires tels

que PIP3 (phosphoinositol (3,4,5) phosphate 3) ou PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) [245] (Figure 11). 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 Rapamycine), NFκB et BCL2 [264-265]. Cette voie semble également être impliquée dans la régulation des fonctions neuroendocrines ainsi que dans les phénomènes de résistance à la leptine et à l'insuline [260]. Il est important de noter que la PKC qui est capable d'activer la protéine Raf, sert de lien entre la voie de la PI3K et la voie des MAPK.

d. Autre voie de signalisation

La leptine peut activer la voie de l'AMPK (5'-AMP-Activated Protein Kinase), une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire, en cas de déficit énergétique, stimulant 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 [245] ainsi que dans les phénomènes de prolifération et de survie cellulaires [260]. Bien que la leptine et son récepteur présentent des similarités structurelles et fonctionnelles avec l'IL-6 et son récepteur IL-6R, il est important de noter que l'IL-6 est également capable d'activer la voie de signalisation pro-inflammatoire NFκB, après liaison à son récepteur [266].

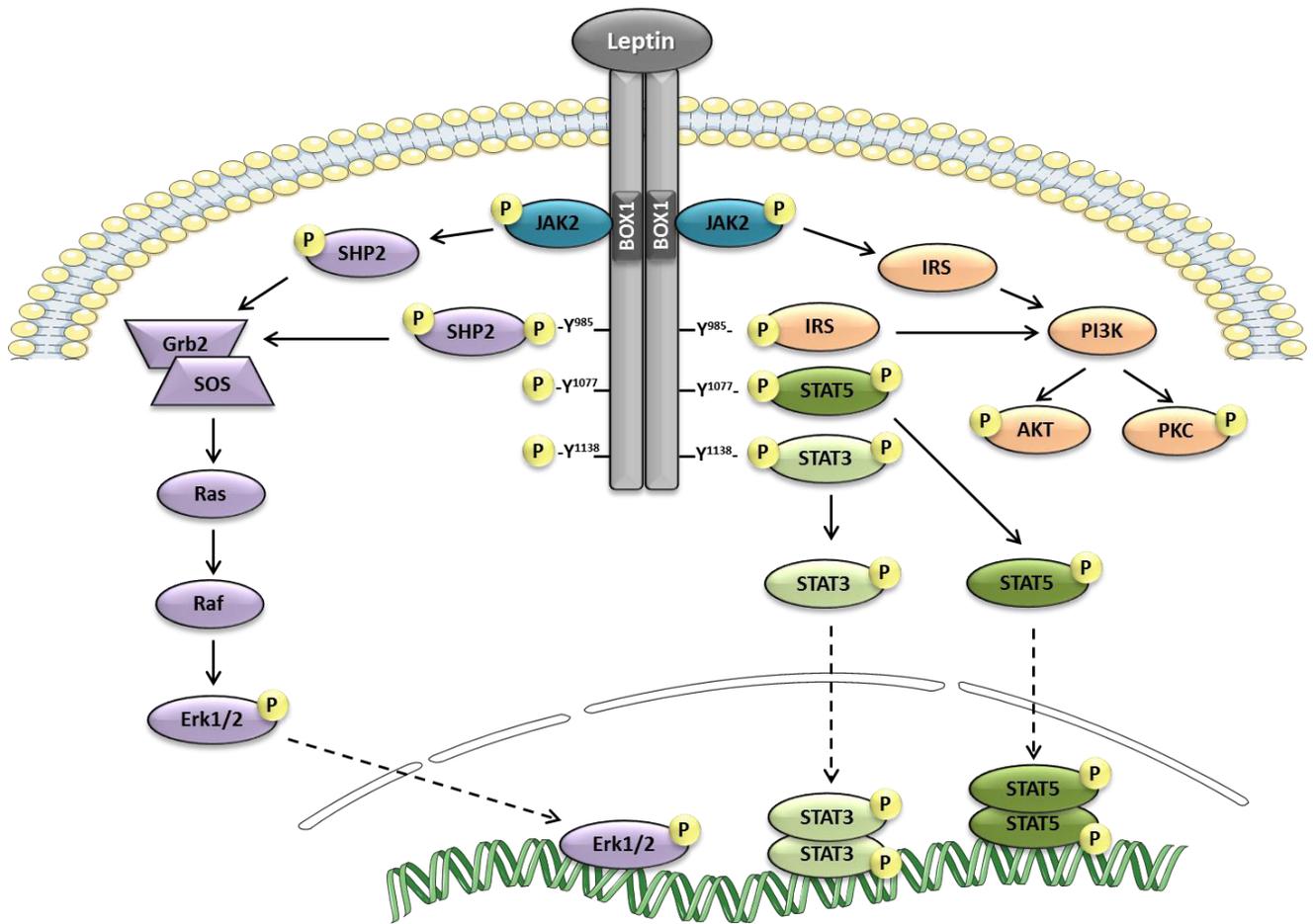


Figure 11 : Principales voies de signalisation couplées au récepteur à la leptine

3. Régulateurs négatifs des voies de signalisation

La cascade de signalisation de la leptine peut se terminer par l'induction de l'expression du gène *SOCS-3* (Suppressor of Cytokine Signalling 3). En effet, *SOCS-3* est synthétisée *via* la voie de signalisation *STAT3*, en réponse à une stimulation de OB-RL par la leptine. La protéine *SOCS-3* est alors capable de se fixer sur le résidu tryrosine Y^{985} du récepteur à la leptine et sur *JAK2*, entraînant ainsi l'inhibition de *JAK2* et donc l'inhibition de la signalisation du récepteur à la leptine [267]. Ainsi, la leptine induit la synthèse de *SOCS-3* *via* la voie *JAK/STAT* afin de prévenir l'activation excessive de son récepteur. Comme *SOCS-3*, la protéine *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 [260, 268].

IV. Leptine et fonctions biologiques

Les formes les plus communes et les plus fréquentes d'obésité humaine sont associées à une hyperleptinémie résultant d'une surexpression adipocytaire et conduisant au développement d'une résistance à la leptine.

1. Hyperleptinémie

L'obésité est associée à une surexpression adipocytaire de leptine. En effet, il est actuellement bien démontré que l'adipocyte hypertrophié est caractérisé par une augmentation de la production de leptine [269]. Le dérèglement de la sécrétion de leptine semble favoriser le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux de personnes obèses, puisque celle-ci augmente l'expression des molécules d'adhésion endothéliales. Gruen *et coll.* ont ainsi démontré que la leptine est capable d'agir, *in vitro*, comme une molécule chimioattractante pour les monocytes et les macrophages [270], favorisant ainsi le recrutement de cellules immunitaires au niveau du tissu adipeux et donc la production de cytokines pro-inflammatoires.

Cette surexpression de leptine est à l'origine d'une élévation de son taux plasmatique [271-272]. Les concentrations plasmatiques de leptine sont ainsi positivement corrélées à l'IMC et à la quantité totale de masse grasse, passant d'une concentration de 5 à 15 ng/ml chez les personnes de poids normal à une concentration d'environ 30 ng/ml chez les personnes en surpoids, et pouvant atteindre des concentrations de 40 à 60 ng/ml chez des individus obèses [273-274].

L'hyperleptinémie, étroitement liée au degré d'obésité, mène à un état de résistance à la leptine. En effet, cette hormone aux effets anorexigènes devrait normalement induire une inhibition de la prise alimentaire et une perte de poids. Ceci n'étant pas observé chez les personnes obèses, la notion de résistance à la leptine s'est développée et est maintenant étayée par de nombreuses études [272, 275].

2. Résistance à la leptine

Chez la souris, des expériences d'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisse (DIO, Diet-Induced Obesity), ont permis de démontrer ce phénomène de résistance à la leptine et d'en préciser la chronologie. En effet, Lin *et coll.* ont soumis des souris à un régime alimentaire hyperlipidique et ont étudié les effets d'injections périphériques et centrales de leptine, par la mesure du poids et de la prise alimentaire. Après une semaine, l'injection intra-péritonéale de leptine entraîne une baisse du poids et de la prise alimentaire. A huit semaines de régime, ces souris 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, elles deviennent également résistantes à la leptine d'origine centrale. De plus, une diminution de l'apport alimentaire est observée entre quatre et huit semaines de régime, tandis que leur poids ne cesse d'augmenter [276].

Chez l'homme, l'obésité se caractérise par des taux élevés de leptine circulante. En dépit des concentrations importantes qui devraient réduire la prise alimentaire, les individus sont résistants à l'action de la leptine et leur masse corporelle reste élevée. Des essais cliniques portant sur les effets de la leptine sur la prise alimentaire ont démontré une perte de poids modeste chez la plupart des sujets obèses [277]. L'obésité, malgré des concentrations élevées de leptine circulante [272] mène alors à un état de résistance à la leptine, qui à son tour aggrave l'obésité et l'hyperphagie [278].

Les causes et les mécanismes du développement de la résistance à la leptine sont encore mal définis. Cependant, plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène, notamment un défaut de transport de la leptine à travers la BHE, un défaut de fonctionnement de son récepteur ou une augmentation de sa dégradation, ainsi qu'une altération de la signalisation des récepteurs hypothalamiques [279]. L'inflammation et le stress du réticulum endoplasmique ont également été mis en cause dans ce phénomène [280-281].

En effet, 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, *via* un mécanisme saturable [282]. Les niveaux de leptine étant diminués dans le liquide céphalo-rachidien en cas d'obésité, un défaut de transport de la leptine semble alors contribuer à cet état de résistance à la leptine [283]. Ainsi, des concentrations élevées de leptine circulante peuvent aboutir à une saturation des transporteurs de leptine et ainsi compromettre son passage à travers la BHE [284]. Il a été mis en évidence chez l'homme, une diminution du ratio « concentration plasmatique/concentration sérique de leptine », permettant d'évaluer l'efficacité de transport à travers la BHE, chez les personnes obèses [237, 284]. 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. Etant donné que les principaux effets de la leptine s'exercent au niveau central, la réduction de ces capacités de transport à travers la BHE pourrait être à l'origine de la résistance observée dans l'obésité.

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. En effet, en cas d'obésité, la proportion de leptine libre circulante augmente alors que le taux de récepteur soluble diminue [273, 285]. 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 [286]. 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.

Enfin, un défaut de signalisation du récepteur a également été mis en évidence pour jouer un rôle dans la survenue d'une résistance à la leptine. En 2000, El Haschimi *et coll.* [283] ont confirmé qu'en cas d'obésité, la diminution de l'activation de STAT3 résulte d'une diminution du passage de la leptine à travers la BHE, mais également d'un défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques. De plus, l'activation de OB-R étant régulée négativement par les protéines SOCS3 et PTP1B, empêchant la suractivation des voies de signalisation couplées au récepteur à la leptine [287], le défaut de signalisation des récepteurs hypothalamiques pourrait alors également s'expliquer par une élévation de l'expression et/ou de l'activation de ces deux protéines régulatrices. Ainsi, l'expression hypothalamique de SOCS3 [288] et de PTP1B [289] est significativement augmentée chez des souris présentant une obésité associée à une résistance à la leptine.

V. Leptine et grossesse

1. Variation du taux de leptine pendant la grossesse

a. Leptine maternelle

Chez la femme enceinte, le taux plasmatique de leptine augmente graduellement tout au long de la grossesse [290], atteint un pic durant le second trimestre [291] puis diminue par la suite [292] (Figure 12). En effet, dans les 24 heures suivant l'accouchement, la leptinémie chute brutalement pour revenir aux valeurs pré-conceptionnelles [293].

D'après Highman *et coll.* [294], 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, les concentrations de leptine augmentent significativement en début de grossesse, avant la survenue de changements majeurs de la masse grasse. Ainsi, 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. La masse grasse n'augmente qu'ultérieurement et n'est associée qu'à 7% de l'augmentation des concentrations de leptine [294]. 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 suggère que ce site de synthèse est le placenta. De plus, il est important de noter qu'aucune corrélation entre la leptinémie maternelle et le poids de naissance ou la masse grasse du nouveau-né n'a été mise en évidence, soulignant l'absence de transfert de leptine maternelle vers le fœtus [295].

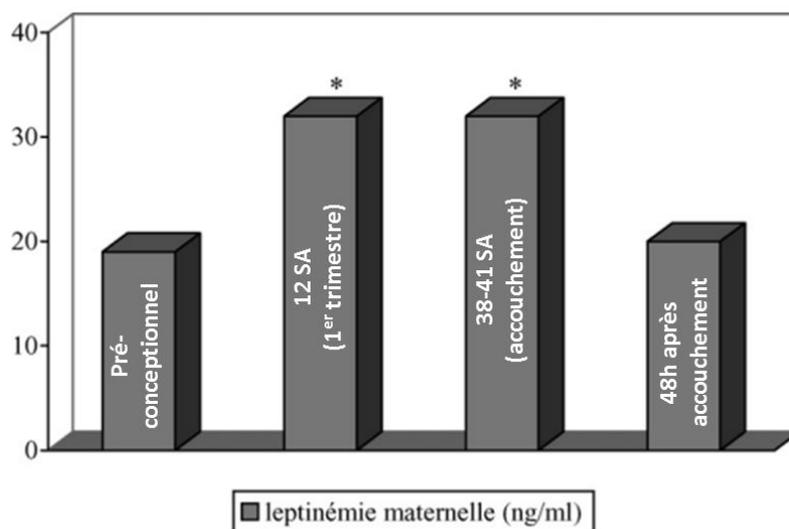


Figure 12 : Evolution des concentrations plasmatiques de leptine au cours de la grossesse (d'après [296]).

La leptinémie maternelle est corrélée à l'IMC pré-conceptionnel quel que soit le terme de la grossesse [293]. Son augmentation au cours de la grossesse est plus faible chez les femmes obèses

que chez les femmes de poids normal [290]. Cependant, les femmes obèses présentent des concentrations plasmatiques de leptine plus élevées par rapport aux femmes de poids normal tout au long de la grossesse [297]. De plus, la source de cette augmentation de leptine au cours de la grossesse chez les femmes obèses est due à une augmentation des dépôts de tissus adipeux, comme démontré par une étude de Farley *et coll.* [298] qui n'ont rapporté aucune différence dans la production de leptine placentaire et aucun changement dans les concentrations plasmatiques de leptine fœtale.

b. Leptine placentaire

Au cours de la grossesse, le placenta est la principale source de leptine maternelle [294]. En effet, l'augmentation de la leptinémie maternelle précède l'hypertrophie du tissu adipeux et donc l'augmentation physiologique de l'IMC [294]. La leptine placentaire est exprimée dans les cellules cyto- et syncytio-trophoblastiques, situées sur la face maternelle du placenta, en contact direct avec le sang maternel [299-300], ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des capillaires fœtaux, en contact direct avec le sang fœtal [301]. Cette localisation suggère une sécrétion de leptine placentaire dans les circulations maternelle et fœtale. Des études ont permis de démontrer que la majeure partie de la leptine produite par le placenta est sécrétée dans la circulation maternelle [302]. En effet, Lepercq *et coll.* [303] ont identifié, dans une étude *in vitro* de placentas humains isolés, que 95% de la leptine placentaire est libérée dans la circulation maternelle et seulement 5% dans la circulation fœtale.

Contrairement à la leptinémie maternelle, l'expression placentaire de leptine diminue au cours de la grossesse. En effet, Henson *et coll.* [236, 304] 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} versus 160^{ème} jour de gestation) et de femmes (7-14^{ème} SA

versus 38^{ème} SA). Il semblerait donc que la leptinémie maternelle ne reflète l'expression génique placentaire de leptine qu'en début de grossesse.

La leptine placentaire est identique à la leptine du tissu adipeux et est synthétisée à des concentrations comparables à celle de la cellule adipeuse [300]. Cependant, une séquence promotrice spécifique du gène de la leptine placentaire, « Placental Leptin Enhancer Element 3 » (PLE3), a été identifiée [299, 305]. Ainsi, l'expression de la leptine placentaire semble être régulée de manière différente que la leptine synthétisée par le tissu adipeux. Par conséquent, la leptine placentaire humaine pourrait jouer un rôle distinct au cours de la grossesse.

Par ailleurs, l'obésité maternelle ne semble pas interférer avec la synthèse placentaire de leptine. En effet, Farley *et coll.* [298] n'ont montré aucune variation de l'expression de leptine entre des placentas issus de femmes obèses et de poids normal, à terme.

c. 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 [303]. La leptine a été détectée dans les artères ombilicales dès la 18^{ème} SA et son taux augmente tout au long de la grossesse [306-307]. Chez l'Homme, de nombreuses études ont démontré une corrélation positive entre la leptinémie ombilicale et la masse grasse fœtale, comme chez l'adulte, ainsi qu'avec le poids de naissance [295, 308-309]. Ainsi, la leptine ombilicale apparaît comme étant un bon marqueur d'adiposité fœtale.

Outre sa production placentaire, la leptine est également synthétisée par les membranes fœtales [310]. Une sécrétion de leptine a ainsi été détectée dans le liquide amniotique [300] à une concentration de $3,6 \pm 0,8$ ng/ml [311].

d. Expression des récepteurs à la leptine pendant la grossesse

Au cours de la grossesse, l'augmentation des concentrations plasmatiques de leptine est en partie due à une accumulation de graisse corporelle ainsi qu'à la production de leptine par le placenta [303]. Cette élévation de la concentration plasmatique de leptine est maintenue par une augmentation de la liaison de la leptine à son récepteur soluble OB-Rsol [312-313]. En effet, il est admis qu'en dépit de l'augmentation de la leptinémie maternelle, le rapport « leptine libre/leptine totale » ne varie pas au cours de la grossesse [314]. La conséquence de cette augmentation de la fraction liée de leptine plasmatique est la survenue d'une résistance centrale à la leptine par diminution de sa clairance plasmatique, aboutissant à une distribution limitée aux tissus cibles. Il a ainsi été mis en évidence une synthèse accrue de l'isoforme soluble du récepteur à la leptine OB-Rsol au cours de la grossesse [314].

Outre la synthèse de leptine, l'expression des isoformes longue et courtes de son récepteur, a également été mise en évidence dans le tissu placentaire humain [236]. Cependant, aucune variation de l'expression des récepteurs OB-RL et OB-RS au cours de la grossesse n'a été démontrée dans le placenta humain [236]. Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont permis de localiser les récepteurs dans les syncytiotrophoblastes situés à l'interface maternelle [236, 315]. De plus, Akerman *et coll.* [310] ont montré que OB-RS est également exprimé dans les membranes fœtales alors que OB-RL est présent dans le cordon ombilical humain.

Il est important de noter que, malgré l'absence de différence dans la production de leptine placentaire, il existe une régulation négative de l'expression de OB-RL dans le placenta issu de femmes obèses [298], entraînant une résistance à la leptine placentaire, en plus de la résistance à la leptine centrale qui se produit au cours de la grossesse normale, et pouvant ainsi moduler la croissance du fœtus [298, 316].

2. Rôle de la leptine pendant la grossesse

a. 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 [317].

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 [318]. De par ses propriétés lipolytiques, il semblerait que l'hyperleptinémie maternelle favorise la mobilisation des substrats maternels et placentaires, augmente leur biodisponibilité et favorise ainsi le transfert placentaire en réponse à la demande énergétique du fœtus [295].

b. Au niveau placentaire

L'expression placentaire de la leptine et de ses récepteurs sous-tend un mode d'action paracrine et/ou autocrine. Cependant, la localisation des récepteurs à l'interface maternelle les rendant accessibles à la leptine d'origine maternelle, il est impossible de distinguer une action

paracrine locale de la leptine placentaire d'une action endocrine de la leptine adipocytaire maternelle.

La leptine placentaire semble jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance et de la fonction placentaire, et par conséquent sur la croissance et le développement du fœtus [319]. En effet, la corrélation entre les concentrations ombilicales de leptine et la taille du placenta suggère que la leptine interviendrait dans la croissance placentaire [311]. Ceci est étayé par les résultats de l'étude de Magarinos *et coll.* mettant en évidence, *in vitro*, les capacités prolifératives et anti-apoptotiques de la leptine sur des lignées de cellules trophoblastiques humaines JEG-3 et BeWo [320]. Perez-Perez *et coll.* ont de plus démontré dans la lignée trophoblastique JEG-3, que la leptine est capable d'induire la synthèse protéique *via* l'activation de la voie des MAPK, aboutissant à l'activation et la phosphorylation de protéines jouant un rôle clé dans la traduction [321].

De plus, la leptine stimulerait l'angiogénèse placentaire, participant ainsi à la formation du placenta. Castellucci *et coll.* [322] 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 [322].

Enfin, la leptine joue également un rôle dans le transport des nutriments, en particulier le transport des acides aminés [321, 323]. Dans des explants placentaires issus de grossesses à terme, la leptine a ainsi été montrée pour améliorer l'activité de SNAT (System A sodium dependant neutral amino acids transport), suggérant un rôle de leptine en tant que médiateur pour le transfert des acides aminés au fœtus *via* le placenta [324]. Cependant, l'obésité chez la femme enceinte semble être associée à une dérégulation de la fonction de la leptine. Il a ainsi été mis en évidence, dans des tissus placentaires issus de femmes obèses, une diminution de l'activité de SNAT [298]. Ces résultats suggèrent que dans le cas d'une obésité maternelle, le développement de la résistance à la leptine placentaire peut potentiellement diminuer la disponibilité en acides aminés pour le fœtus, pouvant

expliquer le retard de croissance fœtale se manifestant dans certaines grossesses chez les femmes obèses.

c. 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 [295], il semblerait que la leptine soit le reflet de la croissance du fœtus. De plus, la présence des récepteurs à la leptine ayant été mise en évidence dans le fœtus en développement, en particulier au niveau des os et du cartilage, la leptine a été proposée pour être impliquée dans le contrôle de la croissance fœtale. Une corrélation positive a également 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) [325].

De plus, la mise en évidence des récepteurs à la leptine dans différents tissus fœtaux [310] souligne le potentiel rôle de la leptine pendant la vie fœtale. Cependant, les enfants nés avec un déficit congénital en leptine ou en ses récepteurs ont un poids de naissance normal [326-327]. Ces données suggèrent que la leptine fœtale n'est pas indispensable au développement et à la croissance fœtale. Il est donc difficile de déterminer si la leptinémie ombilicale est un important régulateur physiologique ou reflète simplement la croissance fœtale.

3. Effets de la leptine sur les différentes phases de l'accouchement

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 notamment dans la mise en route du travail.

a. Phase de prolifération

La leptine présente des effets prolifératifs et anti-apoptotiques, généralement mis en évidence simultanément dans de nombreux types cellulaires *via* l'activation d'une ou plusieurs voie(s) de signalisation couplées au récepteur à la leptine.

De nombreuses études ont rapporté une stimulation des phénomènes de prolifération et de synthèse protéique par la leptine, associée à une inhibition de l'apoptose des cellules trophoblastiques [320-321, 328-329]. Ainsi, Magariños *et coll.* [320] ont démontré les propriétés anti-apoptotiques et prolifératives de la leptine sur deux lignées de cellules de choriocarcinomes (JEG-3 et BeWo). Dans cette étude, l'apoptose des cellules trophoblastiques induite par l'inactivation du gène de la leptine dans les cellules, est inhibée par ajout de leptine dans le milieu de culture. Les auteurs ont également démontré qu'une concentration de leptine comprise entre 50 et 250 ng/ml augmente le nombre total de cellules en stimulant la progression du cycle cellulaire, notamment *via* la transition des cellules vers la phase G2/M ainsi que l'augmentation de l'expression de la cycline D1. De plus, 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 dont les taux sont restaurés par ajout de 100 ng/ml de leptine [320]. L'activation des trois principales voies de signalisation couplées au récepteur à la leptine a été mise en évidence dans les cellules de choriocarcinomes mais également dans les cellules trophoblastiques de placenta humain sain, à terme [328]. La leptine est ainsi capable de stimuler la voie JAK2/STAT3, l'activité de STAT3 étant positivement corrélée avec la prolifération trophoblastique [330] mais également la voie des MAPK, par phosphorylation de ERK1/2 [328]. La voie PI3K est aussi activée par une stimulation par la leptine [328]. Cette voie a été mise en évidence pour jouer un rôle dans la différenciation des trophoblastes humains, par activation de AKT puis de mTOR [331]. De plus, une étude récente de Toro *et coll.* [332] a mis en évidence un rôle anti-apoptotique de la leptine dans les cellules placentaires, *via* une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques (caspase-3 clivée,

BAX) et une augmentation de l'expression du médiateur anti-apoptotique BCL2. Enfin, une diminution de la production de p53, protéine clé dans l'induction des phénomènes d'apoptose, a également été mise en évidence [332].

Les effets de la leptine dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose ont également été démontrés dans d'autres types cellulaires, tels que des lignées cellulaires issues de cancers de la prostate [333], du colon [334] et du sein [335]. Ptak *et coll.* [336] ont de plus mis en évidence un effet prolifératif et anti-apoptotique de la leptine (40 ng/ml) dans une lignée cancéreuse ovarienne. Cet effet prolifératif se traduit par une stimulation de la progression du cycle cellulaire, *via* l'augmentation de l'expression de la cycline D1 et de la cycline A, et l'inhibition de l'expression de p21WAF1/CIP1, un inhibiteur des CDK stoppant la progression du cycle cellulaire aux points de restriction G1/S et G2/M [337]. Les résultats de cette étude confirment ceux obtenus par Catalano *et coll.* rapportant un effet prolifératif de la leptine (100 et 1000 ng/ml) sur des lignées cancéreuses endométriales humaines *via* l'augmentation de l'expression de la cycline D1, elle-même régulée par les protéines STAT3 et CREB (cyclic AMP-reponse element) et la diminution de l'expression de p21WAF1/CIP1 [258].

Enfin, notre équipe a démontré que la leptine est capable d'inhiber, de façon concentration-dépendante, l'apoptose induite par le LPS dans des explants de myomètre, en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques (caspase-3 clivée, BAX) et en augmentant celle de la protéine anti-apoptotique BCL2. Cet effet anti-apoptotique de la leptine dans le myomètre gestant est associé à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 [252].

b. Phase d'hypertrophie

La phase de prolifération est suivie par une phase d'hypertrophie, durant laquelle les cellules vont commencer la synthèse du matériel contractile. Parallèlement, un remodelage de la matrice extracellulaire s'effectue.

L'effet de la leptine sur le remodelage et donc sur l'expression des MMPs varie selon les tissus. Dans des cultures primaires de cellules endométriales, Quinton *et coll.* [338] 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 [339]. 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 [322, 340]. Dans des cellules hépatiques humaines, Cao *et coll.* [341] ont montré que la leptine diminue l'expression génique et protéique de MMP1 en réprimant le gène codant pour MMP1 *via* l'activation de ERK1/2.

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 [342], ainsi qu'au niveau de la matrice extracellulaire cardiaque [343]. Ainsi, ces données suggèrent un rôle profibrosant 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.* [340] 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.

Notre équipe a mis en évidence la capacité de la leptine à s'opposer au remodelage myométrial, en inhibant 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 [344]. Ces résultats confirment 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 [157].

c. Phase de contractions utérines

Deux études *in vitro*, réalisées sur des biopsies de myomètre prélevées chez des femmes accouchant par césarienne à terme, ont permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de la leptine sur 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 [345-346], pour une concentration de leptine égale à 1 μM ($16 \cdot 10^3$ ng/ml). Les récepteurs à la leptine ont été identifiés dans les cellules myométriales humaines [347], mais le mécanisme d'action par lequel la leptine exerce cet effet utero-relaxant reste indéterminé. Cependant, il a rapporté un effet stimulant de la leptine sur les canaux potassiques responsables de l'hyperpolarisation et donc de la relaxation musculaire [348]. Ceci suggère que les concentrations plasmatiques élevées de leptine associées à l'obésité maternelle, peuvent perturber la fonction du myomètre lors du travail. En effet, la leptine semble être responsable de divers troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses, notamment une contractilité utérine altérée [171, 205], amenant Wuntakal et Hollingworth à proposer la leptine comme agent tocolytique, dans une hypothèse médicale parue en 2010 [349].

OBJECTIFS

Il a été mis en évidence une association entre obésité maternelle et troubles de l'accouchement, notamment des accouchements prématurés mais également des dépassements de terme. Aux vues des connaissances existantes sur les effets prolifératifs et anti-apoptotiques de la leptine d'une part, et l'augmentation de son taux plasmatique chez les personnes obèses d'autre part, les objectifs de ce travail ont été d'évaluer le potentiel intérêt de la leptine dans la prévention de la menace d'accouchement prématuré, en maintenant les cellules dans un état prolifératif, puis d'apporter de nouveaux arguments quant à la possible implication de la leptine dans les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses.

Dans un premier temps, nous avons donc étudié les effets de la leptine sur la prolifération des cellules myométriales humaines, dans un modèle *in vitro* de lignées primaires, puis caractérisé les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la transition des cellules myométriales, de la phase de prolifération à la phase d'hypertrophie. Nous avons ainsi évalués les effets de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales, grâce à un modèle *in vitro* de co-culture entre des cellules myométriales et des macrophages, en présence ou non d'un signal inflammatoire, reproduit par le LPS.

MATERIEL ET METHODES

I. Drogues utilisées

La leptine humaine recombinante (L4146) a été achetée chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) et dissoute selon les instructions du fournisseur. L'IL-6 humaine recombinante (E. Coli, n°130-095-365) provient de chez Miltenyi biotechnology. L'antagoniste du récepteur à la leptine (Human super-active leptin antagonist SHLA) provient de chez PLR (Protein Laboratories Rehovot, Israël) et l'anticorps monoclonal neutralisant du récepteur à l'IL-6 Roactemra® 20mg/ml (Tocilizumab) a été acheté chez Roche (France). Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 (U0126, IC50=72nM et 58nM pour MEK1 et MEK2 respectivement), STAT3 (S3I-201, IC50=86µM) et NFκB (Curcumine, IC50=17µM), ainsi que le LPS (E. coli 055:B5, L2880) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Le récepteur à la leptine humain recombinant OB-R (rhleptinR/Fc Chimera ObR, n°389-LR/LF) et le récepteur à l'IL-6 humain recombinant IL-6Rα (rhIL-6-Rα, n°227-SR/LF) ont été achetés chez R&D Systems.

II. Recueil des prélèvements

L'ensemble de notre étude a été réalisé sur des lignées primaires de cellules myométriales établies à partir de biopsies de myomètres d'origine humaine. Le recueil des prélèvements a été effectué au bloc chirurgical de la maternité du CHU de Dijon (Centre Hospitalier et Universitaire de Dijon, service de Gynécologie et d'Obstétrique, Pr. Paul Sagot et collaborateurs) et de la clinique Sainte-Marthe (Service de Gynécologie et d'Obstétrique, Pr. Delignette et collaborateurs). Les échantillons myométriaux proviennent de femmes enceintes, dont le terme se situe majoritairement entre 38 et 40 semaines d'aménorrhée, présentant une grossesse non compliquée mais nécessitant un accouchement par césarienne pour des raisons obstétricales. Les prélèvements sanguins ont été

réalisés lors de l'examen médical précédant la césarienne (tubes héparinés). 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 (AFSSAPS) (NCT01762683) et toutes les patientes ont signé une feuille de consentement éclairé. 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. De plus, pour l'étude ObéDi, portant sur la différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie, les patientes ont été réparties en deux groupes ; un premier groupe réunissant les femmes présentant un IMC pré-conceptionnel inférieur à 25kg/m² (groupe contrôle) et un second groupe rassemblant les femmes présentant un IMC pré-conceptionnel supérieur à 30kg/m² (groupe obésité pré-conceptionnelle).

III. Culture cellulaire

1. Culture primaire de cellules myométriales humaines

Les prélèvements de myomètres ont immédiatement été placés dans du milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Invitrogen Gibco) stérile en présence d'antibiotiques et d'antifongique (PSA : 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 250 ng/ml d'amphotéricine B, Lonza), à 4°C et transportés au laboratoire. Les biopsies ont ensuite été disséquées stérilement, sous un poste de sécurité microbiologique de type II, en lambeaux de 1 mm³ environ. Brièvement, les biopsies sont lavées deux fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) stérile puis nettoyées du sang et des parties œdématisées. Les explants obtenus sont ensuite incubés dans un milieu de culture DMEM enrichi en sérum de veau fœtal (SVF) 20% et en PSA 1%, dans une boîte de culture de diamètre 100 mm, à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu de culture a été renouvelé après 10 à 15 jours, après un lavage préalable au PBS. La croissance cellulaire a été

observée régulièrement au microscope puis, lorsque les cellules arrivent à confluence et après un rinçage au PBS, les explants sont retirés des boîtes de culture et les cellules adhérentes sont décollées par ajout de trypsine (Lonza). Après une incubation de 12 minutes à 37°C sous 5% de CO₂, la trypsine est inactivée par ajout d'un volume identique de milieu de culture (DMEM + SVF 10% + PSA 1%). Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez puis centrifugées 10 minutes à 1500 rpm, à température ambiante (TA). Un repiquage à plus faible densité est alors réalisé (1.10⁶ cellules par boîte de diamètre 100 mm) dans 10 ml total de milieu de culture et les boîtes sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ (passage 0, P0). Après une semaine environ, les cellules ont adhéré et sont à confluence. Elles sont alors décollées comme décrit précédemment, comptées et réensemencées à plus faible densité dans de nouvelles boîtes de culture (passage 1, P1). Les cellules myométriales ont été utilisées pour les différentes expérimentations entre le 3^{ème} et le 7^{ème} passage, passages pour lesquels les cellules présentent le phénotype caractéristique des cellules musculaires lisses dit en « hills & valleys ».

2. Culture primaire et différenciation de monocytes humains

a. Purification des PBMC sur Ficoll

Les PBMC ont été purifiés sur un gradient de Ficoll. Pour cela, le sang est déposé très délicatement sur du Ficoll préalablement déposé au fond d'un tube 15 ou 50 ml, à l'abri de la lumière. Une centrifugation de 20 minutes est alors réalisée à 400 g, à TA, avec une accélération moyenne de 5 et une décélération sans frein. Après centrifugation, trois phases distinctes sont visibles dans le tube : une phase supérieure contenant le plasma, un anneau intermédiaire contenant les PBMC, et une phase inférieure contenant le Ficoll et les hématies. Le plasma est récupéré délicatement dans des tubes Eppendorf 1.5 ml, congelé et conservé à -80°C. L'anneau intermédiaire est alors prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml et déposé dans un tube 50 ml. Un lavage des

PBMC est alors effectué. Pour cela, le tube est complété à 50 ml avec du PBS et une centrifugation de 10 minutes à 1800 rpm est réalisée.

b. Sélection des monocytes par adhésion différentielle

Après la centrifugation, le culot est repris dans le volume nécessaire de milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté en PSA 1%, mais sans SVF, pour obtenir 1.10^6 cellules/ml, après comptage sur cellule de Malassez. Il est important de noter qu'à partir d'1 ml de sang, on obtient environ 1.10^6 PBMC. Les cellules sont alorsensemencées dans des flasques et incubées toute la nuit à 37°C sous 5% de CO₂. Après incubation les monocytes sont adhérents. Trois lavages sont alors réalisés avec du PBS afin d'éliminer les lymphocytes non adhérents. 5 ml de milieu RPMI 1640 supplémenté en SVF 10% et PSA 1% sont alors ajoutés. Les monocytes sont prêts pour le protocole de différenciation.

c. Mise en culture et différenciation des monocytes en macrophages

La différenciation est induite en incubant les monocytes avec du M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) à une concentration de 100 ng/ml dans des boîtes de culture de diamètre 100 mm, pendant 7 jours à 37°C sous 5% de CO₂. Après 4 jour, un "refeed" est réalisé. Pour cela, 5 ml de milieu supplémenté en M-CSF à 100 ng/ml sont ajoutés. Après 7 jours de différenciation, les monocytes différenciés en macrophages sont utilisés pour le protocole de co-culture.

3. Culture et différenciation des cellules immortalisées THP-1

Les lignées cellulaires monocytaires humaines THP-1 (ATCC, Rockville, MD) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 complété avec 10% de SVF et 1% de PSA, dans des flasques de 75 cm² de surface de culture, à 37°C sous 5% de CO₂. Un renouvellement du milieu est réalisé tous les deux ou trois jours. Pour cela, les THP-1 sont récupérés puis centrifugés pendant 10 minutes à 1500 rpm, à TA. Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez et le culot est repris dans du milieu frais. On obtient alors un passage. Les THP-1 sont ainsi maintenus à une densité cellulaire inférieure à 1.10⁶ cellules/ml. Pour la différenciation des monocytes en macrophages, les THP-1 sontensemencés à raison de 10.10⁶ cellules par boîte de culture de diamètre 100 mm. Leur différenciation est induite par 48 heures de traitement à la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 100 nM (Sigma Aldrich). La différenciation est contrôlée au microscope grâce à l'adhésion des cellules accompagnées d'un changement de morphologie. En effet, dans ces conditions, les cellules présentent les caractéristiques de différenciation macrophagique telles que l'adhésion au support, l'expression du marqueur de surface CD11b et l'acquisition d'une activité phagocytaire. Après différenciation, les macrophages sont prêts pour le protocole de co-culture.

4. Co-cultures cellules myométriales/macrophages

Dans un premier temps, les cellules myométriales à confluence sont trypsinées etensemencées à raison de 250 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits (Western blot), dans des boîtes de diamètre 35 mm (Imagerie calcique), ou dans des plaques 24 puits (Lucifer Yellow), à raison de 40 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits (Immunofluorescence), ou à raison de 100 000 cellules dans des diamètres 35 mm (Test au collagène), dans 2 ml de milieu de culture (DMEM + SVF 10% + PSA 1%). Après adhésion des cellules myométriales, ces dernières sont mises en quiescence

dans 2 ml de milieu de pauvre en glucose (1g/L), sans rouge phénol et sans L-glutamine (DMEM low glucose, Invitrogen Gibco) et supplémenté en antibiotiques et antifongique, pendant 72 heures, après deux lavages préalables au PBS.

Durant cette période, la différenciation des THP-1 est réalisée. Après différenciation des THP-1 en macrophages, et quiescence des cellules myométriales, les THP-1 différenciés sont récupérés par grattage, centrifugés 10 minutes à 1500 rpm, à TA, puis ensemencés en respectant un ratio ¼, soit 62 500 (analyse western blot, imagerie calcique et lucifer yellow), 10 000 (analyse d'immunofluorescence) ou 25 000 (test au collagène) THP-1 différenciés par puits, dans les boîtes contenant les cellules myométriales adhérentes, dans 2 ml de milieu de stimulation Opti-MEM, les cellules myométriales ayant préalablement été lavées avec du PBS. Après un jour de repos, les cellules en co-culture sont alors prêtes pour le protocole de stimulation (Figure 13).

Jour	Macrophages	Cellules myométriales	THP-1
J0	- Buffy coat - Ficoll - Adhésion différentielle		
J1	- Elimination des lymphocytes - Différenciation M-CSF		
J4		- Ensemencement	
J6	- Refeed M-CSF	- Mise en quiescence	
J7			- Ensemencement - Différenciation PMA
J9	Co-culture + Stimulation		

Figure 13 : Protocole de co-culture cellules myométriales/macrophages

Pour les expériences de co-culture cellules myométriales/monocytes différenciés, la différenciation s'effectue une semaine avant l'ensemencement des cellules myométriales, temps nécessaire pour que les monocytes extraits à partir de tubes ou de poches de sang se différencient

en macrophages. La suite du protocole est identique à celle du protocole de co-culture cellules myométriales/THP-1 différenciés.

IV. Protocoles de stimulation

1. Projet leptine et prolifération

Pour toutes les expérimentations réalisées dans le projet prolifération, les cellules myométriales ont étéensemencées dans du milieu de culture (DMEM + SVF 10% + PSA 1%) à 37°C sous 5% de CO₂. Après une adhésion de 24 heures, les cellules sont mises en quiescence pendant 72 heures dans du milieu de quiescence DMEM low glucose supplémenté en antibiotiques et antifongique, à 37°C sous 5% de CO₂, permettant ainsi leur synchronisation en phase G0 du cycle cellulaire. Les cellules sont ensuite utilisées pour les différents protocoles de stimulation.

a. Etude de la prolifération cellulaire et de la phase du cycle impliquée

Les cellules myométriales sontensemencées à raison de $2 \cdot 10^5$ et de $1 \cdot 10^6$ cellules par boîte de culture de diamètre 100 mm pour le protocole de cytométrie en flux et l'analyse Western blot portant sur les cyclines, respectivement. Dans cette étude, la cycline D, présente lors de la phase G1, et la cycline E, indispensable à la transition G1/S sont étudiées. Après les 72 heures de quiescence et un nouveau lavage au PBS, du milieu de stimulation DMEM high glucose (4.5 g/l), sans rouge phénol et supplémenté en SVF 1%, est ajouté dans les boîtes de diamètre 100 mm pour le protocole de cytométrie en flux. Pour l'analyse des cyclines par Western blot, les stimulations sont réalisées directement dans le milieu de quiescence. Les cellules sont alors stimulées par la leptine à différentes concentrations (6.25, 25 et 50 ng/ml) pendant 24 heures pour l'étude du nombre total de cellules, 12

heures pour l'étude du pourcentage de cellules en phase S, et 4 heures pour l'étude des cyclines. Pour chaque expérience, un contrôle négatif non stimulé et un contrôle positif réalisé en cultivant les cellules dans le milieu de culture sont réalisés. De plus, afin de vérifier la sélectivité de l'effet observé, l'antagoniste du récepteur à la leptine (SHLA, 100 ng/ml), ou l'anticorps monoclonal neutralisant du récepteur à l'IL-6 (Tocilizumab, 1 µg/ml), ont été ajoutés une heure avant la stimulation par la leptine pour les expériences de cytométrie en flux.

b. Etude des voies de signalisation

Pour l'étude des voies de signalisation impliquées dans la prolifération induite par la leptine, les cellules ont étéensemencées à raison de 1.10^6 cellules par puits dans des plaques 6 puits pour l'analyse Western blot et de 1.10^5 cellules par puits dans une plaque 24 puits pour le protocole d'immunofluorescence, chaque puits contenant une lamelle stérile de 13 mm de diamètre. Différentes cinétiques ont été réalisées, directement dans le milieu de quiescence DMEM low glucose afin d'éviter la phosphorylation des protéines induite par l'ajout de milieu frais. Des stimulations courtes (de 1 à 5 minutes), moyennes (de 10 à 60 minutes) et longues (de 1 à 8 heures) ont ainsi été réalisées par ajout de leptine aux concentrations finales de 6.25, 25 et 50 ng/ml pour les analyses Western blot.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules myométriales ont été stimulées par la leptine aux trois concentrations, aux temps d'activation observés par Western blot, afin d'observer la potentielle translocation nucléaire des protéines phosphorylées. L'antagoniste du récepteur à la leptine (SHLA, 100 ng/ml) ainsi que l'anticorps neutralisant du récepteur à l'IL-6 (Tocilizumab, 1 µg/ml) ont été utilisés pour les expériences d'immunofluorescence afin de confirmer que la translocation nucléaire des protéines phosphorylées et donc l'activation complète des voies de signalisation est bien spécifique du récepteur à la leptine. Ici encore, pour chaque expérience, un

contrôle négatif non stimulé et un contrôle positif effectué en incubant les cellules dans un milieu de culture ont été réalisés.

Enfin, une analyse de cytométrie en flux a été réalisée afin de confirmer l'implication des voies Erk1/2, Stat3 et NFκB dans l'effet prolifératif induit par la leptine. Le protocole est identique à celui décrit précédemment à l'exception des conditions de stimulation. En effet, les cellules ont été incubées une heure en présence de l'inhibiteur de Mek1/2 (U0126, 10 μM), Stat3 (S3I-201, 10 μM), ou NFκB (Curcumine, 1 μM), avant d'être stimulées par la leptine aux concentrations de 6.25 et 50 ng/ml.

2. Projet leptine et différenciation des cellules myométriales

Après une mise en quiescence des cellules myométriales pendant 72 heures (excepté pour les tests de contractilité où les cellules myométriales et les macrophages sont ensemencés directement dans le collagène) et une différenciation des monocytes en macrophages, les cellules sont prêtes pour le protocole de différenciation. Les cellules myométriales et les macrophages sont alors mis en co-culture dans du milieu OptiMEM et stimulés par la leptine seule (6.25, 25 et 50ng/ml), ou par la leptine (6.25, 25 et 50ng/ml) suivi d'une stimulation au LPS (100 ng/ml), pendant 72 heures. Afin de vérifier la sélectivité de l'effet observé, l'antagoniste du récepteur à la leptine (SHLA, 100 ng/ml), ou l'anticorps monoclonal neutralisant du récepteur à l'IL-6 (Tocilizumab, 1 μg/ml), ont été ajoutés une heure avant la stimulation par la leptine.

Les cellules myométriales sont ensemencées dans des plaques 6 puits pour l'analyse western blot, dans des boîtes de diamètre 35 mm pour l'imagerie calcique, ou dans des plaques 24 puits pour les expériences de synchronisation des cellules (Lucifer Yellow), à raison de 250 000 cellules, pour 62 500 macrophages. Pour les expériences d'immunofluorescence, 40 000 cellules myométriales sont ensemencées dans des plaques 24 puits, puis mis en co-culture avec 10 000 macrophages. Pour les expériences de lucifer yellow et d'immunofluorescence, une lamelle stérile de 13 mm de diamètre

est préalablement déposée au fond de chaque puits. Enfin, pour les tests de contractilité (matrice de collagène), 100 000 cellules myométriales sontensemencées avec 25 000 macrophages, dans des boites de culture de diamètre 35 mm.

V. Cytométrie en flux

Après stimulation, la prolifération cellulaire a été mise en évidence par cytométrie en flux, grâce à un marquage à l'iodure de propidium (Sigma Aldrich). Pour cela, les cellules sont trypsinées, puis centrifugées à 1500 rpm pendant 10 minutes à TA. Les culots sont alors re-suspendus dans 250 µl de tampon Trypsine (Spermine tétra hydrochloride, citrate, et trypsine) et incubées 13 minutes à l'abri de la lumière. 200 µl de tampon RNase sont alors ajoutés (Spermine tétra hydrochloride, citrate, inhibiteur de trypsine, et RNase issue du pancréas bovin). Après une incubation de 10 minutes à l'obscurité, 5 µl d'iodure de propidium sont ajoutés. La prolifération cellulaire est alors évaluée en déterminant le nombre total de cellules et le pourcentage de cellules en phase S, pour chaque échantillon, grâce au cytomètre de flux LSRII (Becton Dickinson). Pour cela, un premier « gating » est réalisé sur le « dotplot » taille/structure (SSC-A / FSC-A) afin de discriminer les cellules des débris, puis un second « gating » est effectué sur un « dotplot » B575/26-W / B575/26-A afin de discriminer les doublets cellulaires. La prolifération cellulaire est alors mesurée en quantifiant le nombre total d'évènements dans la fenêtre secondaire, après deux minutes d'analyse. La proportion de cellules en phase S a été évaluée en mesurant l'intensité du marquage à l'iodure de propidium, qui est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans chaque cellule, à l'aide du logiciel FlowJo_V10.

VI. Western blot

1. Extraction et dosage protéiques

Après stimulation, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est décollé dans 100 μ l de tampon de lyse RIPA (radio-immunoprecipitation lysis buffer) (40 mM Tris-HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X100) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich P8340) et de phosphatases (Sigma-Aldrich P2850) (1%). Les lysats cellulaires sont ensuite soumis à des ultrasons pendant 10 secondes puis centrifugés 15 minutes à 14000 rpm, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré dans de nouveaux tubes et la concentration protéique totale de chaque échantillon est évaluée grâce à dosage spectrophotométrique en utilisant le spectromètre Nanodrop. Après dosage, les échantillons sont dilués dans le tampon de charge Laemmli 5X (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% glycérol, 0.5% (w/v) bleu de bromophénol) puis portés à ébullition pendant 3 minutes à 95°C.

2. Western blot

Les protéines sont déposées (30 μ g par puits) et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% ou 12% selon la protéine étudiée 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 grâce à une solution de blocage (5% régilait, 0,1% BSA, TBS-T (Tris-buffered Saline, 0,1% Tween-20)) pendant une heure sous agitation et à TA. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit, à 4°C et sous agitation, avec l'anticorps primaire approprié dilué dans une solution de TBS-T avec 1% de régilait et 0,02% de SAB

(Sérum Albumine Bovine) (Tableau 3). Après trois lavages au TBS-T, les membranes sont incubées une heure avec un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase et dilué dans une solution de TBS-T avec 1% de régilait et 0,02% de SAB (Tableau 3). Après trois nouveaux lavages au TBS-T, 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). Après révélation et fixation, les films ont été scannés à l'aide d'un scanner GS-800 (BioRad). Les bandes obtenues ont été analysées et quantifiées grâce au logiciel Quantity One (BioRad), et normalisées par comparaison avec l'intensité des bandes obtenues avec l'anticorps anti-GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) utilisé comme contrôle de la charge en protéines ou avec les anticorps dirigés contre les formes totales des différentes protéines phosphorylées étudiées

	Cible	Fournisseur	Ref	Type	Source	Dilution WB	Dilution IF
PROJET PROLIFERATION	Cycline D1 (92 G2)	Cell Signaling	#2978	Monoclonal	Rabbit	1/500	-
	Cycline E (HE12)	Cell Signaling	#4129	Monoclonal	Mouse	1/500	-
	Erk1/2 (p44/p42)	Cell Signaling	#9102	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
	p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	#9101	Polyclonal	Rabbit	1/500	1/200
	Akt	Cell Signaling	#9272	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
	p-Akt (Ser473)	Cell Signaling	#9271	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
	STAT3 (79D7)	Cell Signaling	#9134	Monoclonal	Rabbit	1/500	-
	p-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling	#9131	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
	NFkB p65 (C-20)	Santacruz Biotechnologies	sc-372	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
p-NFkB p65 (Ser 536)	Santacruz Biotechnologies	sc-33020	Polyclonal	Rabbit	1/500	1/200	
COMMUN	GAPDH (FL-335)	Santacruz Biotechnologies	sc-25778	Polyclonal	Rabbit	1/1000	-
PROJET DIFFERENCIATION	p-Hsp27 (Ser15)	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-525-F	Polyclonal	Rabbit	1/1000	-
	Hsp27	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-803-F	Polyclonal	Rabbit	1/1000	-
	p-H-Caldesmon	Santacruz Biotechnologies	sc-12931-R	Polyclonal	Rabbit	1/200	-
	H-Caldesmon	Santacruz Biotechnologies	sc-58703	Monoclonal	Rabbit	1/1000	-
	COX2	Santacruz Biotechnologies	sc-376861	Monoclonal	Mouse	1/200	-
	Cx43	Abcam	Ab63851	Polyclonal	Rabbit	1/500	-
ANTICORPS SECONDAIRES	Rabbit	Santacruz Biotechnologies	sc-2357	IgG HRP	Mouse	1/5000	-
	Mouse	Santacruz Biotechnologies	sc-2314	IgG HRP	Donkey	1/5000	-

Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette étude

VII. Immunofluorescence

1. Immunomarquages

Après stimulation, le milieu de culture est retiré, et un lavage au PBS est réalisé. Les cellules sont alors fixées par ajout d'un ml de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA), et incubées 5 minutes à 4°C. Après la fixation et un lavage au TBS-T 0.1%, une saturation des sites non spécifiques ainsi qu'une perméabilisation cellulaire sont effectuées par ajout d'un ml de TBS-T 0.1% contenant 1% de SAB et 0.1% de saponine. Afin d'observer la translocation nucléaire des protéines activées par la leptine, les cellules sont alors incubées 10 minutes à TA. Après deux nouveaux lavages au TBS-T 0.1%, les cellules sont incubées une heure à TA avec l'anticorps polyclonal anti-P-ERK1/2 ou anti-P-NFKB, dilué au 1/200^{ème} dans la solution de saturation/perméabilisation. Les anticorps primaires ont ensuite été détectés en incubant les cellules avec l'anticorps secondaires Alexasfluor 488 (vert) (A-21206, Invitrogen) dilué au 1/500^{ème} dans la solution de saturation/perméabilisation elle-même diluée au 1/10^{ème} dans du TBS-T 0.1%, pendant 30 minutes à TA, à l'abri de la lumière.

Pour le marquage de l'actine à la phalloïdine 555 (rouge), après les étapes de saturation/perméabilisation et lavages au TBS-T 0.1%, les cellules sont incubées 30 minutes, à TA et à l'abri de la lumière dans 250 µl de phalloïdine 555, diluée au 1/40^{ème} dans la solution de saturation/perméabilisation. Enfin, deux nouveaux lavages sont réalisés au TBS-T 0.1% avant le marquage nucléaire au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole).

2. Marquage DAPI

Un marquage nucléaire est alors effectué par incubation des cellules 3 minutes dans une solution de DAPI (100 ng/ml dans du TBS-T 0.1%), à TA et à l'obscurité. Les lamelles sont enfin récupérées, et

montées sur des lames « superfrost », dans du milieu de montage Dako Fluorescent Mounting Medium après deux lavages au TBS-T 0.1%. 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.

VIII. Tests fonctionnels

1. Test de communication intercellulaire: Lucifer yellow

Après stimulation, le milieu de culture est retiré et un lavage au PBS est réalisé. 250 µl de solution de Lucifer Yellow (Sigma, L0259), diluée au 1/20^{ème} dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits. Après avoir réalisé une incision sur les cellules avec un scalpel, les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, en présence d'un agent contractant, l'ocytocine (Syntocinon®), à une concentration de 100nM. Après deux nouveaux lavages au PBS, les cellules sont fixées par ajout d'un ml de PBS contenant 4% de PFA, et incubées 5 minutes à 4°C. Deux lavages au TBS-T 0.1% sont réalisés puis un marquage nucléaire au DAPI est réalisé, suivant le protocole défini précédemment. Les lamelles sont ensuite récupérées et montées sur des lames « superfrost », dans du milieu de montage Dako Fluorescent Mounting Medium après deux lavages au TBS-T 0.1%. L'excitation se fait à 425-430 nm alors que la fluorescence est émise à 515-520 nm. Il est alors possible de visualiser la diffusion de la lucifer yellow si les jonctions gap sont ouvertes.

2. Test de signalisation calcique : Imagerie calcique

A la fin de la stimulation, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS, puis 1ml de Fura-2 (11524766, Fisher) est ajouté dans chacune des boîtes, à une concentration finale de 1µM. Après une

incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière, à TA, les cellules myométriales sont lavées une fois dans du PBS puis mises à incuber 30 minutes, à l'obscurité, à TA, dans 1ml de PBS. La contractilité des cellules est alors analysée au microscope, grâce au logiciel AxioVision Réel.4.8. Lors de l'acquisition des données, les cellules sont alors stimulées par l'ocytocine, à une concentration finale de 100nM. La contraction des cellules myométriales est alors visible en temps réel. L'acquisition est réalisée sur un temps donné.

3. Test de contractilité : Matrices de collagène

Pour le test de contractilité, les cellules myométriales (100 000) et les macrophages (25 000) sontensemencés simultanément, directement dans le collagène. Afin de couler les gels, 1ml de solution de collagène I (#A10483-01, Gibco) est mélangé avec 1 ml de milieu de culture DMEM + Atb + FBS10%. Le mélange devient jaune, quelques gouttes de NaOH sont alors ajoutées afin de remonter le pH, jusqu'à ce que le mélange retrouve une couleur rosée. Les cellules sont alors ajoutées dans le mélange, puis ce dernier est coulé dans des boites de culture de diamètre 35 mm, stérile et non traitée. Le gel est alors incubé à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 45 minutes. Après avoir vérifié la polymérisation du gel, ce dernier est décollé de la boite, puis 1ml de milieu de culture est ajouté. Après une incubation de deux jours, les cellules myométriales ont retrouvé leur morphologie fusiforme. Les cellules sont alors stimulées comme mentionnée précédemment, par la leptine et/ou le LPS, en présence d'ocytocine à une concentration de 100nM. La rétraction du gel est suivie sur 48 heures.

IX. Interaction protéine/protéine (Octet)

La leptine et son récepteur SHLA ont été biotinylés (rapport molaire 3:1 (biotine:protéine)) en utilisant le kit EZ-Link[®] NHS-biotine-PEG4 (# 21330, Thermo Scientific), dans un volume final de

200 µl, dans du PBS. Après une incubation de 30 minutes à TA, l'excès de biotine a été éliminé en utilisant des colonnes de dessalage Zeba™ 7K MW CO, 2 ml (#89890, Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant. Les concentrations de leptine et de SHLA biotinylés ont ensuite été ajustées à 2 µg/ml dans du PBS. Pour la détermination des paramètres cinétiques d'interaction protéine/protéine, un Octet RED (RapidSystem-Extended-Detection) équipé de biocapteurs préchargés avec de la Streptavidine SBC (ForteBio) a été utilisé. Toutes les expériences ont été réalisées dans une solution de PBS, à 25°C, sous agitation (1000 rpm). Les canaux ont été saturés avec le ligand biotinylé (leptine ou SHLA) à une concentration de 2 µg/ml, pendant 10 minutes. Pour les expériences de cinétique et de détermination du KD, les récepteurs OB-R et IL-6Rα ont été préparés dans une solution tampon en pratiquant une dilution en série (3.5, 5.6, 9.8, 17.14 et 30 nM). L'association a été contrôlée pendant 10 minutes et la dissociation suivie pendant une heure.

X. Dosages ELISA

A la fin de chaque stimulation, le surnageant est récupéré, centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes à TA, afin d'éliminer les débris, puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

1. Dosage OB-Rsol

La quantité de récepteur soluble à la leptine OB-Rsol présente dans les surnageants de cultures de cellules myométriales stimulées ou non par la leptine est mesurée par la technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) avec un kit « Quantikine Human Leptin sR Immunoassay » (réf). Le test ELISA est réalisé en suivant le protocole du fournisseur. Dans un premier temps, les standards sont préparés à partir d'une solution mère fournie dans le kit à 200 ng/ml. Afin de réaliser une gamme étalon, des dilutions en série de ½ sont réalisées dans le tampon de dilution « Standard

diluent ». 100 µl de solution « Calibrator diluent RD5P » sont alors déposés dans les puits d'une plaque 96 puits préalablement recouverts avec un anticorps monoclonal spécifique de OB-Rsol, puis 50 µl de standards de 0.312 à 20 ng/ml, 50 µl de tampon pur « Calibrator diluent RD5P » pour le « blanc » et le point 0 pg/ml sont ajoutés. Une incubation de deux heures à TA et sous agitation légère est réalisée. La plaque est alors lavée 4 fois avec une solution « Wash buffer ». Pour cela, la plaque est vidée, 300 µl de tampon « Wash buffer » sont ajoutés dans chaque puits, et la plaque est alors vidée par retournement. Après le dernier lavage, 200 µl d'anticorps de détection « leptin sR Conjugate » sont alors déposés dans chaque puits. La plaque est incubée deux heures à température ambiante, sous agitation légère. Après 4 nouveaux lavages, 200 µl de solution substrat sont ajoutés. Une incubation de 20 minutes à l'obscurité est réalisée. 50 µl de solution Stop sont alors ajoutés et l'absorbance est lue à 450 nm grâce à un lecteur de plaques (Infinite® M200 PRO, Tecan, Lyon, France). La moyenne des absorbances des répliques est calculée, à laquelle celle du blanc est soustraite. La courbe étalon est réalisée grâce à la régression linéaire du logarithme de la moyenne de l'absorbance des standards en fonction du logarithme de la concentration en pg/ml. La concentration des échantillons est alors déterminée grâce à l'équation générée et la quantité d'OB-Rsol présente dans les échantillons est calculée.

2. Dosage IL-6

La quantité d'IL-6 présente dans les surnageants de cultures de cellules myométriales stimulées ou non par la leptine est mesurée par la technique ELISA avec un kit « BD OptiEIA™ human IL-6 ELISA kit II ». Le test ELISA est réalisé en suivant le protocole du fournisseur. Dans un premier temps, les standards sont préparés à partir d'une solution mère fournie dans le kit à 300 pg/ml. Afin de réaliser une gamme étalon, des dilutions en série de ½ sont réalisées dans le tampon de dilution « Standard diluent » (300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7 pg/ml). 50 µl de solution « ELISA diluent » sont

déposés dans les puits d'une plaque 96 puits préalablement recouverts avec un anticorps monoclonal spécifique de l'IL-6, puis 100 µl de standards de 4.7 à 3 pg/ml, 100 µl de tampon pur « Standard diluent » pour le « blanc » et le point 0 pg/ml sont ajoutés. Une incubation de deux heures à TA et sous agitation légère est réalisée. L'IL-6 présente dans les surnageants de culture va ainsi se fixer à l'anticorps immobilisé au fond du puits. La plaque est alors lavée 5 fois comme précédemment décrit pour le protocole ELISA OB-Rsol. 100 µl d'anticorps de détection (anticorps biotinylé dirigé contre l'IL-6 et couplé à la "streptavidine-horseradish peroxydase") sont alors déposés dans chaque puits. La plaque est incubée une heure à TA, sous agitation légère. Après 7 nouveaux lavages, 100 µl de solution substrat « TMB One-Step » sont ajoutés pour 30 minutes à l'obscurité. Cette solution produit une couleur bleue dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'IL-6 présente initialement dans l'échantillon. 50 µl de solution Stop sont alors ajoutés, changeant ainsi la couleur bleue en couleur jaune. L'absorbance est alors lue à 450nm grâce à un lecteur de plaques (Infinite® M200 PRO, Tecan, Lyon, France). La moyenne des absorbances des répliques est calculée, à laquelle celle du blanc est soustraite. La courbe étalon est réalisée grâce à la régression linéaire du logarithme de la moyenne de l'absorbance des standards en fonction du logarithme de la concentration en pg/ml. La concentration des échantillons est alors déterminée grâce à l'équation générée et la quantité d'IL-6 présente dans les échantillons est calculée.

XI. 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 $p < 0,05$.

RESULTATS

PARTIE I : PROJET LEPTINE ET PROLIFERATION DES CELLULES MYOMETRIALES HUMAINES

I. Introduction article I

La prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter, notamment chez les femmes en âge de procréer. En effet, on observe une augmentation de l'obésité pré-conceptionnelle, pouvant entraîner des complications pour la mère et le fœtus. L'obésité maternelle est plus particulièrement associée à des troubles des mécanismes menant à l'accouchement, telle qu'une mise en travail spontanée moins fréquente pouvant aboutir à des dépassements de terme [171]. Étonnamment, l'obésité maternelle semble également associée à des accouchements prématurés. Bien que la plupart d'entre eux soit indiquée pour raisons médicales, en raison de troubles liés à l'obésité telle que la pré-éclampsie, certains auteurs ont rapporté une association entre l'obésité et les accouchements prématurés spontanés.

L'obésité est caractérisé par une hypertrophie du tissu adipeux associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'adipokines, dont la leptine [275]. Cette hormone agit en se fixant à ses récepteurs transmembranaires OB-R, connus pour activer trois principales voies de signalisation ; JAK/STAT, PI3K/AKT, ERK1/2 [245]. Des travaux au sein de notre équipe ont permis de mettre en évidence que la leptine est capable de s'opposer, *in vitro*, à l'apoptose myométriale et au remodelage de la sphère utéroplacentaire [252, 344], deux étapes nécessaires à la préparation de l'utérus pour la mise en route du travail. De plus, une étude a montré que la leptine est également capable de s'opposer, *in vitro*, aux contractions spontanées ou induites par l'ocytocine, suggérant un

intérêt potentiel de cette adipokine dans la prise en charge pharmacologique de la menace d'accouchement prématuré[345]. Parallèlement, aux phénomènes impliqués dans la réorganisation de la sphère utéro-placentaire, l'induction du travail est également associée à un changement de statut phénotypique des cellules myométriales passant d'un statut prolifératif (associé à un état de quiescence contractile) à un statut hypertrophique (associé à la synthèse du matériel contractile). De nombreuses études ont démontré un effet prolifératif de la leptine dans de nombreux types cellulaires, notamment au niveau de la sphère utéroplacentaire [320, 350] *via* l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation (ERK1/2, AKT, STAT3), mais pas dans le myomètre.

L'objectif de ce travail était donc de voir si la leptine pouvait interférer avec les mécanismes de l'accouchement en agissant également sur le processus de prolifération cellulaire. Si cet effet était confirmé, cela apporterait un argument supplémentaire en faveur d'un potentiel rôle de la leptine en tant qu'agent tocolytique, et pourrait également contribuer à expliquer les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses.

Pour répondre aux objectifs, nous avons choisi un modèle de culture cellulaire humain utilisant des lignées primaires de cellules myométriales. Dans ce modèle, nous avons utilisé trois doses de leptine ; 6.25, 25 et 50 ng/ml, correspondant aux concentrations plasmatiques observées chez les femmes de poids normal, présentant une obésité modérée et présentant une obésité morbide respectivement.

II. Article I

RESEARCH PAPER

Dose-dependent biphasic leptin-induced proliferation is caused by non-specific IL-6/NF- κ B pathway activation in human myometrial cells

Marina Barrichon^{1,2}, Tarik Hadi^{1,2}, Maeva Wendremaire^{1,2,3}, Clémentine Ptasinski^{1,2}, Renaud Seigneuric^{1,2}, Guillaume Marcion^{1,2}, Marc Delignette⁴, Jacques Marchet⁴, Monique Dumas^{1,2,3}, Paul Sagot^{3,5}, Marc Bardou^{1,2,3,6}, Carmen Garrido^{1,2,7} and Frédéric Lirussi^{1,2,3}

¹INSERM, U866, Equipe labellisée ligue contre le Cancer and Association pour la Recherche contre le Cancer, and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon, France, ²Université de Bourgogne, Dijon, France, ³Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France, ⁴Clinique Sainte-Marthe, Dijon, France, ⁵Service de Gynécologie & Obstétrique, Dijon, France, ⁶INSERM CIC-P 803, Dijon, France, and ⁷Anti-cancer Center George-François Leclerc, Dijon, France

Correspondence

Frédéric Lirussi, CRI U866 & INSERM CIC-P 803, CHU de Dijon, Faculté de Médecine, 7, Bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France. E-mail: frederic.lirussi@u-bourgogne.fr

Received

6 August 2014

Revised

15 December 2014

Accepted

25 January 2015

BACKGROUND AND PURPOSE

Leptin, an adipokine synthesized by the placenta during pregnancy, has been proposed for the management of preterm labour (PTL), as it is able to prevent *in vitro* uterine contractility and remodelling associated with labour onset. Another common feature of labour onset is the phenotypic switch of myometrial smooth muscle cells from a proliferative to a hypertrophic state. As proliferative effects have been demonstrated for leptin in other tissues, we aimed to investigate its ability to induce myometrial proliferation and thus to maintain uterine quiescence.

EXPERIMENTAL APPROACH

We stimulated human primary myometrial smooth muscle cells with leptin in the presence or absence of receptor antagonists or signalling pathway inhibitors.

KEY RESULTS

Leptin induced myometrial cell proliferation in a biphasic manner. At 6.25 ng·mL⁻¹, leptin-induced proliferation was mediated by the leptin receptor and required the early activation of ERK1/2. At a concentration above 25 ng·mL⁻¹, leptin induced direct non-specific stimulation of the IL-6 receptor, leading to NF- κ B activation, and exerted anti-proliferative effects. However, at 50 ng·mL⁻¹, leptin re-induces proliferation via IL-6 receptor stimulation that requires STAT3 and delayed ERK1/2 activation.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

These data bring new insights into leptin signalling-induced myometrial proliferation and its interrelationship with the IL-6/IL-6 receptor axis. In the light of our previous work, the present study emphasizes the potential value of leptin in the pharmacological management of PTL and it also strengthens the hypothesis that leptin might be a contributory factor in the parturition-related disorders observed in obese women.

Abbreviations

ECL, enhanced chemiluminescence; PTL, preterm labour; RT, room temperature; SHLA, human super-active leptin antagonist; SOCS-3, Suppressor of cytokine signalling 3; TBST, Tris-buffered saline/Tween 20

Tables of Links

TARGETS	
Catalytic receptors^a	Enzymes^b
IL-6 receptor	Akt (PKB)
Leptin receptor	ERK1
	ERK2
	MEK1
	MEK2

LIGANDS	
Curcumin	Tocilizumab
IL-6	Triciribine
Leptin	U0126

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (^{a,b}Alexander *et al.*, 2013a,b).

Introduction

The prevalence of obesity is increasing worldwide, including in women of reproductive age, which is a major concern because maternal obesity increases the risk of complications for both mother and foetus (Yu *et al.*, 2006). Indeed, maternal obesity is associated with a wide spectrum of adverse pregnancy outcomes linked to a disruption in the parturition mechanisms resulting, particularly, in a delayed or difficult spontaneous labour onset, which can lead to higher rates of postdate pregnancies, and contribute to a greater need to induce labour (Arrowsmith *et al.*, 2011). Induction failures, Caesarean section deliveries and post-partum haemorrhage have also been reported (Chu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). In obese subjects, an increase in adipose tissue is associated with a low-grade inflammatory state characterized by a moderate but chronic systemic rise in a number of adipokines, including leptin.

Leptin, a 16 kD protein, is the most studied adipokine and is produced and secreted by adipose tissue (Harris, 2014) as well as reproductive tissue such as placenta (Henson *et al.*, 1998). Its main endocrine function is to maintain whole body energy homeostasis. Plasma leptin levels have been reported to be strongly correlated with both body mass index and total amount of fat mass and are elevated in obese subjects leading to a state of leptin resistance (Considine *et al.*, 1996; Zhang and Scarpace, 2006). Circulating levels of leptin are between 5 to 15 ng·mL⁻¹ in lean subjects, whereas the levels reach 40 to 60 ng·mL⁻¹ in obese people (Sinha *et al.*, 1996). Leptin acts by binding to its specific transmembrane receptor, the leptin receptor (also known as OB-R). Although leptin is not secreted by the myometrium, its receptors have been identified in this tissue (Wendremaire *et al.*, 2011), as well as in the placenta (Henson *et al.*, 1998) and endometrium (Kitawaki *et al.*, 2000). Leptin receptors belong to the class I cytokine receptor family, sharing structural and functional similarities with IL-6 receptor. The extracellular leptin-binding domain of the leptin receptor possesses strong homology with the gp130 signal-transducing subunits of receptors for IL-6. Both leptin

and its receptors share structural and functional similarities with the IL-6 receptor family; leptin stimulated leptin receptors are known to activate the three main signalling pathways that are activated by the IL-6 receptor: the JAK/STAT (not activated by short isoforms), PI3K/Akt and ERK1/2 pathways (Fruhbeck, 2006). However, it has been shown that IL-6 is also able to activate the NF-κB pro-inflammatory signalling pathway after binding to its receptor (Yang *et al.*, 2013).

During pregnancy, the placenta becomes a significant source of leptin production (Senaris *et al.*, 1997). Consistent with its placental production, leptin levels peak during the second trimester of pregnancy and fall precipitously after post-partum delivery (Hardie *et al.*, 1997). Leptin produced by the placenta is secreted into both the maternal and foetal circulation (Bajoria *et al.*, 2002; Domali and Messinis, 2002; Sagawa *et al.*, 2002), suggesting a role throughout pregnancy. Moreover, *in vitro* studies have shown that leptin is able to oppose both spontaneous and oxytocin-induced contractions in human myometrium (Moynihan *et al.*, 2006). It also prevents myometrial cell apoptosis and extracellular matrix remodelling (Wendremaire *et al.*, 2011; 2013), two common features of uterine preparation for labour (Smith, 2007), in an *in vitro* model of human myometrial inflammation. Another common feature of labour onset is the switch in the phenotype of myometrial smooth muscle cells from a proliferative to a hypertrophic state, which allows the synthesis of contractile material (Sharma *et al.*, 2006; Magarinos *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007; Tanfin *et al.*, 2011). Maintaining uterine smooth muscle cells in a proliferation state could, therefore, be a promising target for prevention of preterm labour (PTL).

Several studies have suggested that leptin has a proliferative effect (Sharma *et al.*, 2006; Magarinos *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007). Hence, we hypothesized that leptin, by maintaining uterine quiescence, might be of interest as a tocolytic agent and could help to explain the parturition-related disorders observed in obese women. In the present study, we used an *in vitro* approach, thanks to the establishment of primary cell lines, to test if leptin is able to induce human myometrial cell proliferation.

Methods

Primary cell lines establishment

Myometrial biopsies were obtained from women undergoing elective Caesarean section delivery, mostly between 38 and 40 weeks of gestation, for cephalopelvic disproportion, before labour onset. This study was approved by the local ethics committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale, Dijon, France) and a written informed consent was obtained from all donors. Biopsies were cut into small strips and cultured in 100 mm culture dishes, in DMEM (Dominique Dutscher, Brumath, France) supplemented with 20% FBS (PAN Biotech., Aidenbach, Germany) and 1% of 100 IU·mL⁻¹ penicillin G, 100 µg·mL⁻¹ streptomycin and 0.025 mg·mL⁻¹ amphotericin B (PAN Biotech.). After 2 weeks, cells reached confluence. The explants were gently removed; cells were harvested with trypsin 0.05%–EDTA 0.02%, centrifuged at 240× *g* for 10 min at room temperature (RT), resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS at the required density and were placed into new culture dishes. All the experiments were performed on myometrial cells from the third to the sixth passage.

Stimulation protocol

Myometrial cells were seeded in 100 mm culture dishes (2 × 10⁵ cells for flow cytometry), 6-well plates (10⁶ cells per well for Western blot) or on sterile 13 mm glass coverslips in 24-well plates (5 × 10⁴ cells per well for immunofluorescence), allowed to adhere for 24 h and starved for 72 h in serum-free low glucose (1 g·L⁻¹) DMEM without phenol red and L-glutamine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were stimulated in DMEM without phenol red, with 1% of FBS, with leptin at different concentrations (6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 or 12 h to assess cell number and percentage of cells in the S-phase, respectively, by flow cytometry. Leptin was dissolved in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, to the final concentration of 1 mg·mL⁻¹. To investigate the cell cycle phase involved in proliferation, myometrial cells were stimulated for 4 h with leptin at 6.25 and 50 ng·mL⁻¹. To investigate signalling pathways, cells were stimulated with leptin (6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹) and a time course experiment was performed (1–5 min, 10–60 min and 1–8 h). Changes in signal phosphorylation of NF-κB, ERK1/2, Akt and STAT3 were analysed by Western blot. Inhibitors were initially dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) to the concentration of 2 mM for U0126 and 10 mM for S3I-201, triciribine and curcumin. Stimulations were then performed in the presence of U0126 (10 µM), a MEK1/2 inhibitor; S3I-201 (10 µM), a STAT3 inhibitor; triciribine (5 µM), an Akt inhibitor or curcumin (1 µM), an NF-κB inhibitor. The specificity of the effect of leptin was assessed by using leptin receptor antagonist SHLA (100 ng·mL⁻¹) or tocilizumab (1 µg·mL⁻¹), an IL-6 receptor antagonist, added before leptin stimulation. Cells grown in serum-free media served as a negative control whereas cells grown in the presence of 10% serum served as a positive control for each experiment.

Cell proliferation analysis

Myometrial cells were harvested, centrifuged at 240× *g* for 10 min at RT and the pellets were resuspended in trypsin buffer (Spermine tetrahydrochloride, citrate and trypsin) and

incubated for 13 min at RT. Then, RNase buffer (Spermine tetrahydrochloride, citrate, trypsin inhibitor and RNase from bovine pancreas) was added and the samples were incubated for a further 10 min at RT. Cells were finally stained with propidium iodide (PNN-1001, Invitrogen) and analysed with a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, BD, San Diego, CA, USA). The first stage was defined on a size-granularity dot plot to discriminate cells from debris and a second stage was performed on a red-area-red-width dot plot to discriminate single cells from doublets (Supporting Information). Cell proliferation was obtained by measuring the volume of each preparation needed to reach 10 000 events in the secondary stage. The cell cycle profile was determined by measuring the intensity of propidium iodide. The S-phase ratio was quantified with FlowJo software (Miltenyi Biotechnology, Paris, France) (Supporting Information Figure S1).

Western blot analysis

Cells were lysed in 100 µL of cold RIPA buffer [40 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X100, 1% protease inhibitor (P8340; Sigma Aldrich), 1% phosphatase inhibitor (P2850; Sigma-Aldrich)]. Total protein content was determined by Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and samples were dissolved in Laemmli buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (w v⁻¹) SDS, 20% glycerol, 0.5% (w v⁻¹) bromophenol blue] boiled for 3 min at 95°C. Thirty micrograms of total proteins were loaded per well and subjected to SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 h in 5% non-fat dried milk powder in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBST; 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.1% Tween20, pH 7.8) at RT (TBS-tween 0.1%, non-fat dry milk 5%, BSA 0.1%). Blots were probed overnight at 4°C, with primary antibodies with a 1/1000 dilution of primary rabbit anti-phosphoSTAT3 (#9131), anti-phosphoERK1/2 (#9101) antibody or a 1/500 dilution of rabbit anti-phosphoAkt (#9271), anti-phosphoNF-κB (sc-33020), anti-cyclinD1 (#2978), mouse anti-cyclinE (#4129S) antibody, anti-NF-κB (sc-372), anti-ERK1/2 (#9101), anti-Akt (#9272), anti-STAT3 (#9132) or GAPDH antibody (sc-25778) in 1% non-fat dried milk powder in TBST. After three washes with TBST, blots were then incubated for 1 h at RT with HRP-conjugated anti-rabbit (sc-2313) or anti-mouse antibody (sc-2314) at a dilution of 1/5000 or 1/10 000 and washed three times with TBST. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (ECL detection reagents, sc2048, Santa Cruz Biotechnology). Briefly, the membranes were incubated for 1 min in ECL and then exposed to Kodak films for 5 to 10 min. The films were then digitized using GS-800 densitometer and the bands were quantified with QuantityOne® software (BioRad, Hercules, CA, USA). For cyclin expression, the quantified bands were normalized with GAPDH and for phosphorylation assays, the bands were normalized with the total form of the corresponding protein.

Immunofluorescence analysis

Cells were fixed in cold 2% paraformaldehyde in PBS solution for 5 min at 4°C and blocked/permeabilized with PBS supplemented with 1% BSA and 0.1% saponin and incubated for 10 min at RT. Cells were incubated overnight at 4°C with

primary rabbit polyclonal anti-phosphoERK1/2 or anti-phosphoNF- κ B antibody (1/200 dilution in the blocking solution) and then with an Alexa fluor 488 coupled donkey anti-rabbit antibody (1/500 dilution in PBS 10% blocking solution) for 30 min at RT, away from light. Nuclei were stained with 4-6 diamidino-2-phenylindole at 100 ng·mL⁻¹ (DAPI, D9542, Sigma-Aldrich) for 30 s at RT, away from light. The coverslips were rinsed twice in PBS and mounted onto superfrost slides in a Dako anti-fading mounting medium (Dako, S3023, Carpinteria, CA, USA). Slides were viewed on a fluorescence microscope Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japan). Five representative pictures were taken in random chosen fields for each labelling. Pictures were then analysed and merged using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Protein/protein interaction analysis

Leptin and SHLA were biotinylated to a 3:1 molar ratio of biotin : protein using EZ-Link® NHS-PEG4-Biotin (#21330, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) to a final volume of 200 μ L in PBS. Reactions were incubated for 30 min at RT and excess biotin was removed using Zeba™ spin desalting columns, 7K MWCO, 2 mL (#89890, Thermo Scientific). Biotinylated leptin and SHLA concentration was then adjusted to 2 μ g·mL⁻¹ in PBS for further use in interaction analysis. Kinetic interaction experiments were carried out using an Octet Red equipped with streptavidin SBC biosensor tips (ForteBio, Menlo Park, CA, USA). All experiments were performed at 25°C in PBS under 100 \times g agitation. Tips were saturated with 2 μ g·mL⁻¹ biotinylated ligand (leptin and SHLA) for 10 min, which typically resulted in capture levels of 0.9 \pm 0.1 nm within a row of eight tips. For basic kinetic experiments and KD (equilibrium binding constant) determination, the leptin receptor and IL-6 receptor α were prepared at a 1.75-fold serial dilution (typically 3.5, 5.6, 9.8, 17.14 and 30 nM) plus buffer blank, association was then monitored for 10 min and dissociation into PBS followed for 1 h.

Statistical analysis

Differences among groups were determined using ANOVA. When the main effect was significant (ANOVA $P < 0.01$), a Dunn's multiple comparison test was then applied. Statistical analysis was carried out using GraphPad Instat software (version 3, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistically significant results between groups are defined as $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***).

Drugs and solutions

Recombinant human leptin (L4146), pharmacological inhibitor of MEK1/2 (U0126, IC₅₀ = 72 and 58 nM for MEK1 and MEK2, respectively), pharmacological inhibitor of STAT3 (S31-201, IC₅₀ = 86 μ M), pharmacological inhibitor of Akt (tricitriline, IC₅₀ = 130 nM), pharmacological inhibitor of NF- κ B (curcumin, IC₅₀ = 17 μ M) and DAPI (D9542) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Signalling pathway and cyclin antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA) as GAPDH. NF- κ B p65 and secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Alexa fluor 488 coupled donkey anti-rabbit antibody was purchased from Invitrogen (A-21206, Saint-Aubin, France). Leptin antagonist (human

super-active leptin antagonist, SHLA) was purchased from Protein Laboratories (Rehovot, Israel) and IL-6 receptor-inhibiting monoclonal antibody Roactemra® 20 mg·mL⁻¹ (tocilizumab) was purchased from Roche (Boulogne-Billancourt, France). Recombinant human leptin receptor and recombinant IL-6 receptor α (Product No 389-LR/LF and No 227-SR/LF, respectively) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Recombinant human IL-6 (Product No130-095-365) was purchased from Miltenyi Biotechnology (Paris, France).

Results

Leptin receptor stimulation induces primary human myometrial smooth muscle cell proliferation

We first characterized the proliferative effect of leptin receptor stimulation in a primary culture of myometrial cells using leptin at three different doses: 6.25 ng·mL⁻¹ (concentration described in non-obese pregnant women), 25 and 50 ng·mL⁻¹ (average concentrations reported in moderate obesity and obesity respectively). We observed that leptin promotes myometrial cell proliferation by increasing both total cell number (Figure 1A) and the percentage of cells in the S-phase (Figure 1B and C) in a biphasic manner with two peaks at 6.25 and 50 ng·mL⁻¹ showing, respectively, a 47.5 \pm 8.32% and a 39.9 \pm 10.51% increase in cell number and, respectively, two- and 1.6-fold increase in percentage of cells in the S-phase when compared with non-stimulated cells.

Leptin-induced myometrial cell proliferation is selective for the leptin receptor stimulation at 6.25 but not at 50 ng·mL⁻¹

To understand this biphasic effect, we assessed the potential loss of selectivity for the leptin receptor. Thus, myometrial cells were treated with leptin either at 6.25 or 50 ng·mL⁻¹ alone or in the presence of the leptin receptor antagonist SHLA (Shpilman *et al.*, 2011; Gertler and Elinav, 2014). First, we determined by use of the interference biolayer (Octet) that SHLA has a three-fold higher affinity for the leptin receptor than leptin ($K_{D\text{SHLA}} = 0.04$ nM $<$ $K_{D\text{Leptin}} = 0.12$ nM for the leptin receptor; Figure 1D).

We observed that SHLA totally prevented leptin-induced increase in cell number when cells were stimulated with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ whereas SHLA had no significant effect on proliferation induced by leptin at 25 or 50 ng·mL⁻¹ (Figure 1E), indicating that there is a loss of selectivity and that the suppression of leptin-induced proliferation at 25 and 50 ng·mL⁻¹ is not caused by stimulation of the leptin receptor.

As both leptin and its receptors share structural and functional similarities with the IL-6 receptor family, we hypothesized that leptin could also bind to the IL-6 receptor. We therefore assessed the effect of inhibiting the IL-6 receptor with tocilizumab (a humanized anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody) on leptin-induced proliferative effects. As shown in Figure 2A, tocilizumab did not affect the increase in cell number induced by leptin at 6.25 ng·mL⁻¹. However, when leptin was used at 25 and 50 ng·mL⁻¹, we observed that tocilizumab significantly facilitated the proliferative effect of leptin. These results suggest that, with high doses of leptin,

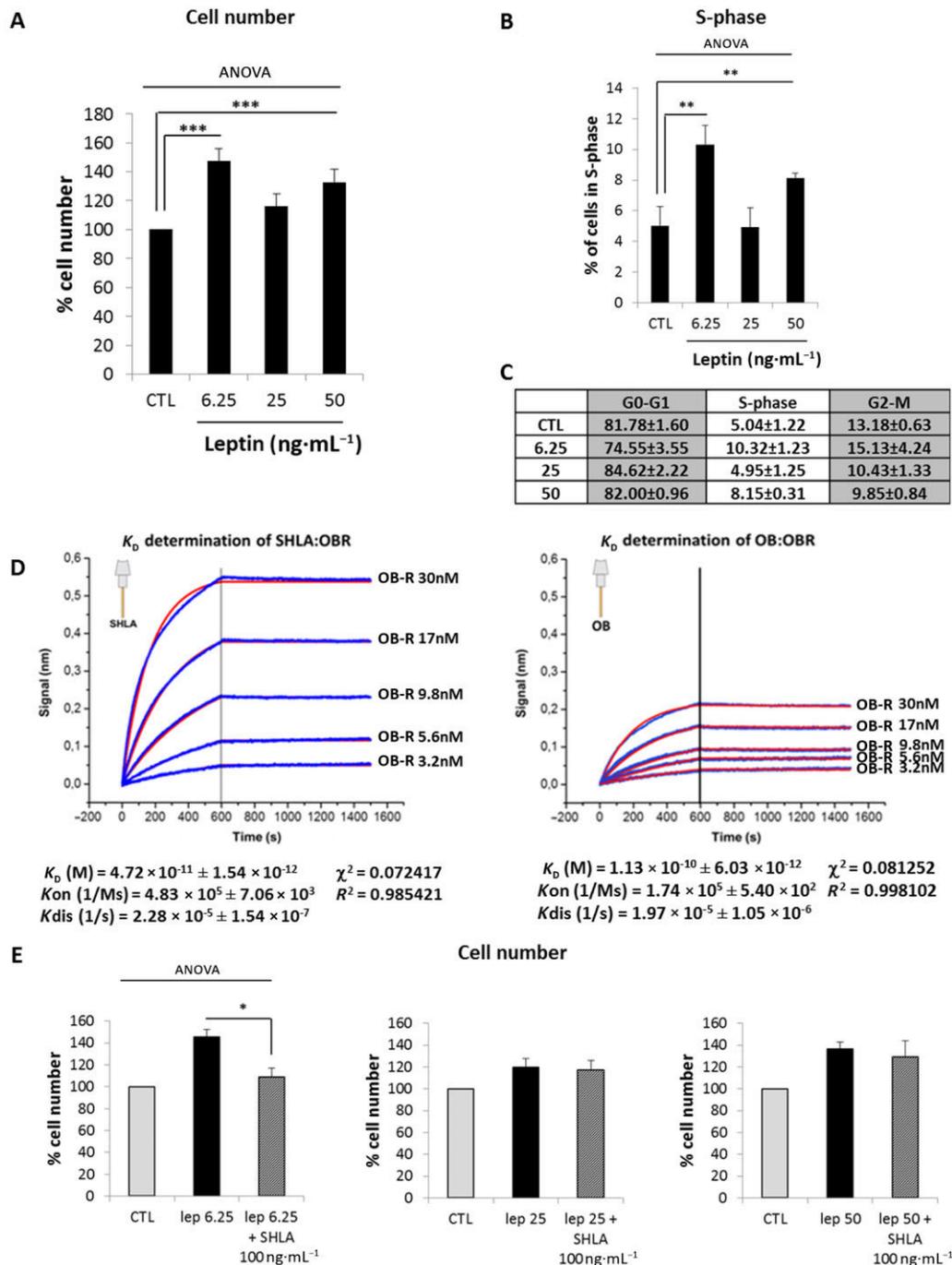


Figure 1

Leptin induces human myometrial smooth muscle cells (HM-SMC) proliferation. Cells were treated with leptin (6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 or 12 h (for cell number and S-phase, respectively), labelled with propidium iodide and analysed by flow cytometry. (A, B and C): Proliferation: cell number as a percentage of non-stimulated cells (CTL) (A) and percentage of cells in S-phase versus CTL (B) are presented as mean values \pm SEM for five independent experiments. Percentage of cells in each phase of the cell cycle is expressed as mean values \pm SEM for five independent experiments in (C). $^{**}P < 0.01$ versus CTL, $^{***}P < 0.001$ versus CTL. (D) Determination of K_D for SHLA : leptin receptor (OBR) and leptin (OB) : leptin receptor (OBR). Octet biosensors were saturated with 2 μ g·mL⁻¹ SHLA or leptin (OB) and incubated for 10 min with the leptin receptor (3.2, 5.6, 9.8, 17 and 30 nM) for association measurement and 15 min in PBS for dissociation measurement. Results are expressed as delayed wavelength versus time for the variable concentrations (blue curves). Fitting curves (red), K_D (equilibrium binding constant), K_{on} (association rate constant), K_{dis} (dissociation rate constant), χ^2 (chi-squared statistical test) and R^2 (correlation coefficient) were determined in global 1:1 model. (E) Effect of leptin receptor antagonist, SHLA. Cells were treated with leptin (6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 h in the presence or absence of leptin antagonist SHLA (100 ng·mL⁻¹). Cell numbers are expressed as percentage versus CTL and presented as mean values \pm SEM from four independent experiments. $^*P < 0.05$ versus leptin 6.25 alone.

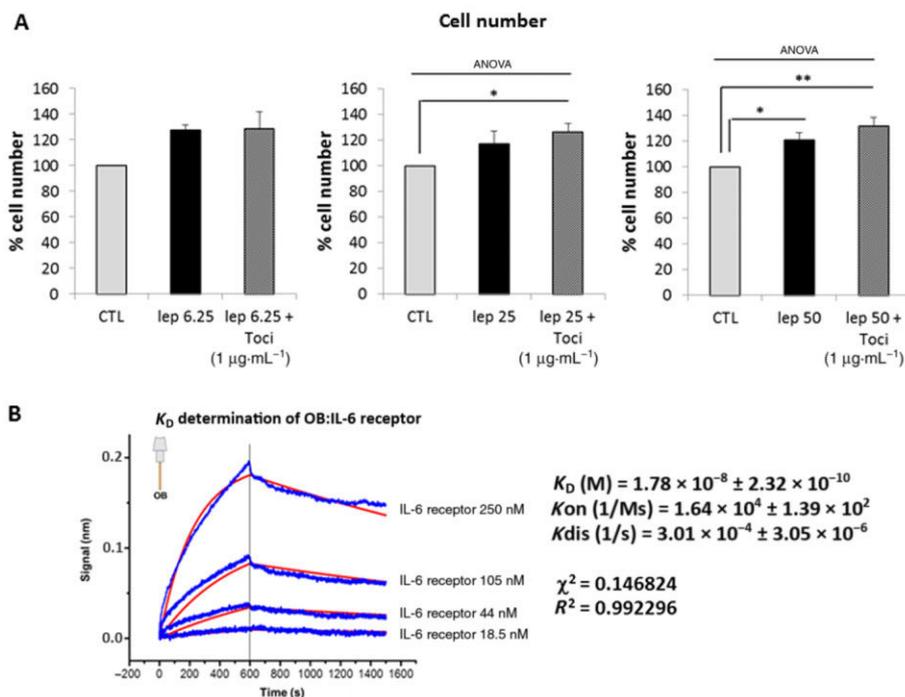


Figure 2

Leptin-induced human myometrial smooth muscle cells (HM-SMC) proliferation is selective for stimulation of the leptin receptor at 6.25 ng·mL⁻¹ but not at 50 ng·mL⁻¹. (A) Effect of IL-6 receptor antagonist. Cells were treated with leptin (6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 h in the presence or absence of tocilizumab (1 µg·mL⁻¹). Cell numbers are expressed as percentage versus CTL (unstimulated cells) and presented as mean values ± SEM from four independent experiments. * $P < 0.05$ versus CTL, ** $P < 0.01$ versus CTL. (B) Determination of K_D for leptin-IL-6 receptor. Octet biosensors were saturated with 2 µg·mL⁻¹ leptin and incubated for 10 min with IL-6 receptor α (18.5, 44, 105 and 250 nM) for association measurement and 15 min in PBS for dissociation measurement. Results are expressed as delayed wavelength versus time for the variable concentrations (blue curves). Fitting curves (red), K_D (equilibrium binding constant), K_{on} (association rate constant), K_{dis} (dissociation rate constant), χ^2 (chi-squared statistical test) and R^2 (correlation coefficient) were determined in global 1:1 model.

IL-6 receptor could be activated and responsible for a repression of leptin-induced proliferative effects. To strengthen this *in vitro* observation, we also demonstrated that leptin is able to bind to IL-6 receptors. Indeed, we measured an 18 nM affinity of leptin for the IL-6 receptor, indicating an affinity of leptin 15 times lower for the IL-6 receptor compared with the leptin receptor (Figure 2B), explaining why leptin can only activate the IL-6 receptor at high concentrations.

Taken together, these results indicate that proliferation induced by leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ is specific to stimulation and activation of the leptin receptor. At higher concentrations, leptin also binds to the IL-6 receptor that may be responsible for its lack of proliferative effect observed at 25 ng·mL⁻¹.

Specific- and non-specific-mediated proliferative effects of leptin require different signalling pathways

We next aimed to determine if leptin 6.25 ng·mL⁻¹- and leptin 50 ng·mL⁻¹-mediated proliferative effects are induced through different signalling pathways. We investigated the three main signalling pathways (ERK1/2, Akt, STAT3) using a pharmacological inhibitor approach.

We performed leptin stimulation at different doses, a low one specific to leptin receptor stimulation (6.25 ng·mL⁻¹) and

a high one involving activation of IL-6 receptors (50 ng·mL⁻¹), in the presence or absence of the MEK1/2 inhibitor U0126, Akt inhibitor triciribine or STAT3 inhibitor S3I-201.

Flow cytometry analysis revealed that the blockade of MEK1/2 fully inhibited the proliferative effect of leptin at both 6.25 and 50 ng·mL⁻¹ (Figure 3A), while S3I-201 only inhibited the proliferation induced by leptin 50 ng·mL⁻¹ (Figure 3B), suggesting that the ERK1/2 signalling is required for both leptin receptor-specific and non-specific proliferative effects and that the STAT3 pathway is only required for the non-specific effects of leptin. No inhibition was observed with triciribine, suggesting that Akt is not involved in the proliferative effects of leptin (Figure 3C).

Leptin-induced myometrial cell proliferation at 6.25 ng·mL⁻¹ involves the early activation of ERK1/2

To further characterize the differences in leptin-induced specific and non-specific signalling, we investigated the time course of the effects of stimulation and measured the abundance of the phosphorylated forms of ERK1/2. First in response to leptin 6.25 ng·mL⁻¹, we observed an induction of ERK1/2 phosphorylation [1.7 ± 0.2 -fold increase vs. control (CTL)] which appeared at 2 min and peaked after 3 min of

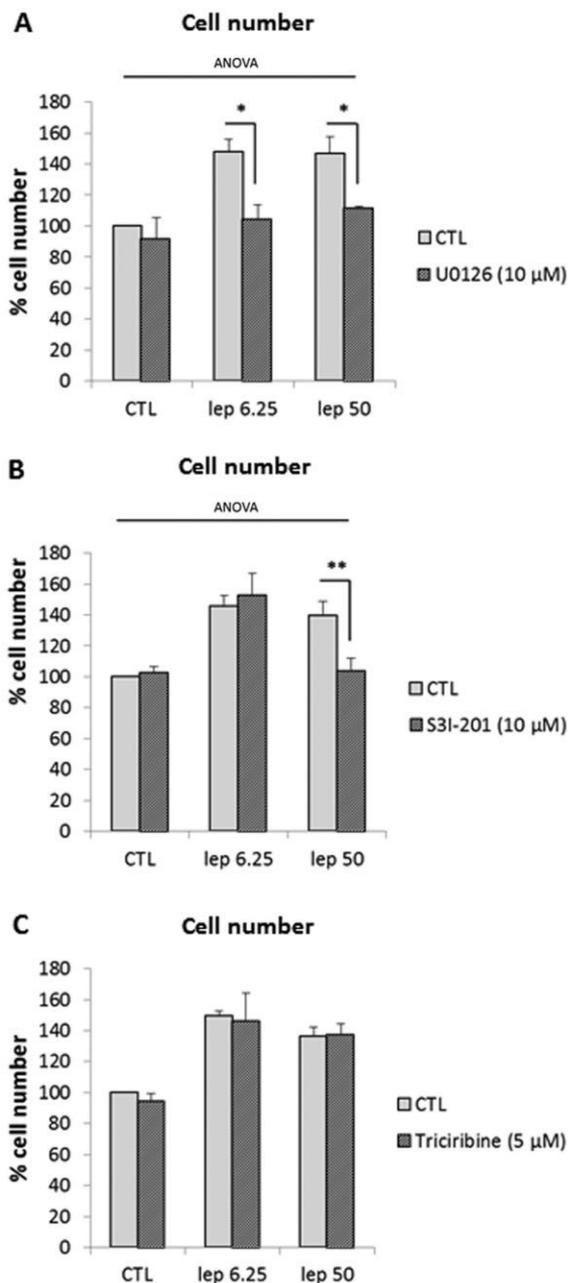


Figure 3

Leptin receptor-specific and non-specific mediated proliferative effects require different signalling pathways. (A) ERK1/2 inhibition. Cells were treated with leptin (6.25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 h in the presence or absence of U0126 (10 μ M). U0126 was added 1 h before leptin. Numbers are expressed as percentages versus CTL and presented as mean values \pm SEM from four independent experiments. * P < 0.05 versus leptin 6.25 or 50 alone. (B) Effect of STAT3 inhibition. Cells were treated with leptin (6.25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 h in the presence or absence of S3I-201 (10 μ M). S3I-201 was added 1 h before leptin. Numbers are expressed as percentages versus CTL and presented as mean values \pm SEM from four independent experiments. ** P < 0.01 versus leptin 50 alone. (C) Effect of Akt inhibition. Cells were treated with leptin (6.25 and 50 ng·mL⁻¹) for 24 h in the presence or absence of triciribine (5 μ M). Triciribine was added 1 h before leptin. Numbers are expressed as percentages versus CTL and presented as mean values \pm SEM from four independent experiments.

stimulation (Figure 4A). We also observed that leptin induced a second wave of ERK1/2 phosphorylation (2.1 ± 0.2 -fold increase vs. CTL) which appeared at 10 min and peaked after 50 min of stimulation (Figure 4B). These two peaks were associated with its translocation into myometrial cell nuclei (Figure 4C). No further activation of ERK1/2 was observed for longer stimulation times (Figure 4D). In accordance with our earlier results (Figure 3B and C), we did not observe any increase in the phosphorylation levels of STAT3 and Akt in response to leptin 6.25 ng·mL⁻¹ (Supporting Information Figure S2). These results suggest that leptin receptor-specific signalling induced by leptin is mediated by an early and transient activation of ERK1/2.

Leptin-(re)induced myometrial cell proliferation at 50 ng·mL⁻¹ is mediated through STAT3/ERK1/2 activation

We next focused on the second signalling pathway, non-specific for the leptin receptor, induced by leptin at 50 ng·mL⁻¹. Because we previously observed the requirement for both ERK1/2 and STAT3 for the proliferative effects of this dose, we measured the abundance of the phosphorylated forms of ERK1/2 and STAT3 in response to leptin 50 ng·mL⁻¹. We observed an induction of STAT3 phosphorylation (3.3 ± 0.7 -fold increase vs. CTL) which appeared at 1 h and peaked after 6 h of stimulation (Figure 5A). No induction of STAT3 was observed for short or intermediate stimulation times (Figure 5B). Interestingly, we observed a decrease in phosphorylated STAT3 when the IL-6 receptor antagonist tocilizumab and leptin 50 ng·mL⁻¹ were used together (2.4 ± 0.2 vs. CTL) compared with leptin alone (3.3 ± 0.4 vs. CTL) (Supporting Information Figure S3A). Moreover, we observed that the use of leptin receptor antagonist SHLA potentiated the effect of leptin 50 ng·mL⁻¹ on STAT3 phosphorylation (3.3 ± 0.4 vs. CTL and 8.1 ± 3.1 vs. CTL for leptin alone and leptin/SHLA respectively) (Supporting Information Figure S3B). Taken together, these results suggest that leptin 50 ng·mL⁻¹-induced proliferation is mediated through STAT3 activation in an IL-6 receptor-dependent manner.

In contrast to what we observed with leptin 6.25 ng·mL⁻¹, we did not observe ERK1/2 phosphorylation with leptin at 50 ng·mL⁻¹ (Figure 5C). These results suggest that early leptin receptor-induced ERK1/2 activation is blocked when the non-specific pathway is concomitantly induced and could occur later on.

We, therefore, investigated the kinetics of inhibition with U0126 that was added either 1 h before (H-1) or 3 h (H+3) and 8 h (H+8) after leptin. We observed that the proliferative effects of leptin 50 ng·mL⁻¹ were blocked when U0126 was added at H-1 and H+3 (Figure 5D), but not at H+8, indicating that ERK1/2 activation is required for leptin 50 ng·mL⁻¹-induced proliferative effects and takes place 3 to 8 h after leptin stimulation. Both H+3 and H+8 failed to inhibit leptin 6.25 ng·mL⁻¹-induced proliferative effects (Supporting Information Figure S3C), confirming an early activation of ERK1/2 in response to this low dose of leptin.

However, we still failed to detect the transient ERK1/2 activation in the longer time course (1–8 h). We therefore assessed cyclin D1 and E expression, which are classically described to be downstream targets of ERK1/2 activation (Meloche and Pouyssegur, 2007). We observed that 50 ng·mL⁻¹

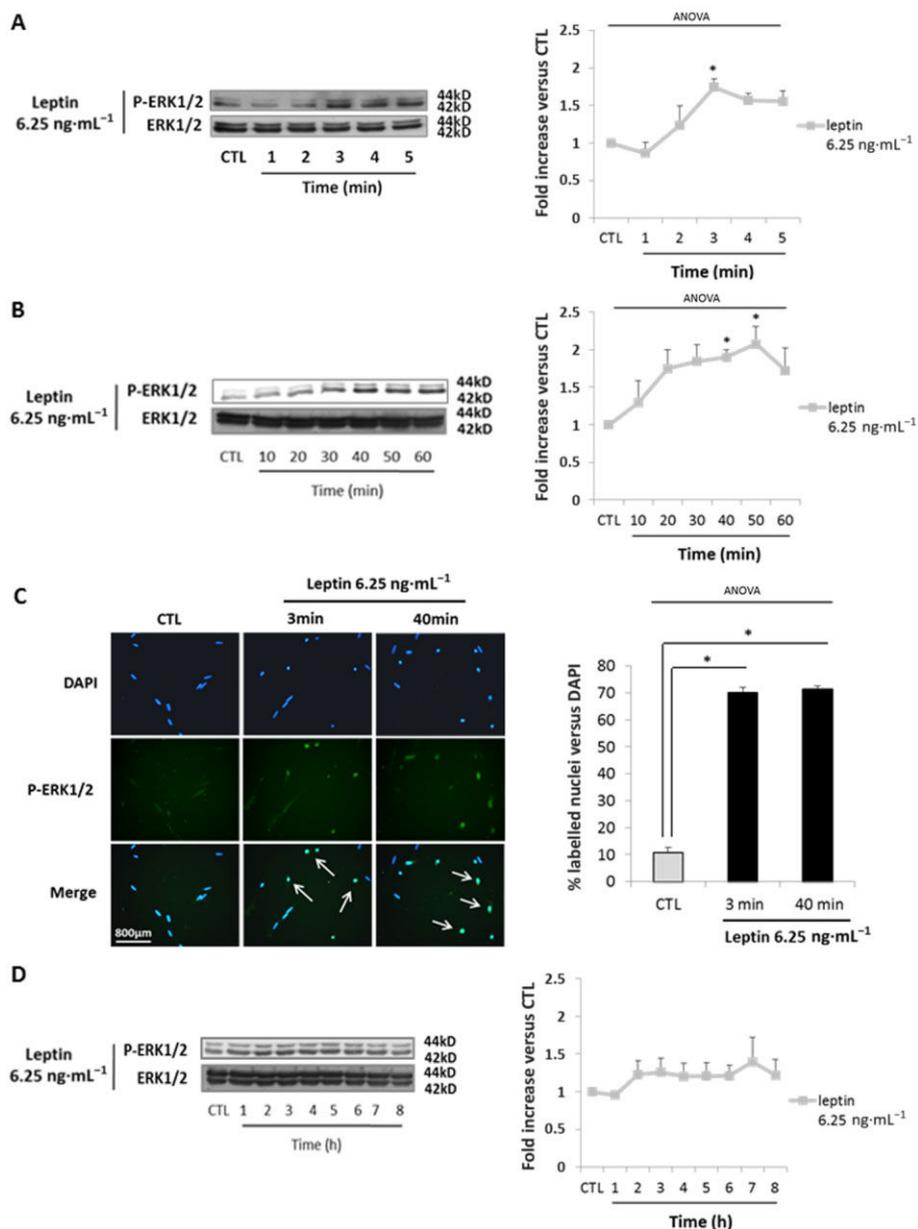


Figure 4

Leptin-induced human myometrial smooth muscle cells (HM-SMC) proliferation at 6.25 ng·mL⁻¹ is mediated through ERK1/2 activation. (A, B and D) Western blots of p-ERK1/2. Cells were cultured with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ for 0–5 min (A), 10–60 min (B) and 1–8h (D). The blots are representative of five independent experiments. Quantification: 42 kDa p-ERK1/2 bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands were compared with total of bands formed for each condition and presented as mean values ± SEM. **P* < 0.05 versus CTL (non-stimulated cells). (C) P-ERK1/2 immunofluorescence. Fixed cells were labelled with anti-P-ERK1/2 antibody, Alexa fluor 488 and with DAPI for nuclear localization. Five representative pictures were taken with an epifluorescence microscope (×400) in random chosen fields for each labelling. Pictures were then analysed and merged using ImageJ software. Quantification: bars represented the mean ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05 versus CTL (non-stimulated cells).

leptin induced the expression of both cyclin D1 and E after 4 h of stimulation (Figure 5E, 2.7 ± 0.4 and 2.1 ± 0.6-fold increase for cyclin D1 and cyclin E compared with untreated cells), confirming that ERK1/2 activation occurs between 3 and 8 h.

Finally, in accordance with our earlier results (Figure 3C), we did not observe any increase in the phosphorylation levels of Akt in response to leptin 50 ng·mL⁻¹ (Supporting Information Figure S2B).

The NF-κB pathway is activated by high leptin concentrations in human myometrial cells

Because the IL-6 receptor shares the three pathways commonly activated by the leptin receptor but only IL-6 receptor stimulation activates NF-κB, we examined whether the interaction of leptin with the IL-6 receptor was associated with

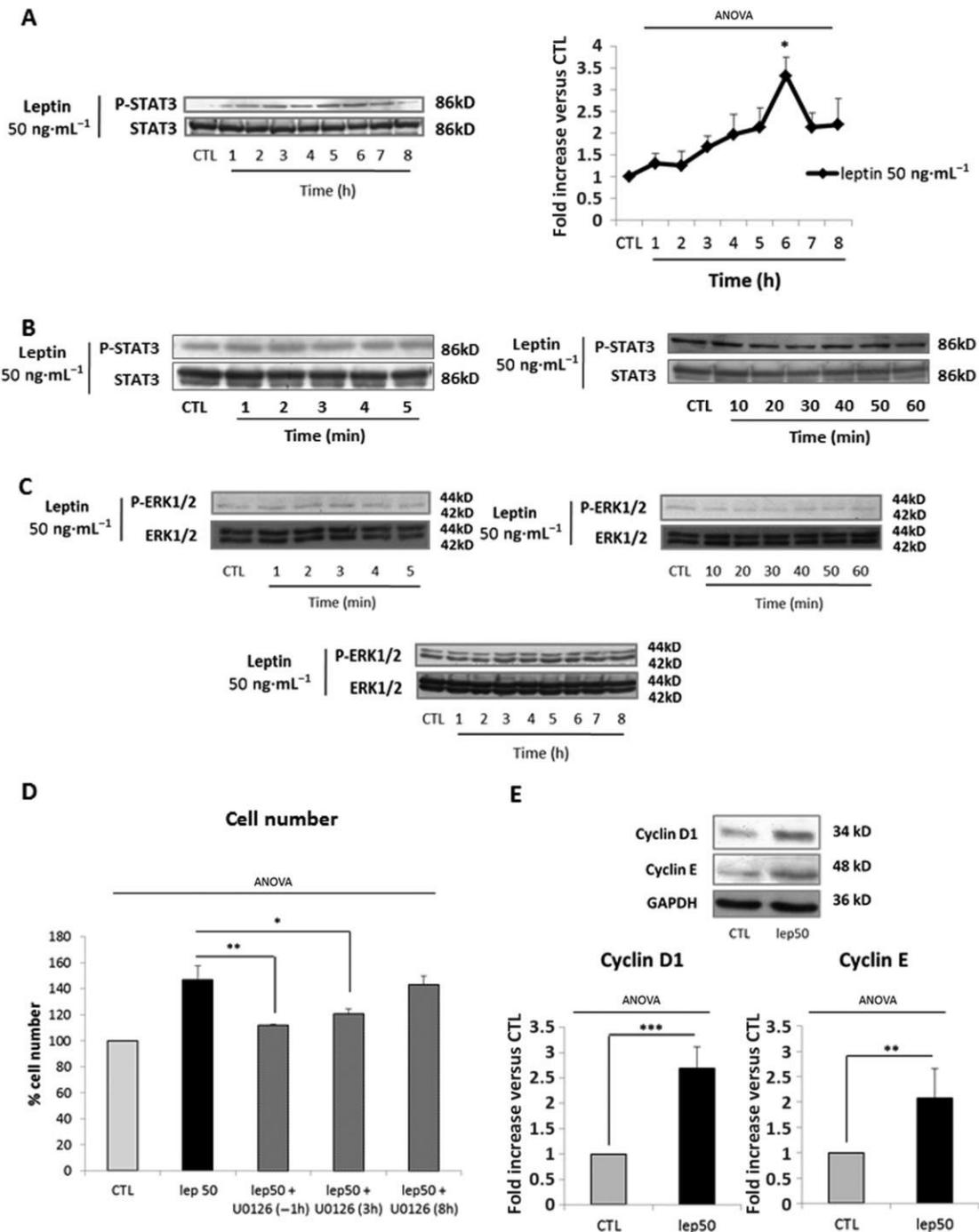


Figure 5

Leptin-induced myometrial cell proliferation at 50 ng·mL⁻¹ is mediated through STAT3 activation. (A and B) Western blots p-STAT3. Cells were cultured with leptin 50 ng·mL⁻¹ for 1–8 h (A) and 1–60 min (B). The blots are representative of four independent experiments. Quantification: 86 kDa p-STAT3 bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total of bands formed for each condition and presented as mean values ± SEM. **P* < 0.05 versus CTL (non-stimulated cells). (C) Western blots of p-ERK1/2. Cells were cultured with leptin at 50 ng·mL⁻¹ for 0–5 min, 10–60 min and 1–8 h. The blots are representative of five independent experiments. Quantification: 42 kDa p-ERK1/2 bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total of bands formed for each condition and presented as mean values ± SEM. (D) ERK1/2 inhibition. Cells were treated with leptin at 50 ng·mL⁻¹ for 24 h in the presence or absence of U0126 (10 μM). U0126 was added 1 h before leptin stimulation (H-1), 3 h (H+3) or 8 h (H+8) after leptin treatment. Numbers are expressed as percentages versus CTL and presented as mean values ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus leptin 50 alone. (E) Cyclin D1 and cyclin E expression. Cells were stimulated with leptin at 50 ng·mL⁻¹ for 4 h. The blots are representative of four independent experiments. The 34 kDa cyclin D1 and 48 kDa cyclin E bands were digitized and quantified with QuantityOne. Bands are compared with GAPDH for each condition. Relative quantities versus CTL are presented as mean values ± SEM. ***P* < 0.01 versus CTL, ****P* < 0.001 versus CTL.

NF- κ B activation, which is commonly involved in inflammatory and anti-proliferative effects.

We showed that leptin at 50 ng·mL⁻¹ induced a significant increase in the phosphorylation of NF- κ B whereas we did not observe any activation of NF- κ B with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹. (Figure 6A and B). Our time-course response to leptin at 50 ng·mL⁻¹ at short and intermediate times demonstrated an induction of NF- κ B phosphorylation (1.8 ± 0.2 -fold increase vs. CTL), which appeared at 2–3 min and peaked after 3–4 min of stimulation (Figure 6A), associated with its nuclear translocation (Figure 6C). Finally, we observed that leptin induced a second wave of NF- κ B phosphorylation (2.2 ± 0.6 -fold increase vs. CTL, Figure 6B), with nuclear translocation (Figure 6C) after 50 min of stimulation. Accordingly, with the lack of NF- κ B phosphorylation after stimulation with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹, we did not observe its nuclear translocation.

Interestingly, NF- κ B phosphorylation is dose-dependently induced in response to leptin (Supporting Information Figure S4A), with the first significant effect observed with leptin 25 ng·mL⁻¹. Moreover, leptin at 25 ng·mL⁻¹ is also able to induce full activation of NF- κ B (Supporting Information Figure S4B and C).

Therefore, we wanted to see if NF- κ B was responsible for the absence of a proliferative effect of leptin at 25 ng·mL⁻¹. Thus we studied the effect of curcumin, a NF- κ B inhibitor, on leptin-induced cell proliferation. We observed that curcumin, which had no effect on the response to leptin 6.25 ng·mL⁻¹, potentiated the proliferative effects of leptin 50 ng·mL⁻¹ (Figure 6D) and was able to restore the proliferative effect to leptin 25 ng·mL⁻¹ (Supporting Information Figure S4D).

NF- κ B pathway activation is due to non-specific stimulation of the IL-6 receptor by leptin at high doses

Because NF- κ B was only activated by high doses of leptin, we wondered if NF- κ B phosphorylation was exclusively the result of IL-6 receptor activation or also involved leptin receptor activation. Cells were thus treated with leptin either at 50 ng·mL⁻¹ alone or in the presence of either SHLA or tocilizumab.

We observed after both a short (4 min) and a long (50 min) time of stimulation with leptin at 50 ng·mL⁻¹ that tocilizumab prevented leptin-induced NF- κ B phosphorylation (Figure 7A) and nuclear translocation (Figure 7B) while SHLA did not prevent either NF- κ B phosphorylation (Figure 8A) or nuclear translocation (Figure 8B). The same results were observed with leptin 25 ng·mL⁻¹ (Supporting Information Figure S4E). These results indicate that NF- κ B activation observed with high concentrations of leptin is specific to IL-6 receptor stimulation.

Discussion

Proliferative effects of leptin on myometrial cells

High doses of leptin induce proliferation of myometrial cells via IL-6 receptor signalling. Leptin-induced proliferation is not specific for the leptin receptor at concentrations above 25 ng·mL⁻¹, as proliferation was not prevented by SHLA. We

further demonstrated both by competition and binding studies that this loss of selectivity was caused by the interaction of leptin with the IL-6 receptor.

Several studies have shown that leptin leads to the production of IL-6, which then activates IL-6 receptor signalling pathways. For example, leptin-induced IL-6 production, signalling and subsequent STAT3 activation promotes the proliferation of colon epithelial pre-neoplastic cells giving a biologically plausible link between leptin and obesity-associated colon cancer (Fenton *et al.*, 2006). Leptin-induced IL-6 production also mediates several steps in the activation of the inflammatory response (Yang *et al.*, 2013) and thus could contribute to the chronic low-grade inflammation observed in obesity. Nevertheless, in our study, we did not observe any IL-6 production by myometrial cells (Supporting Information Figure S5). We demonstrated that leptin was able to bind to the IL-6 receptor and induce proliferation at 50 ng·mL⁻¹; this was mediated by IL-6 receptor stimulation as SHLA did not suppress this effect. Thus, we propose a new mechanism by which leptin, at concentrations corresponding to morbid obesity, directly interferes with the IL-6/IL-6 receptor axis involved in chronic low-grade inflammation.

Leptin-induced activation of the IL-6 receptor leads to modification of signalling pathways. In this study, we demonstrated that leptin-induced proliferation required ERK1/2 activation. This pathway has been widely studied as it is thought to be activated by virtually all mitogenic factors (Yang *et al.*, 2013). ERK1/2 is indeed a key regulator of the early cell cycle induction, as it is involved in G0/G1 and G1/S transition and our team demonstrated a key role for the biphasic transient activation of ERK1/2 in myometrial cell proliferation (Hadi *et al.*, 2013). However, we only observed ERK1/2 phosphorylation and nuclear translocation in response to the lower dose of leptin. Nevertheless, kinetics experiments using an ERK1/2 inhibitor allowed us to determine that ERK1/2 activation occurred between 3 and 8 h, after stimulation with 50 ng·mL⁻¹ leptin.

The ERK1/2 pathway activation is commonly described as being transiently activated, thus, when this activation does not occur directly upon the binding of a ligand to its receptor, the detection of its activation becomes challenging. However, we observed that the addition of U0126 together with leptin 50 ng·mL⁻¹ significantly decreased cell number when compared with leptin 50 ng·mL⁻¹ alone. Moreover, thanks to kinetics experiments using U0126, we demonstrated an activation of ERK1/2 pathway occurring between 3 and 8 h after the addition of 50 ng·mL⁻¹ leptin. Furthermore, many studies have shown that ERK1/2 activation is responsible for cyclin D1 expression (Suzuki *et al.*, 2002) and further favours cyclin D1-induced cyclin E expression. Thus, the induction of both cyclins expression after 4 h of stimulation with leptin at 50 ng·mL⁻¹ confirms that the ERK1/2 pathway was activated around this time point. Taken together, these results suggest that ERK1/2 activation is involved in leptin 50 ng·mL⁻¹-induced cell proliferation.

The last point concerning ERK1/2 signalling is that the effects of leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ relied on direct activation of the ERK1/2 pathway, while 50 ng·mL⁻¹ leptin firstly activates the STAT3 pathway that later leads to ERK1/2 activation.

Upon phosphorylation, STAT3 promotes the transcription of downstream genes involved in cellular functions, such as

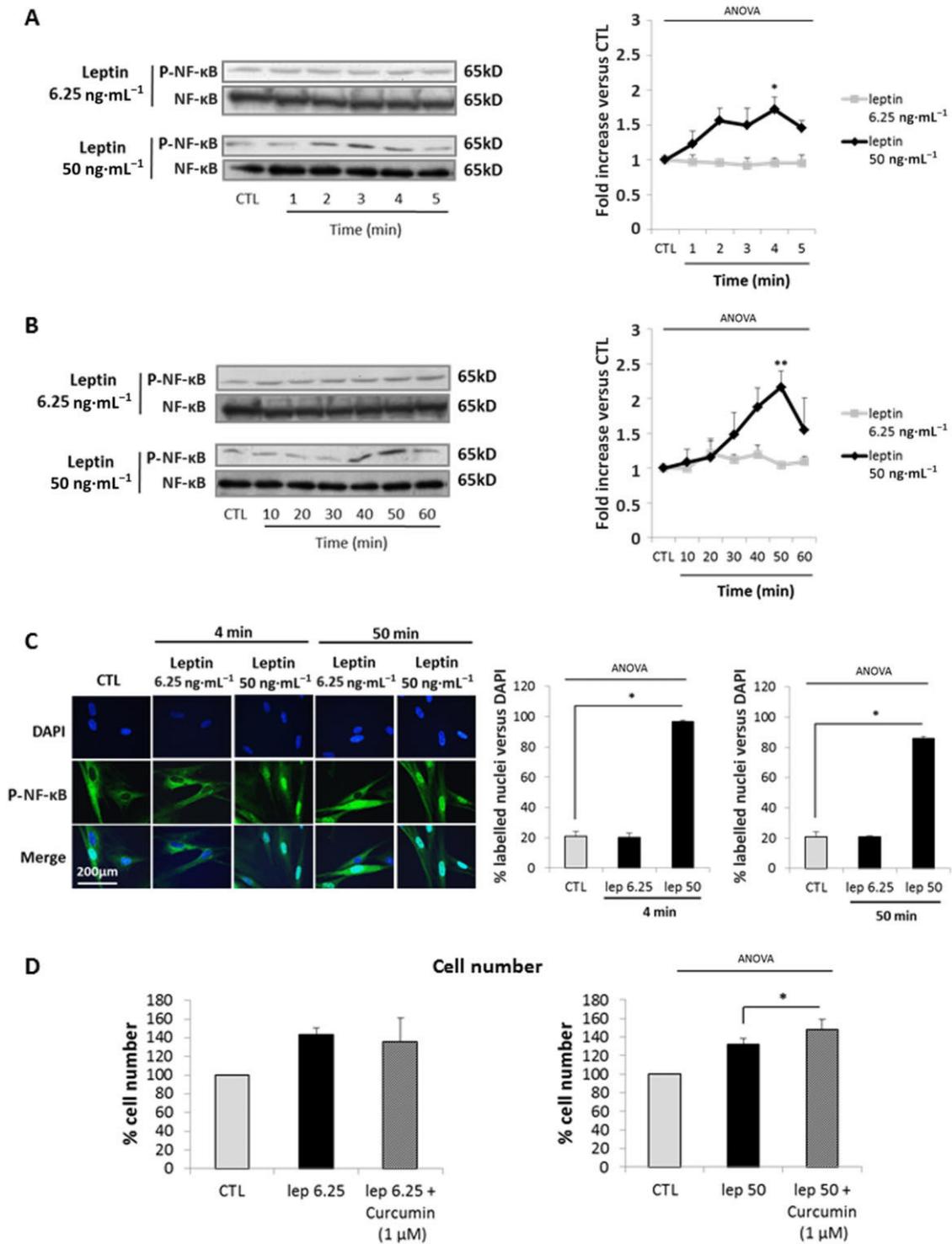


Figure 6

NF-κB signalling pathway is activated by high concentrations of leptin. (A,B) Western blots p-NF-κB. Cells were cultured with leptin (6.25, 50 ng·mL⁻¹) for 0–5 (A) and 10–60 min (B). The blots are representative of four independent experiments. Quantification: 65 kD p-NF-κB bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total of bands formed for each condition and presented as mean values ± SEM. **P* < 0.05 versus CTL, ***P* < 0.01 versus CTL. (C) P-NF-κB immunofluorescence. Fixed cells were labelled with anti-P-NF-κB antibody, Alexa fluor 488 and with DAPI for nuclear localization. Pictures, taken with an epifluorescence microscope (×1000) in random chosen fields, are representative of five pictures taken for each condition. Quantification: bars represent the mean ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05 versus CTL. (D) NF-κB inhibition. Cells were treated with leptin (6.25 and 50 ng·mL⁻¹) in the presence or absence of curcumin (1 μM). Cell numbers are expressed as percentage versus CTL and presented as mean values ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05 versus leptin 50 alone.

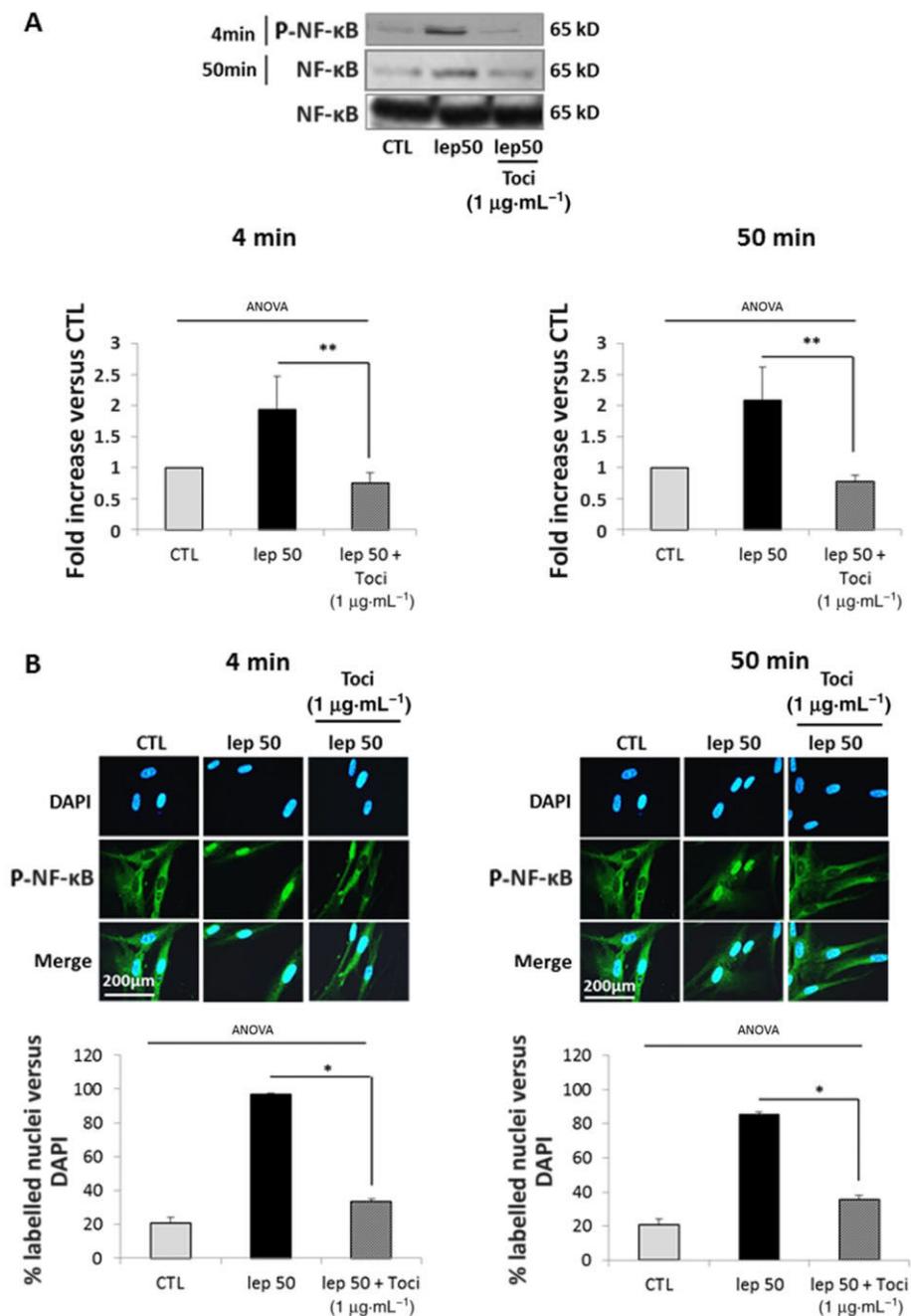


Figure 7

Leptin-induced NF-κB pathway activation is caused by non-specific stimulation of the IL-6 receptor. Cells were treated with leptin at 50 ng·mL⁻¹ for 4 or 50 min in the presence or absence of tocilizumab (1 μg·mL⁻¹). (A) Western blots for p-NF-κB. The blots are representative of four independent experiments. Quantification: 65 kD p-NF-κB bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total form bands for each condition and represented as mean values ± SEM. ****P* < 0.01 versus lep50 alone. (B) P-NF-κB immunofluorescence: cells were labelled with anti-P-NF-κB antibody, Alexa fluor 488 and with DAPI for nuclear localization. Pictures, taken with an epifluorescence microscope (×1000) in random chosen fields, are representative of five pictures taken for each condition. Quantification: bars represent the mean ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05 versus leptin 50 alone.

proliferation, migration and anti-apoptotic functions (Levy and Lee, 2002). Studies have reported that STAT3 can induce proliferation independently of ERK1/2 activation (Fukada *et al.*, 1996; Horiguchi *et al.*, 2002), while other authors report cross-talks with ERK1/2 signalling (Chen *et al.*, 2008; Liu

et al., 2011; Morales-Prieto *et al.*, 2013). In leptin-induced proliferation of endometrial cancer cells, STAT3 is able to directly phosphorylate ERK1/2 (Sharma *et al.*, 2006). In this case, ERK1/2 activation occurs within the same kinetics as STAT3, which was not the case in our study. The delayed

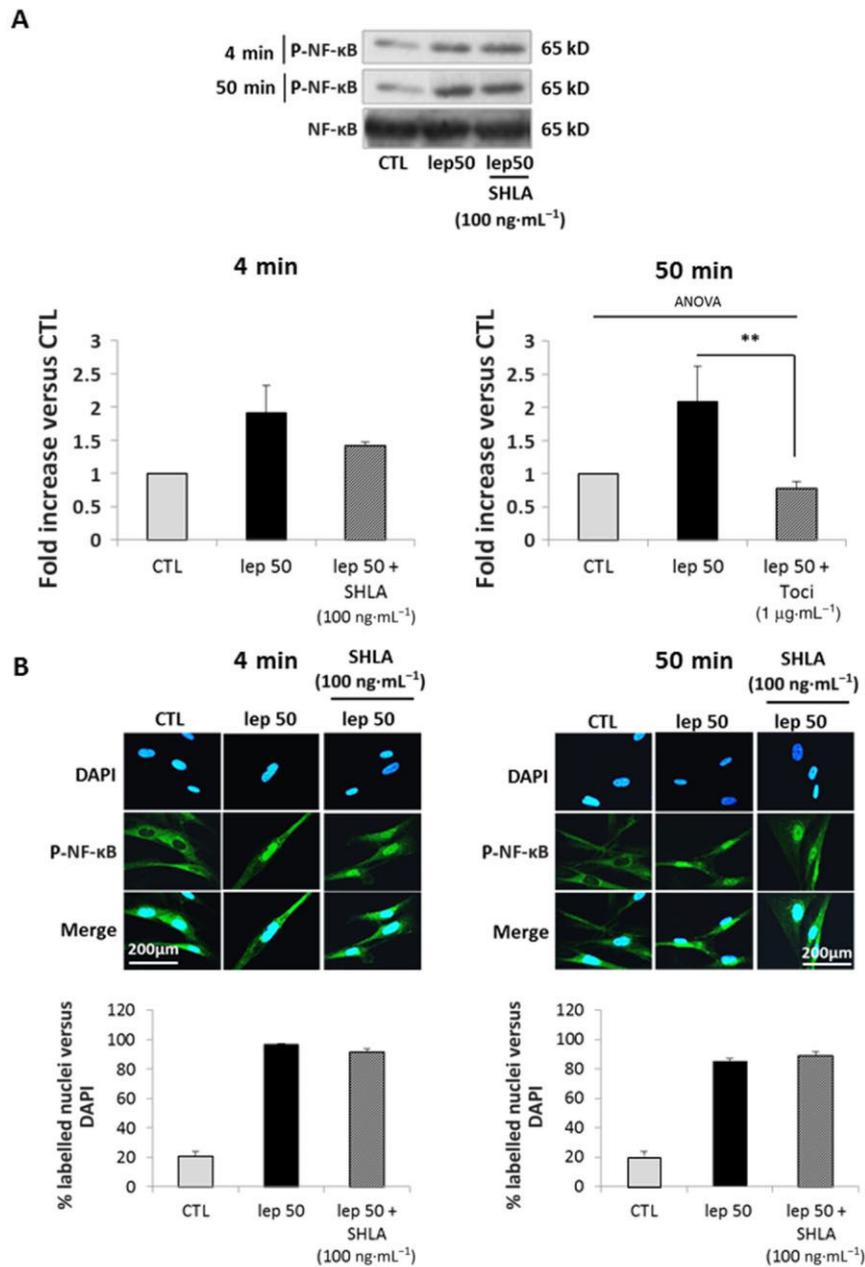


Figure 8

Leptin-induced NF-κB pathway activation is not mediated by stimulation of the leptin receptor. Cells were treated with leptin 50 ng·mL⁻¹ for 4 and 50 min in the presence or absence of SHLA (100 ng·mL⁻¹). (A) Western blots for p-NF-κB. The blots are representative of four independent experiments. Quantification: 65 kD p-NF-κB bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total of bands formed for each condition and presented as mean values ± SEM. (B) P-NF-κB immunofluorescence: cells were labelled with anti-P-NF-κB antibody, Alexa fluor 488 and with DAPI for nuclear localization. Pictures, taken with an epifluorescence microscope (×1000) in random chosen fields, are representative of five pictures taken for each condition. Quantification: bars represent the mean ± SEM from three independent experiments.

activation observed by us is more consistent with the cross-talk observed by others, where STAT3 induces the expression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) (Morales-Prieto *et al.*, 2013), which in turn inactivates the negative regulator of Ras signalling, RasGAP, indirectly leading to an increase in ERK1/2 activity.

As mentioned previously, the IL-6 receptor- but not leptin receptor-mediated signalling is induced at high doses of leptin. The IL-6 receptor has also been demonstrated to induce the proliferation of various cell types [proB cells (Fukada *et al.*, 1996), renal cancer cells (Horiguchi *et al.*, 2002) and vascular smooth muscle cells (Morimoto *et al.*, 1991)].

The associated signalling also involves STAT3, the major downstream target of IL-6 signalling, either independent (Horiguchi *et al.*, 2002) or dependent on ERK1/2 activation (Toth *et al.*, 2011). The IL-6 receptor is also able to trigger ERK1/2 activation independently of STAT3 activation, via SHP-2/ERK1/2 activation (Fukada *et al.*, 1996). However, STAT3 activation in this cell type remains primordial as it induces the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2 and protects the cell against death. Consistent with this, our team has demonstrated anti-apoptotic effects of leptin in the myometrium (Wendremaire *et al.*, 2011).

Taken together, these results demonstrate that leptin directly activates the IL-6 receptor axis with pro- and anti-proliferative signalling dependent on the dose. IL-6 receptor activation also leads to modification of leptin receptor signalling. This could help to explain leptin resistance as this phenomenon can be caused by an impairment of leptin receptor signalling pathways. Indeed, obesity is associated with chronic low-grade IL-6 production that activates STAT3 and induces SOCS3 expression which phosphorylates the SH-2 domain of the leptin receptor, leading to its inactivation (Fruhbeck, 2006).

Leptin in parturition

Leptin and obesity-related delivery disorders. Maternal obesity is associated with a wide spectrum of delivery disorders, such as postdate pregnancies or preterm deliveries. Indeed, it has been reported to be an independent predictor of a dysfunctional labour, with delayed labour onset leading to higher rates of postdates pregnancies (Cedergren, 2004; Denison *et al.*, 2008; Arrowsmith *et al.*, 2011). Surprisingly, maternal obesity seems to be associated with preterm deliveries (McDonald *et al.*, 2010; Cnattingius *et al.*, 2013). Although most of them are medically indicated because of obesity-related disorders, such as pre-eclampsia (Hendler *et al.*, 2005), some authors reported an association between obesity and spontaneous preterm deliveries (Khatibi *et al.*, 2012; Cnattingius *et al.*, 2013).

Because obese women exhibit elevated circulating levels of leptin (Misra and Trudeau, 2011), we speculated that delivery disorders observed in these women are linked with the versatile effects of leptin on labour-associated processes, such as myometrial proliferation. The underlying mechanism for these differential effects of leptin is that elevated leptin concentrations are associated with an impaired myometrial response (mediated by stimulation of the IL-6 receptor instead of the leptin receptor), in favour of peripheral leptin resistance (Zhang and Scarpace, 2006) resulting from down-regulation of the leptin receptor (Liu *et al.*, 2007). In more detail, we suggest that PTL observed in obese women might be caused by the activation of the IL-6 receptor/NF- κ B pathway by leptin whereas postdate pregnancies might be linked to stimulation of the IL-6 receptor/STAT3 pathway leading to myometrial proliferation. Nevertheless, this assumption needs to be confirmed by further experiments as the stimulation protocol used in our study mimicked a single-dose exposure rather than a chronic one.

Leptin and pharmacological management of PTL. Leptin has been previously proposed as a tocolytic agent, as it exerts a potent cumulative inhibitory effect on myometrial

contractions (Wuntakal and Hollingworth, 2010). Our team has also shown that leptin is able to prevent myometrial apoptosis and extracellular matrix remodelling, two common features of labour onset. In this study, we demonstrated that leptin induces proliferation of myometrial cells, maintaining them in contractile quiescence phase, adding to the interest in the use of leptin for the management of PTL. However, leptin is also able to induce NF- κ B via stimulation of the IL-6 receptor. The NF- κ B pathway has been demonstrated to have variable effects on cell apoptosis/survival, depending upon the activating stimuli. Indeed, the list of NF- κ B target genes includes both proliferative [cyclin D1 (Hinz *et al.*, 1999)] and pro-apoptotic [p53 and c-myc (Baeuerle and Henkel, 1994)] genes. Studies have demonstrated that the prosurvival effects of NF- κ B require the concomitant expression of Bcl2 (Grimm *et al.*, 1996), which is a target protein of the IL-6 receptor/STAT3 signalling pathway. Further studies have demonstrated a strong link between STAT3 activation and the NF- κ B-induced proliferation in response to cytokines (Grivennikov and Karin, 2010). Thus, our results showing a requirement of STAT3 activation for the leptin/IL-6 receptor-triggered proliferation of myometrial cells are in line with these data. Moreover, we found that the NF- κ B pathway activation is not only dispensable but also seems to have deleterious effects on the leptin-induced proliferation. Indeed, NF- κ B inhibition potentiated the proliferative effects of leptin at 25 and 50 ng·mL⁻¹. These results suggest that NF- κ B, which partly represses the proliferative effect of leptin, could antagonize leptin receptor activation at high leptin doses and be responsible for the observed blockade of the early leptin receptor-mediated activation of ERK1/2.

In pregnancy, inflammation leads to myometrial cell differentiation and contractions. It has been shown that NF- κ B regulates the pro-inflammatory and procontractile genes involved in labour and is required for the synthesis of prostaglandins (Christiaens *et al.*, 2008). Thus, while leptin could be of interest to prevent PTL, caution is needed regarding the doses used to avoid the deleterious activation of NF- κ B. Previous studies performed with leptin have used doses 10- to 100-fold higher than those used in our study (Caüzac *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010). Nevertheless, experiments were performed on human myometrial biopsies and not with monolayers of cultured cells, thus it is difficult to compare these results with those obtained with the doses used in our studies.

Lastly, MacIntyre *et al.* (2014) recently demonstrated that NF- κ B activation is not a functional requirement for infection/inflammation-induced PTL. Furthermore, *in vivo* studies have shown that amniotic perfusion of IL-6 in pregnant non-human primates is not able to induce PTL, as does IL-1 β or TNF- α . Thus, the IL-6 receptor, as an inducer of myometrial cell proliferation, could, despite its pro-inflammatory effects, help to maintain the myometrium in a quiescent state.

Conclusion

These data bring new insights into leptin signalling and its interrelationship with the IL-6/IL-6 receptor axis as summarized in Figure 9. In the light of our previous work, the

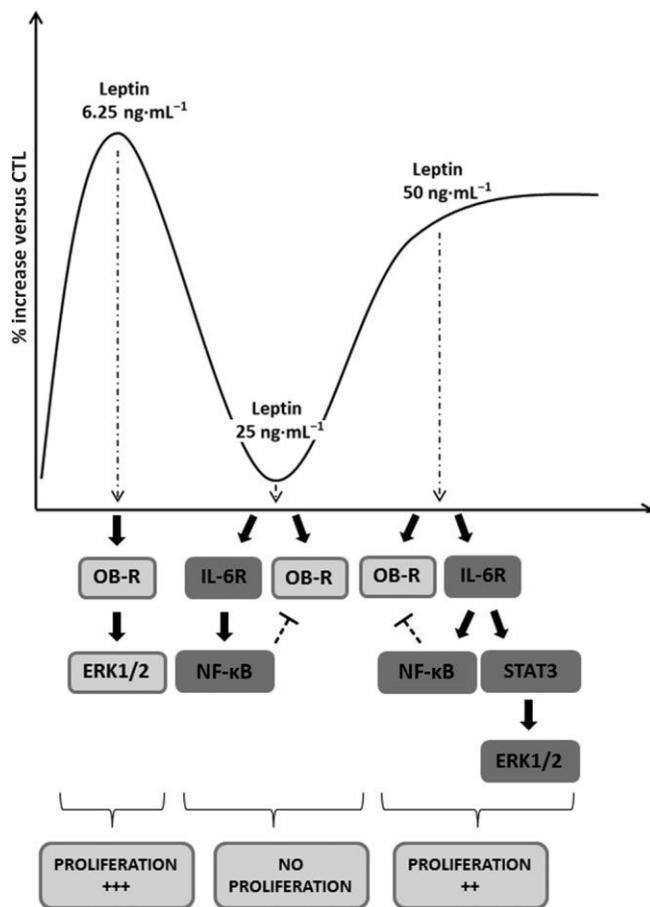


Figure 9

Putative signalling model for leptin-induced human myometrial cell proliferation. Leptin $6.25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ is able to induce human myometrial cell proliferation via activation of the ERK1/2 signalling pathway, in an leptin receptor (OB-R)-dependent manner. At $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, leptin is able to bind both the IL-6 and leptin receptors. Leptin $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ induces the pro-inflammatory NF- κ B pathway, which is supposed to inhibit leptin receptor signalling and thus to inhibit proliferation. Leptin $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ is able to induce the anti-proliferative NF- κ B signalling pathway and the pro-proliferative STAT3/ERK1/2 pathway, in an IL-6 receptor-dependent manner, resulting in the proliferation of human myometrial cells.

present study emphasizes the potential value of leptin in the pharmacological management of PTL, as it is able to maintain proliferation and to oppose the triggering mechanisms of labour, remodelling, apoptosis and their consequences (i.e. myometrial contractions). Nevertheless, as high doses of leptin also activate NF- κ B, further studies are required to investigate if leptin also induces myometrial differentiation.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Regional Council of Burgundy (Conseil regional de Bourgogne) grant AOI Lirussi 2011.

Author contributions

M. Barrichon, T. H. and M. W. performed the research. F. L., M. Bardou and M. Dumas designed the research study. R. S., C. P., G. M., M. Delignette, J. M. and P. S. contributed essential reagents or tools. M. Barrichon analysed the data. M. Barrichon, T. H., F. L. and C. G. wrote the paper.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1676–1705.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Enzymes. *Br J Pharmacol* 170: 1797–1867.
- Arrowsmith S, Wray S, Quenby S (2011). Maternal obesity and labour complications following induction of labour in prolonged pregnancy. *Brit J Obstet Gynaecol* 118: 578–588.
- Bauerle PA, Henkel T (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141–179.
- Bajoria R, Sooranna SR, Ward BS, Chatterjee R (2002). Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface. *Placenta* 23: 103–115.
- Caüzac M, Czuba D, Girard J, Hauguel-de Mouzon S (2003). Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta* 24: 378–384.
- Cedergren MI (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 103: 219–224.
- Chen C, Chang YC, Liu TP, Chang KJ, Guo IC (2007). 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* 14: 513–529.
- Chen RJ, Ho YS, Guo HR, Wang YJ (2008). Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. *Toxicol Sci* 104: 283–293.
- Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 79: 50–57.
- Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Dietz PM, Callaghan WM, Lau J *et al.* (2007). Maternal obesity and risk of cesarean delivery: a meta-analysis. *Obesity Rev* 8: 385–394.
- Crattingius S, Villamor E, Johansson S, Edstedt Bonamy AK, Persson M, Wikström AK *et al.* (2013). Maternal obesity and risk of preterm delivery. *JAMA* 309: 2362–2370.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR *et al.* (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292–295.

- Denison FC, Price J, Graham C, Wild S, Liston WA (2008). Maternal obesity, length of gestation, risk of postdates pregnancy and spontaneous onset of labour at term. *Brit J Obstet Gynaecol* 115: 720–725.
- Domali E, Messinis IE (2002). Leptin in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12: 222–230.
- Fenton JI, Hursting SD, Perkins SN, Hord NG (2006). Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis* 27: 1507–1515.
- Fruhbeck G (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7–20.
- Fukuda T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T *et al.* (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5: 449–460.
- Gertler A, Elinav E (2014). Novel superactive leptin antagonists and their potential therapeutic applications. *Curr Pharm Des* 20: 659–665.
- Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K (1996). Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 134: 13–23.
- Grivennikov SI, Karin M (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 11–19.
- Hadi T, Barrichon M, Mourtialon P, Wendremaire M, Garrido C, Sagot P *et al.* (2013). Biphasic Erk1/2 activation sequentially involving Gs and Gi signaling is required in beta3-adrenergic receptor-induced primary smooth muscle cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1041–1051.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P (1997). Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47: 101–106.
- Harris RB (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1842: 414–423.
- Hendler I, Goldenberg RL, Mercer BM, Iams JD, Meis PJ, Moawad AH *et al.* (2005). The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 192: 882–886.
- Henson MC, Swan KF, O'Neil JS (1998). Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 92: 1020–1028.
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19: 2690–2698.
- Horiguchi A, Oya M, Marumo K, Murai M (2002). STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int* 61: 926–938.
- Huang F, Xiong X, Wang H, You S, Zeng H (2010). Leptin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via regulating cell cycle, activating ERK1/2 and NF-κB. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42: 325–331.
- Khatibi A, Brantsaeter AL, Sengpiel V, Kacarovsky M, Magnus P, Morken NH *et al.* (2012). Prepregnancy maternal body mass index and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 207: e211–e217.
- Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H (2000). Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1946–1950.
- Levy DE, Lee CK (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109: 1143–1148.
- Liu Y, Lv L, Xiao W, Gong C, Yin J, Wang D *et al.* (2011). Leptin activates STAT3 and ERK1/2 pathways and induces endometrial cancer cell proliferation. *J Huazhong Univ Sci Technol* 31: 365–370.
- Liu ZJ, Bian J, Liu J, Endoh A (2007). Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Hormone Metab Res* 39: 489–494.
- MacIntyre DA, Lee YS, Migale R, Herbert BR, Waddington SN, Peebles D *et al.* (2014). Activator protein 1 is a key terminal mediator of inflammation-induced preterm labor in mice. *FASEB J* 28: 2358–2368.
- Magarinos MP, Sanchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL (2007). Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod* 76: 203–210.
- McDonald SD, Han Z, Mulla S, Beyene J, Knowledge Synthesis G (2010). Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses. *BMJ* 341: c3428.
- Meloche S, Pouyssegur J (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26: 3227–3239.
- Misra VK, Trudeau S (2011). The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy. *Obesity* 19: 416–421.
- Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Weber M, Holters S, Schleussner E *et al.* (2013). Intracellular crosstalk between extracellular regulated kinase1/2 and signal transducer and activator of transcription 3 regulates JEG-3 choriocarcinoma cell invasion and proliferation. *ScientificWorldJournal* 2013: 259845.
- Morimoto S, Nabata T, Koh E, Shiraishi T, Fukuo K, Imanaka S *et al.* (1991). Interleukin-6 stimulates proliferation of cultured vascular smooth muscle cells independently of interleukin-1 beta. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 (Suppl. 2): S117–S118.
- Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, Smith TJ, Morrison JJ (2006). Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 195: 504–509.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands. *Nucl Acids Res* 42 (Database Issue): D1098–D1106.
- Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D *et al.* (2002). Role of leptin in pregnancy – a review. *Placenta* 23 (Suppl. A): S80–S86.
- Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D *et al.* (2007). 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* 67: 2497–2507.
- Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV *et al.* (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138: 4501–4504.
- Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA (2006). Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer* 13: 629–640.
- Shpilman M, Niv-Spector L, Katz M, Varol C, Solomon G, Ayalon-Soffer M *et al.* (2011). Development and characterization of high affinity leptins and leptin antagonists. *J Biol Chem* 286: 4429–4442.

Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J *et al.* (1996). Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277–1282.

Smith R (2007). Parturition. *N Engl J Med* 356: 271–283.

Suzuki TJKT, Ajima R, Nakamura T, Yoshida Y, Yamamoto T (2002). Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes Dev* 16: 1356–1370.

Tanfin Z, Leiber D, Robin P, Oyeniran C, Breuille-Fouche M (2011). Endothelin-1: physiological and pathological roles in myometrium. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 299–302.

Toth KG, McKay BR, De Lisio M, Little JP, Tarnopolsky MA, Parise G (2011). IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS ONE* 6: e17392.

Wendremaire M, Bardou M, Peyronel C, Hadi T, Sagot P, Morrison JJ *et al.* (2011). Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 205: e361–e369.

Wendremaire M, Mourtialon P, Goirand F, Lirussi F, Barrichon M, Hadi T *et al.* (2013). Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an in vitro model of human myometrial inflammation. *Biol Reprod* 88: 45.

Wuntakal R, Hollingworth T (2010). Leptin – a tocolytic agent for the future? *Med Hypotheses* 74: 81–82.

Yang WH, Liu SC, Tsai CH, Fong YC, Wang SJ, Chang YS *et al.* (2013). Leptin induces IL-6 expression through OBRI receptor signaling pathway in human synovial fibroblasts. *PLoS ONE* 8: e75551.

Yu CK, Teoh TG, Robinson S (2006). Obesity in pregnancy. *Brit J Obstet Gynaecol* 113: 1117–1125.

Zhang J, Bricker L, Wray S, Quenby S (2007). Poor uterine contractility in obese women. *Brit J Obstet Gynaecol* 114: 343–348.

Zhang Y, Scarpace PJ (2006). The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 88: 249–256.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13100>

Figure S1 Representative histograms of cell cycle analysis.
Figure S2 Akt and STAT3 signalling pathways. (A) STAT3 signalling pathway. Cells were stimulated with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ for 0–5 and 10–60 min. Presented blots are rep-

resentative of four independent experiments. (B) Akt signalling pathway. Cells were cultured with leptin at 6.25 or 50 ng·mL⁻¹ for 0–5 min, 10–60 min and 1–8 h. Presented blots are representative of five independent experiments.

Figure S3 Leptin-induced STAT3 activation at 50 ng·mL⁻¹ is IL-6 receptor dependent. (A,B) Western blots p-STAT3. Cells were cultured with leptin at 50 ng·mL⁻¹ for 6 h in the presence or absence of (A) IL-6 receptor antagonist tocilizumab (1 µg·mL⁻¹) or (B) leptin receptor antagonist SHLA (100 ng·mL⁻¹). Presented blots are representative of four independent experiments. Quantification: 86 kDa bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total protein for each condition and represented as mean value ± SEM, *n* = 4. **P* < 0.05 versus lep50 alone. (C) ERK1/2 inhibition. Cells were treated with leptin at 6.25 ng·mL⁻¹ for 24 h in the presence or absence of U0126 (10 µM). U0126 was added 1 h (H-1), 3 h (H+3) or 8 h (H+8) before or after leptin stimulation. Numbers are expressed as percentages versus control (CTL) and represented as mean values ± SEM from four independent experiments. **P* < 0.05 versus lep6.25 alone.

Figure S4 NF-κB signalling pathway. Cells were treated with leptin at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 ng·mL⁻¹) for 50 min (A), at 25 ng·mL⁻¹ for 0–5 min and 10–60 min (B), at 25 ng·mL⁻¹ for 24 h in the presence or absence of curcumin (1 µM) (D) or at 25 ng·mL⁻¹ for 4 or 50 min in the presence (E) or absence (C) of tocilizumab (1 µg·mL⁻¹) or leptin antagonist SHLA (100 ng·mL⁻¹). (A,B) Western blots p-NF-κB. Presented blots are representative of four independent experiments. Quantification: 65 kD p-NF-κB bands were digitized and quantified with QuantityOne. Phosphorylated bands are compared with total form bands for each condition and represented as mean values ± SEM. ***P* < 0.01 versus CTL. (C and E) p-NF-κB immunofluorescence: Cells were labelled with anti-P-NF-κB antibody, Alexa fluor 488 and with DAPI for nuclear localization. Five pictures were taken with an epifluorescence microscope (×1000) in random chosen fields for each condition. *n* = 3. (D) Flow cytometry. Total cell numbers are expressed as percentage versus control (CTL) and represented as mean values ± SEM from four independent experiments. ***P* < 0.01 versus lep25 alone.

Figure S5 IL-6 secretion. Concentrations of IL-6 (pg·mL⁻¹) in supernatants from myometrial cells stimulated with leptin at 6.25, 25 and 50 ng·mL⁻¹ were measured by ELISA. Data are presented as percentage of IL-6 released compared with IL-6 level in supernatant of non-stimulated cells (CTL). Bars represented the mean ± SEM from four independent experiments.

Figure S6 Supplementary methods: Gating strategy for proliferation and cell cycle phase assessment.

III. Conclusion article I

Ce travail nous a permis de mettre en évidence une prolifération des cellules myométriales humaines induite par la leptine, de façon biphasique, mais également d'identifier une nouvelle signalisation à l'origine de cet effet, faisant intervenir l'activation des voies de signalisation couplées au récepteur à la leptine (OB-R), mais également l'activation de la voie pro-inflammatoire NFκB, couplée au récepteur à l'IL-6 (IL-6R).

Nous avons ainsi démontré que cet effet de la leptine sur la prolifération des cellules myométriales humaines se traduit par une augmentation du nombre total de cellules et du pourcentage de cellules en phase S aux concentrations de 6.25 et 50 ng/ml, pouvant s'expliquer par une perte de sélectivité du récepteur à la leptine en faveur du récepteur à l'IL-6 lorsque des concentrations élevées de leptine sont utilisées (25 et 50 ng/ml). En effet, nous avons mis en évidence que la leptine à 6.25 ng/ml induit une prolifération cellulaire après une stimulation spécifique de son récepteur OB-R, suivie par l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (phosphorylation et translocation nucléaire après 3 et 40 minutes de stimulation). En revanche, lorsque de plus fortes concentrations de leptine (25 et 50 ng/ml) sont utilisées, la leptine est également capable de se fixer aux récepteurs à l'IL-6 et d'induire une prolifération via la stimulation de ce récepteur. En effet, nous avons montré que la leptine à 50 ng/ml induit l'activation de la voie IL-6R/STAT3/ERK1/2, stimulant la prolifération des cellules myométriales, mais également l'activation de la voie pro-inflammatoire IL-6R/ NFκB en faveur de la différenciation cellulaire. Cette perte de sélectivité peut ainsi expliquer le manque de prolifération à 25 ng/ml et une prolifération moindre à 50 ng/ml.

Bien qu'une activation de ERK1/2 n'ait été observée, par western blot, qu'en réponse à de faibles concentrations de leptine (6.25 ng/ml), une activation de cette voie a été mise en évidence

par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, pour la concentration de 50 ng/ml, pour des temps de stimulation plus longs (entre 3 et 6 heures). La voie de signalisation ERK1/2 étant connue pour être un régulateur clé du cycle cellulaire (transitions G0/G1 et G1/S), l'induction des cyclines D1 et E observée après 4 heures de stimulation par la leptine à 50 ng/ml confirme ainsi que cette voie est activée entre 3 et 6 heures de stimulation par la leptine à cette concentration. De plus, une activation de la voie de signalisation STAT3 (entre 1 et 6 heures) a été mise en évidence en réponse à une stimulation par la leptine à cette même concentration, activation spécifique d'une stimulation du récepteur à l'IL-6 par la leptine. Ces résultats soulignent ainsi le fait que les effets de la leptine à 6.25 ng/ml sont transmis par une activation directe de la voie ERK1/2, alors qu'à une concentration de 50 ng/ml la leptine active tout d'abord la voie STAT3, qui conduit à l'activation de la voie ERK1/2 plus tardivement. Enfin, une activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire NFκB (phosphorylation et translocation nucléaire après 4 et 50 minutes de stimulation), spécifique de la stimulation du récepteur à l'IL-6, a également été démontrée lorsque les cellules sont stimulées par la leptine à de fortes concentrations (25 et 50 ng/ml). Ces résultats démontrent ainsi que la leptine, en plus d'activer la voie de signalisation ERK1/2, couplée à son récepteur, est également capable d'activer directement le récepteur à l'IL-6 et d'activer les voies de signalisation pro- (STAT3, ERK1/2) et anti- (NFκB) prolifératives, selon la dose de leptine utilisée.

En résumé, ce travail apporte également de nouveaux éléments sur le potentiel rôle de la leptine dans la prévention et la prise en charge de la menace d'accouchement prématuré, en maintenant les cellules dans un état prolifératif et en s'opposant aux mécanismes de mises en route du travail tels que le remodelage et l'apoptose myométriales et leurs conséquences (contractions efficaces du myomètre). Néanmoins, nous avons démontré que des doses élevées de leptine sont capables d'activer la voie de signalisation pro-inflammatoire NFκB, via la stimulation du récepteur à l'IL-6. Nous suggérons ainsi que les accouchements prématurés observés chez les femmes obèses pourraient être causés par l'activation de la voie IL-6R/NFκB par la leptine, alors que les

dépassements de terme pourraient être liés à la stimulation de la voie IL-6R/STAT3/ERK1/2 conduisant à la prolifération des cellules myométriales et donc maintenant l'utérus dans un état de quiescence contractile. D'autres études sont alors nécessaires afin de confirmer cette hypothèse, le protocole de stimulation utilisé dans notre étude imitant une dose unique de leptine plutôt qu'une exposition chronique à la leptine. De plus, il est nécessaire de vérifier si la leptine est capable d'induire ou de s'opposer à la différenciation des cellules myométriales vers un statut hypertrophique, ce qui a été l'objet du second travail de cette thèse.

PARTIE II : PROJET LEPTINE ET DIFFERENCIATION DES CELLULES MYOMETRIALES HUMAINES

I. Introduction article II

Comme mentionnée précédemment, l'obésité maternelle est associée à une régulation complexe des mécanismes de l'accouchement, augmentant notamment le risque de prématurité [27-28, 204], qu'elle soit spontanée [204-207] ou induite pour raisons médicales. Une étude [26] a de plus souligné le fait que l'augmentation du risque de prématurité est plus particulièrement observée chez les femmes présentant une obésité de grade II ou III. Il semblerait alors que les femmes en surpoids ou présentant une obésité de grade I aient un risque réduit de 15 % d'accoucher avant 37 SA, comparé aux femmes de poids normal [206]. A l'inverse, l'obésité maternelle est également associée à des dépassements de terme [212-214], contribuant au besoin accru d'induire le travail dans le cas d'une grossesse prolongée [170, 215-216].

Une des hypothèses avancées afin d'expliquer ces perturbations de la mise en route du travail est l'absence ou l'irrégularité des contractions utérines observées chez les femmes obèses [211], comme démontré par l'étude *in vitro* de Zhang *et coll.* [171]. Une nouvelle stratégie afin de comprendre les mécanismes à l'origine de ces deux situations pathologiques est d'étudier les phases précédant les contractions myométriales efficaces, telles que la prolifération des cellules myométriales ainsi que leur transition en phase d'hypertrophie durant laquelle les cellules vont débiter la synthèse du matériel contractile. En effet, à l'approche du terme, les cellules myométriales vont changer de phénotype, passant d'un statut prolifératif associé à une quiescence contractile, à un statut hypertrophique, associé à la synthèse du matériel contractile indispensable à la mise en route du travail [142]. Cette phase d'hypertrophie est caractérisée par une réorganisation du cytosquelette (actine, h-caldesmone, HSP27) [65], une synthèse de médiateurs de la contraction

(OXTR, COX2 et PGF2 α) [151], ainsi qu'une augmentation de l'expression des jonctions gap (Cx43) [351] et une dépolarisation cellulaire (augmentation des concentrations intracellulaires de calcium). Tous ces évènements contribuent à différencier les cellules myométriales vers un état hypertrophique, étape indispensable pour que les cellules retrouvent une activité contractile efficace. Bien que les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce changement phénotypique ne soient pas parfaitement connus, il est clairement établi que l'inflammation joue un rôle déterminant dans la préparation et la mise en route du travail qu'il soit prématuré ou à terme. Il a ainsi été démontré une activation des monocytes circulants [100] ainsi qu'une infiltration du myomètre par les macrophages, qui sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires générant une réaction inflammatoire locale [49, 91, 107]. Challier *et coll.* ont de plus mis en évidence une inflammation systémique chez les patientes obèses, en rapportant notamment une élévation des taux sériques d'IL-6 ainsi que de l'expression génique d'IL-6 et de CD68 (marqueur monocytaire de différenciation macrophagique) dans les cellules mononuclées du sang périphérique de ces patientes [352].

Par ailleurs, dans le précédent travail de cette thèse, nous avons mis en évidence des effets opposés de la leptine sur la prolifération des cellules myométriales humaines selon la concentration utilisée, prolifération associée ou non à l'induction d'une signalisation pro-inflammatoire spécifique de l'activation du récepteur à l'IL-6 par la leptine, au détriment de son récepteur OB-R [353]. Aux vues de ces effets en faveur (leptine 6.25 ng/ml) mais également en défaveur (leptine 50 ng/ml) d'un potentiel rôle tocolytique de la leptine, il nous apparaissait donc essentiel d'évaluer les effets de la leptine, aux trois concentrations, sur la différenciation des cellules myométriales.

Notre hypothèse de travail est donc que la leptine pourrait interférer avec le processus de différenciation des cellules myométriales et ce de façon différente suivant la dose considérée. Ainsi, nous avons étudié les effets de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales associé ou non à un contexte inflammatoire. Pour cela, nous avons travaillé sur un modèle de co-culture entre

des lignées primaires humaines de cellules myométriales et de macrophages, stimulées par la leptine aux trois concentrations précédemment utilisées, 6.25, 25 et 50 ng/ml, concentrations plasmatiques observées chez les femmes de poids normal, présentant un surpoids ou une obésité respectivement en présence ou non de LPS.

Cette étude apporterait des éléments de réponse, afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses et ainsi de fournir un début de plausibilité biologique aux observations cliniques provenant de données épidémiologiques. De plus, ce travail permettrait de confirmer ou non le potentiel intérêt de la leptine en tant qu'agent tocolytique et de définir à quelle concentration la leptine pourrait être utilisée dans la prévention de la MAP.

II. Résultats article II

(1) Effet de la leptine sur la réorganisation des cellules myométriales humaines

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales dans un modèle de co-culture cellules myométriales/macrophages, stimulées par la leptine aux concentrations de 6.25, 25 et 50 ng/ml. Nous avons observé, grâce à des expériences d'immunofluorescence, que des concentrations fortes de leptine (25 et 50 ng/ml) sont capables d'induire une réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales (Figure 1A), se traduisant par un changement d'orientation des filaments d'actine. Des expériences similaires ont été réalisées dans un contexte inflammatoire, reproduit par le LPS. Nous avons tout d'abord mis en évidence que le LPS induit une réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales lorsque ces dernières sont cultivées en présence de macrophages, soulignant ainsi le rôle des macrophages dans le changement de statut phénotypique des cellules myométriales. En effet, une réorganisation incomplète du cytosquelette est observée lorsque les cellules myométriales cultivées seules sont stimulées par le LPS (Figure 1B). Nous avons de plus observé une réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales lorsque les co-cultures sont stimulées par la leptine à ces deux concentrations (25 et 50 ng/ml), en présence de LPS (Figure 1B).

Lorsque les co-cultures sont stimulées par la leptine à une concentration de 6.25ng/ml, aucune réorganisation du cytosquelette n'est observée (Figure 1A). On remarque de plus que la leptine à cette concentration est capable de s'opposer à l'effet du LPS sur la réorganisation du cytosquelette (Figure 1B).

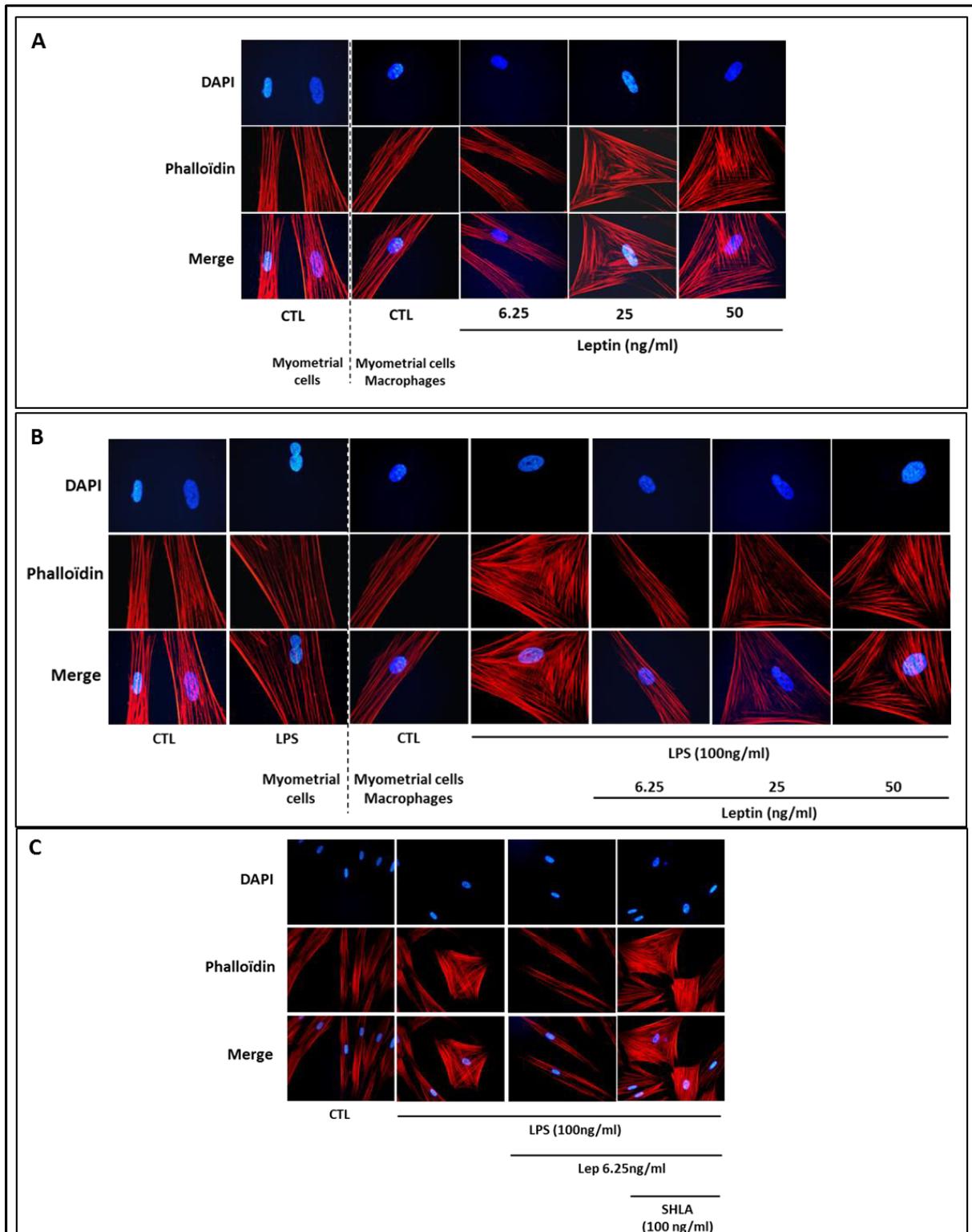


Figure 1: Cytoskeleton reorganization is induced by high leptin concentrations and prevented by leptin at 6.25 ng/ml prevents in human myometrial cells. Myometrial cells were co-cultured with macrophages and stimulated for 72 hours with leptin at 6.25, 25 and 50 ng/ml with (B, C) or without LPS (A) and in the presence (C) or absence (A, B) of SHLA. **A, B, C. Phalloidin.** Fixed cells were labeled with phalloidin and with DAPI for nuclear localization. Five representative pictures were taken with an epifluorescence microscope, in random chosen fields for each condition. Pictures were then analyzed and merged by using ImageJ software.

(2) Spécificité de l'effet de la leptine sur la réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales humaines

Nos premiers résultats ont mis en évidence que la leptine à 6.25 ng/ml a un effet antagoniste sur la réorganisation du cytosquelette induite par le LPS. Des expériences similaires réalisées en présence de l'antagoniste du récepteur à leptine (SHLA) ont mis en évidence que cet effet est spécifique d'une stimulation de OB-R par la leptine (Figure 1C). En effet, en présence de SHLA, l'effet est inversé, on observe ainsi une réorganisation du cytosquelette, en faveur d'un phénotype hypertrophique.

Afin de mettre en évidence si la leptine à fortes concentrations (25 et 50 ng/ml) induit une réorganisation du cytosquelette des cellules myométriales, *via* la stimulation spécifique du récepteur à la leptine OB-R, les co-cultures seront stimulées par la leptine à 25 et 50 ng/ml en présence de l'antagoniste spécifique du récepteur à la leptine (SHLA) ou d'un anticorps neutralisant du récepteur à l'IL-6 (Tocilizumab) (expériences en cours de réalisation).

(3) Effet de la leptine sur l'excitabilité des cellules myométriales humaines stimulées par l'ocytocine

Un facteur déterminant indispensable à la différenciation complète des cellules myométriales est l'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium. Des expériences d'imagerie calcique permettant de mettre en évidence l'influx calcique au sein des cellules myométriales ont alors été réalisées. Pour cela, les co-cultures ont été stimulées pendant 72 heures par la leptine aux trois concentrations étudiées, en présence ou non de LPS. Au cours de l'expérience d'imagerie calcique, les cellules ont été stimulées par l'ocytocine à une concentration de 100 ng/ml, permettant ainsi d'évaluer leur excitabilité.

Dans un premier temps, nous avons observé que le LPS induit un influx calcique dans les cellules myométriales, qu'elles soient cultivées seules ou en présence de macrophages, suite à une stimulation par l'ocytocine (Figure 2A). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules myométriales sont des cellules musculaires lisses dont la principale fonction est de se contracter en réponse à un stimulus. L'influx calcique est un facteur traduisant l'excitabilité des cellules myométriales. Cependant, les cellules myométriales seules stimulées par le LPS ne présentant pas une réorganisation complète du cytosquelette (Figure 1B), la différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie ne peut pas avoir lieu.

Lorsque les co-cultures ont été stimulées par la leptine aux trois concentrations, un influx calcique au sein des cellules myométriales est observé en réponse à l'ocytocine (Figures 2B, 2D, 2F). Des résultats similaires ont été obtenus en présence de LPS (Figures 2C, 2E, 2G) pour les différentes concentrations de leptine.

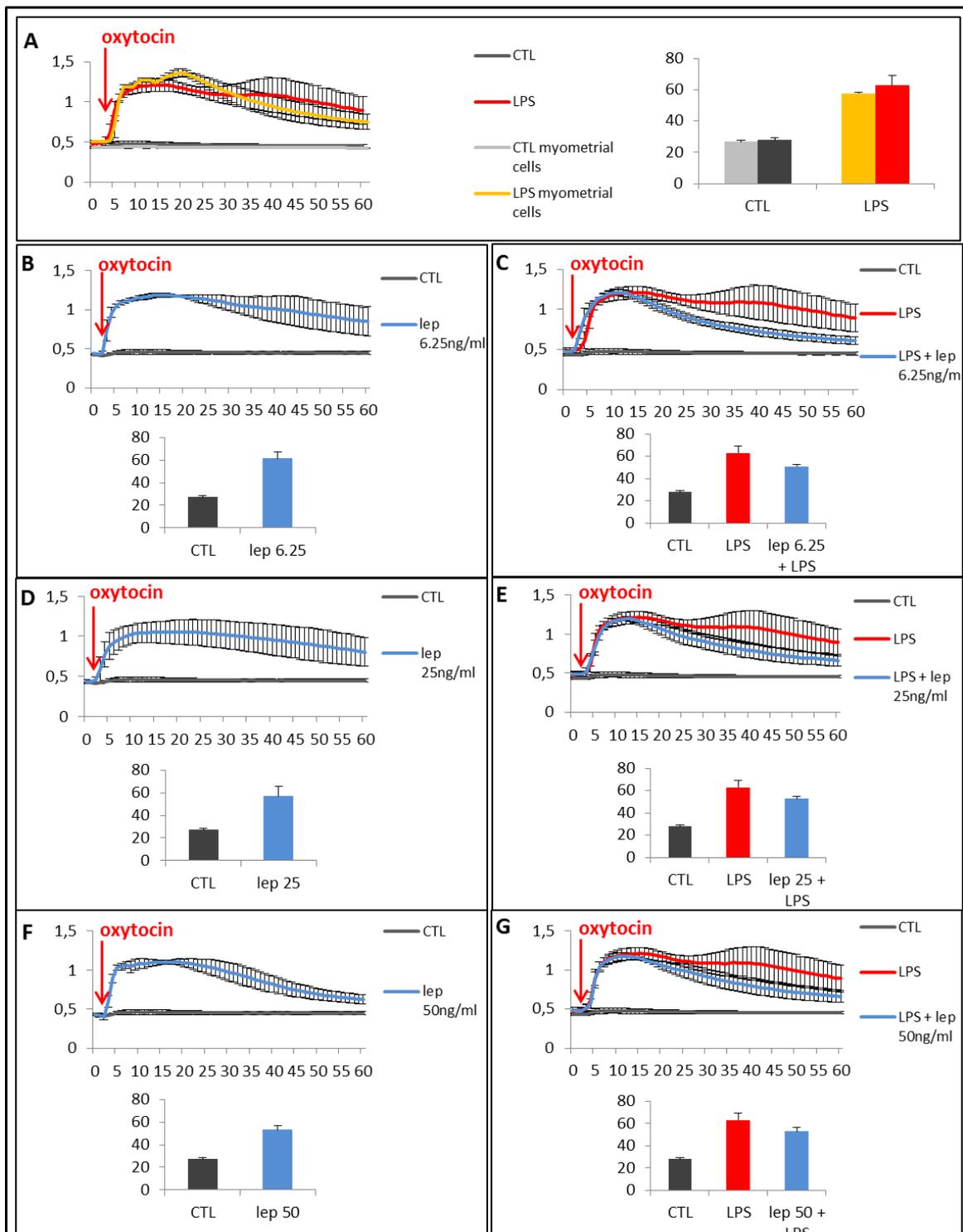


Figure 2: Leptin induces calcium influx in human myometrial cells stimulated by oxytocin. Myometrial cells were cultured alone (A) or co-cultured with macrophages in the presence (A, C, E, G) or absence (A, B, D, F) of LPS and stimulated for 72 hours with leptin at 6.25 ng/ml (B, C), 25 ng/ml (D, E) and 50 ng/ml (F, G).

(4) Spécificité de l'effet de la leptine sur l'excitabilité des cellules myométriales humaines

Afin de mettre en évidence la spécificité de l'effet de la leptine sur l'influx calcique au sein des cellules myométriales, des expériences similaires ont été réalisées en présence de l'antagoniste du récepteur à la leptine, le SHLA.

Une première expérience a montré que l'effet de la leptine aux concentrations de 25 et 50 ng/ml sur l'influx calcique au sein des cellules myométriales ne serait pas spécifique d'une stimulation du récepteur à la leptine (Figures 3C & 3E). Des expériences complémentaires seront alors réalisées en présence de l'anticorps neutralisant du récepteur à l'IL-6, le Tocilizumab, ou de SHLA, pour les trois concentrations de leptine afin de déterminer si l'effet de la leptine sur le signal calcique est spécifique d'une activation du récepteur à la leptine OB-R ou du récepteur à l'IL-6, IL-6R.

Nous avons de plus mis en évidence que cet effet sur l'influx calcique, en présence de LPS, est spécifique d'une stimulation du récepteur à la leptine pour la concentration de 6.25 ng/ml (Figure 3B), et non spécifique d'une stimulation de OB-R pour les concentrations de 25 et 50 ng/ml (Figure 3D & 3F). Afin de confirmer ces résultats, des expériences similaires, en présence de Tocilizumab, seront réalisées pour les trois concentrations, en présence de LPS. ces expériences permettront de vérifier si l'effet observé pour les concentrations de 25 et 50 ng/ml en présence de LPS est spécifique d'une stimulation du récepteur à l'IL-6, connu pour activer des voies de signalisation pro-inflammatoires telle que la voie de signalisation NFκB.

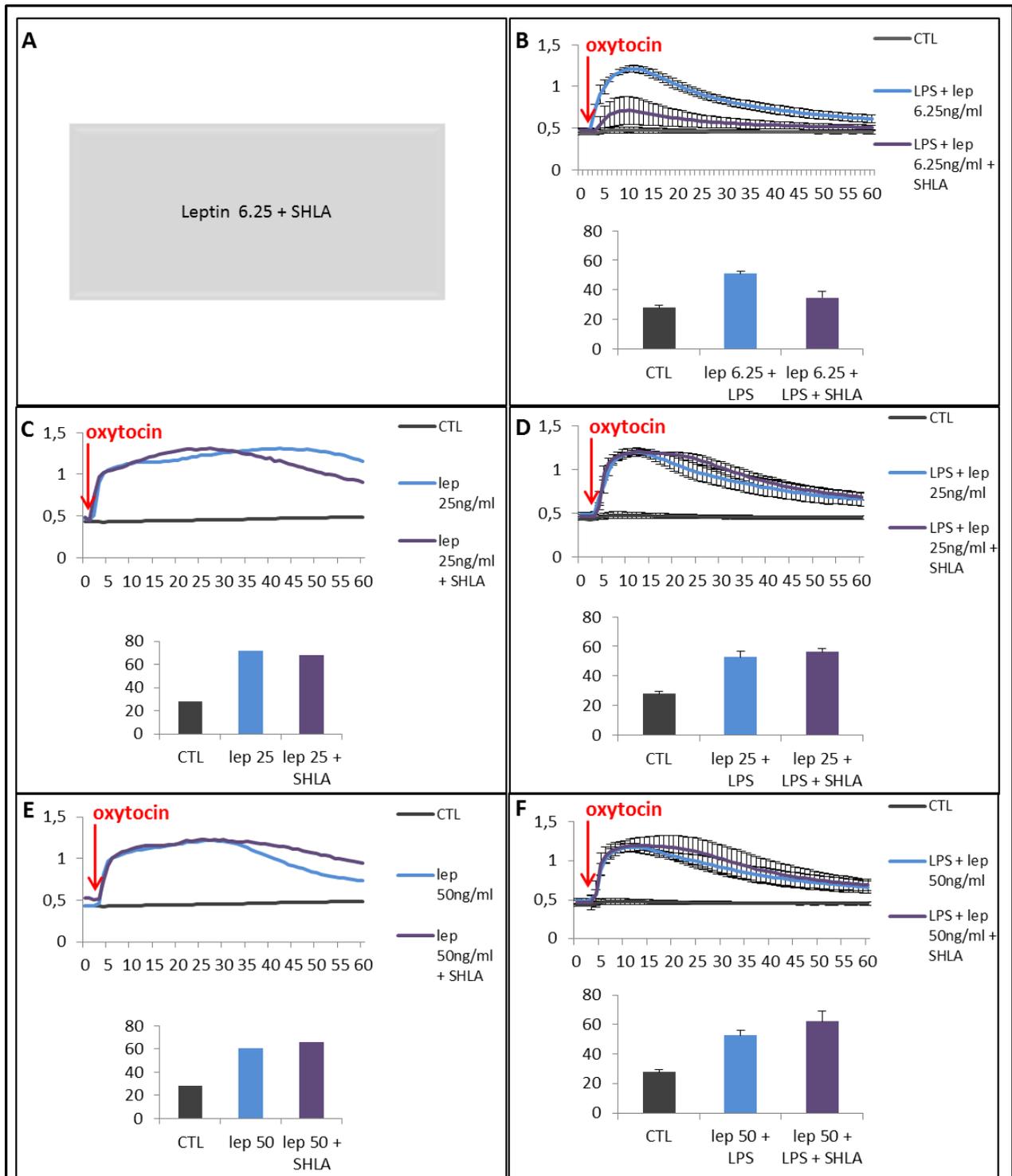
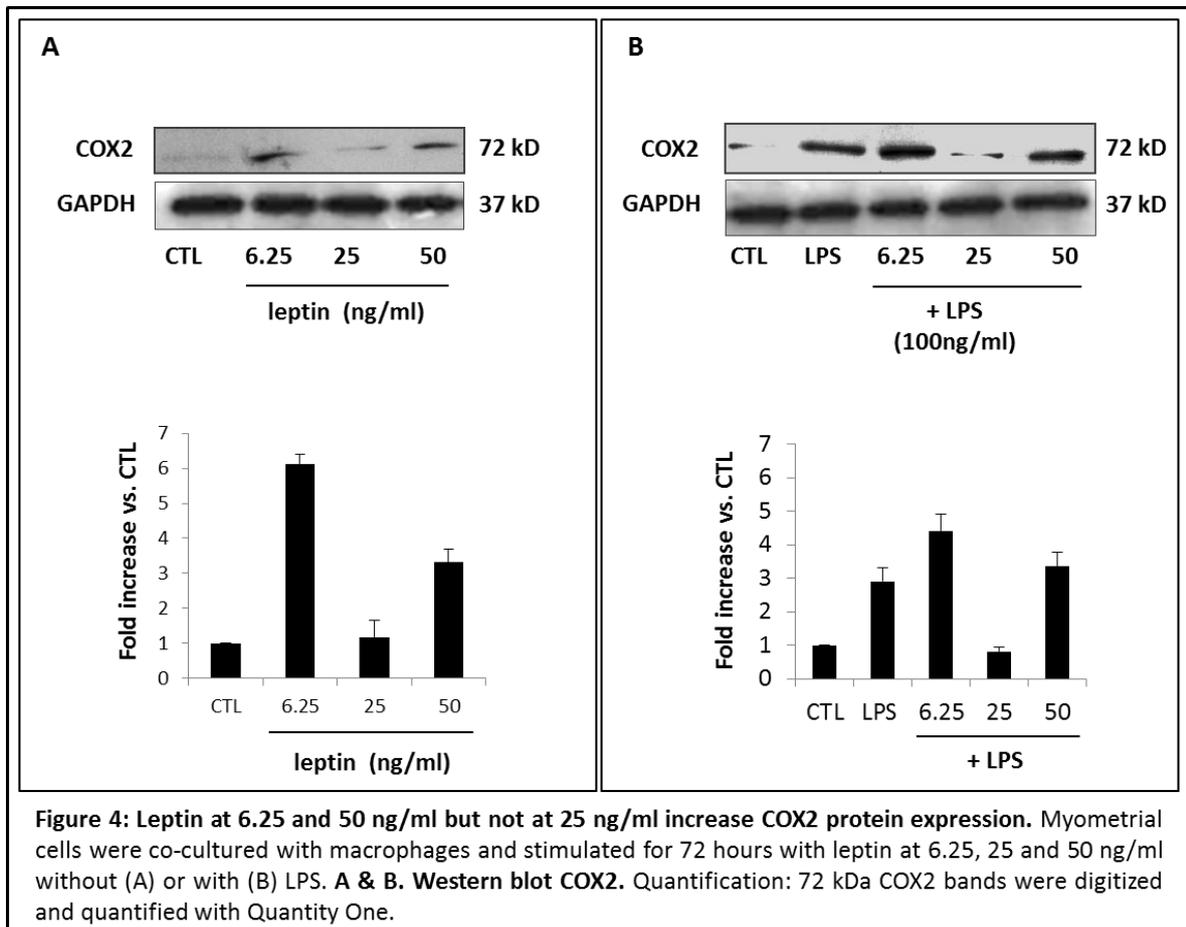


Figure 3: Leptin-induced calcium influx is selective of OB-R stimulation for leptin at 6.25 ng/ml not for 25 and 50 ng/ml. Myometrial cells were cultured co-cultured with macrophages with (B, D, F) or without (A, C, E) LPS and stimulated for 72 hours with leptin at 6.25 (A, B), 25 (C, D) and 50 ng/ml (E, F) in the presence of SHLA or Tocilizumab.

(5) Effet de la leptine sur la synthèse de médiateurs de la contraction

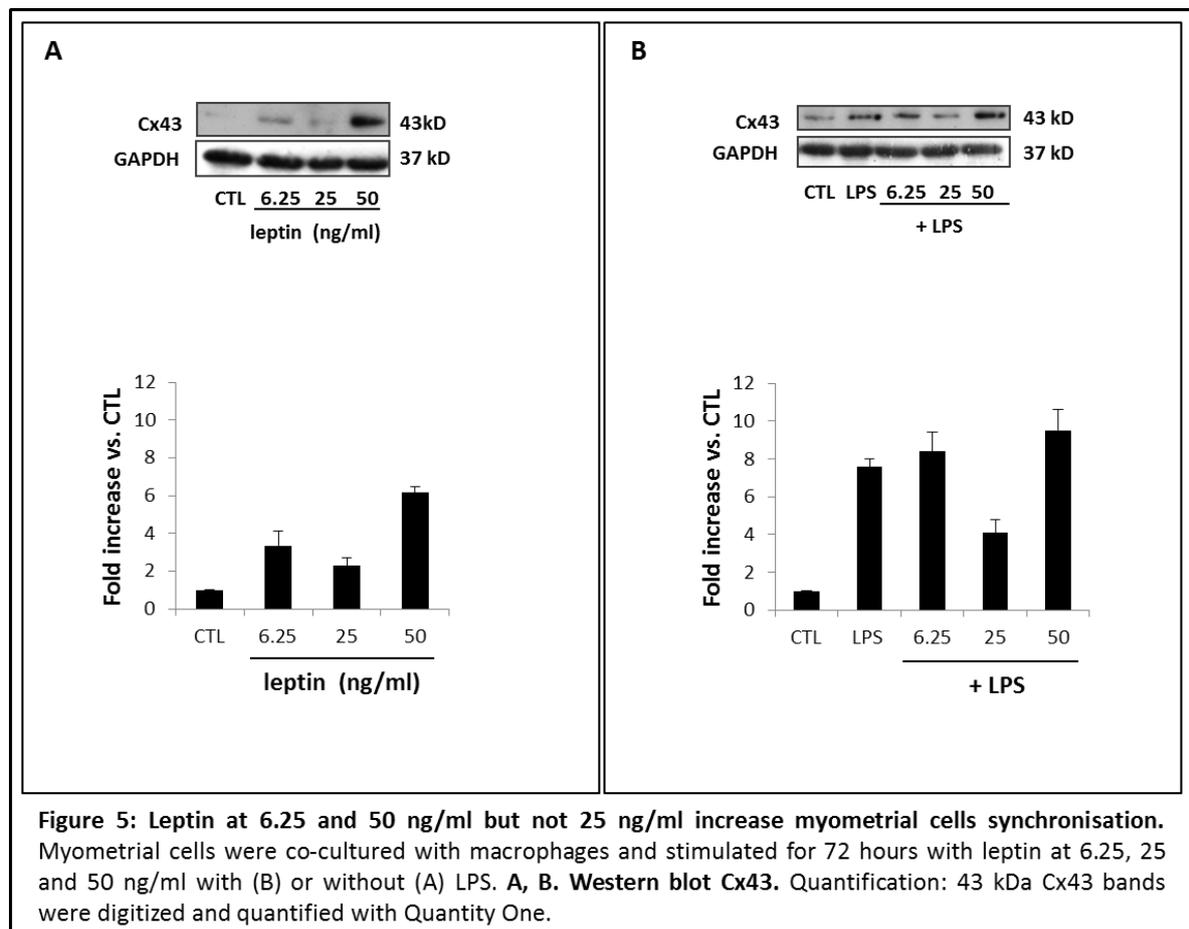
Parallèlement à une réorganisation du cytosquelette, une synthèse des médiateurs de la contraction a été mise en évidence lors de cette transition en phase d'hypertrophie. L'effet de la leptine sur l'expression de la protéine COX2 a donc été évalué par western blot, à partir des co-cultures cellules myométriales/macrophages stimulées par la leptine, en présence ou non de LPS.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation de l'expression protéique de COX2 lorsque les cellules sont stimulées par la leptine aux concentrations de 6.25 et 50 ng/ml (Figure 4A). Des résultats similaires ont été observés lorsque les stimulations ont été réalisées en présence de LPS (Figure 4B). Lorsque la leptine a été utilisée à une concentration de 25 ng/ml, aucune augmentation n'a été observée (Figures 4A & 4B).



(6) Effet de la leptine sur la synchronisation des cellules myométriales humaines

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synchronisation des cellules myométriales, un événement essentiel pour l'obtention de contractions myométriales efficaces. Nous avons ainsi mis en évidence par western blot une augmentation de l'expression de la protéine Cx43, après stimulation par la leptine aux concentrations de 6.25 et 50 ng/ml en présence ou non de LPS (Figure 5A & 5B). Aucune variation n'a été observée pour la concentration de 25 ng/ml. Des expériences d'immunofluorescence (marquage Lucifer Yellow) seront également réalisées afin de visualiser l'ouverture des jonctions GAPs et donc la synchronisation des cellules myométriales, suite à une stimulation par l'ocytocine. Ces expériences seront également réalisées en présence de SHLA ou de Tocilizumab afin de mettre en évidence la spécificité de l'effet observé pour chaque concentration de leptine.



(7) Effet de la leptine sur la contraction des cellules myométriales humaines

Une réorganisation du cytosquelette, une excitabilité cellulaire ainsi qu'une synthèse des médiateurs de la contraction et une synchronisation parfaite des cellules sont des étapes indispensables à la genèse de contractions myométriales efficaces.

Ainsi, afin de vérifier si les cellules myométriales différenciées ont récupéré leur propriété contractile et sont capables de se contracter efficacement après différenciation, des tests fonctionnels sur matrice de collagène seront réalisés. Les expériences seront réalisées sur les co-cultures cellules myométriales/macrophages stimulées par la leptine aux trois concentrations, en présence ou non de LPS. Parallèlement, ces expériences seront réalisées en présence de SHLA ou de Tocilizumab, permettant de caractériser la spécificité de l'effet observé. La mise au point de ce test est en cours.

III. Conclusion article II

Nous avons mis en évidence, dans cette étude préliminaire, des effets différents de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales, selon la concentration utilisée, comme précédemment décrit pour les résultats portant sur la prolifération cellulaire. En effet, nous avons mis en évidence que la leptine à une concentration de 6.25 ng/ml est capable de maintenir les cellules myométriales dans un état prolifératif *via* la stimulation spécifique de la voie OB-R/ERK1/2, alors que la leptine à 50 ng/ml est également capable d'induire une prolifération cellulaire, tout en induisant une réponse inflammatoire *via* la stimulation spécifique de la voie IL-6R/NFκB.

Nous avons donc démontré dans un premier temps que la leptine à faible concentration (6.25 ng/ml) est capable d'induire une augmentation de l'expression de médiateurs de la contraction (COX2) et de la synchronisation (Cx43) ainsi qu'un influx calcique au sein des cellules myométriales, en présence ou non de LPS. Néanmoins, à cette concentration, la leptine n'induit pas une réorganisation du cytosquelette et s'oppose même à la réorganisation induite par le LPS, en stimulant spécifiquement son récepteur OB-R. Ainsi, même si la leptine à 6.25 ng/ml induit une excitabilité et une synchronisation des cellules myométriales, l'absence de réarrangement du cytosquelette souligne une différenciation incomplète, avec un effet global en faveur d'un effet tocolytique. Néanmoins un test fonctionnel sur matrice de collagène nous permettra de confirmer ces résultats.

Pour les concentrations plus fortes de leptine (25 et 50 ng/ml), des effets différents ont été observés. En effet, la leptine à 25 ng/ml ne semble pas induire les différentes étapes indispensables aux contractions myométriales, contrairement à la leptine à 50 ng/ml. En effet, à 25 ng/ml, la leptine induit une réorganisation du cytosquelette ainsi qu'un influx calcique au sein des cellules myométriales mais n'induit aucune augmentation de l'expression des protéines COX2 et Cx43. La différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie semble donc impossible.

En revanche, avec une concentration de 50 ng/ml, la leptine induit une réorganisation du cytosquelette, une synthèse de COX2, médiateur de la contraction, et la protéine Cx43, impliquée dans la synchronisation des cellules, ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique, en faveur d'une différenciation complète des cellules myométriales vers un phénotype contractile.

Ces résultats préliminaires semblent fournir un début de plausibilité biologique aux observations cliniques provenant de données épidémiologiques concernant les différents troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses. Néanmoins des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations. L'utilisation du test à la « lucifer yellow » permettrait ainsi de mieux caractériser le phénomène de synchronisation des cellules myométriales

et des tests sur matrice de collagène permettraient de confirmer la capacité des cellules myométriales différenciées, partiellement ou totalement, à se contracter de façon efficace. En effet, seul le test fonctionnel sur matrice de collagène nous permettrait de conclure quant à l'effet de la leptine sur la différenciation des cellules myométriales et ainsi d'expliquer les disparités observées chez les femmes présentant un surpoids, ou une obésité de grade I, II ou III.

CONCLUSION GENERALE

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés au potentiel effet de la leptine sur la prolifération et la différenciation des cellules myométriales humaines afin d'évaluer le potentiel intérêt de la leptine dans la prise en charge de la MAP.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la leptine est capable d'induire une prolifération des cellules myométriales, associée ou non à l'induction d'une signalisation pro-inflammatoire. En effet, la première partie de ce travail portant sur la prolifération des cellules myométriales nous a permis de mettre en évidence que la leptine à 50 ng/ml est capable d'activer la voie de signalisation pro-inflammatoire IL-6R/NFκB, décrite pour jouer un rôle dans la mise en route du travail alors que la leptine à 6.25 ng/ml stimule la voie de signalisation OB-R/ERK1/2, en faveur de la prolifération cellulaire et donc du maintien de la quiescence contractile utérine.

Dans un second temps, nos résultats préliminaires sur la différenciation des cellules myométriales ont suggéré que la leptine à 6.25 ng/ml est capable de s'opposer à cette transition en phase d'hypertrophie alors que la leptine à 50 ng/ml induirait une réorganisation du cytosquelette, une synthèse des protéines COX2 et Cx43, ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique, différentes étapes indispensables à la genèse de contractions myométriales efficaces.

Ces résultats ont ainsi mis en évidence des effets opposés de la leptine sur les mécanismes cellulaires de l'accouchement, selon la dose utilisée. Lorsque la leptine est utilisée à forte concentration (50 ng/ml), une perte de sélectivité de son récepteur est observée, en faveur du récepteur à l'IL-6, récepteur couplé à des voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans de la mise en route du travail. De plus, la leptine à 50 ng/ml semble capable d'induire une différenciation des cellules myométriales vers un phénotype contractile. A l'inverse, la leptine à

faible concentration (6.25 ng/ml) induit une prolifération des cellules myométriales et s'opposent à leur différenciation. Ces résultats renforcent le potentiel rôle de la leptine, à une concentration de 6.25 ng/ml dans la prévention de la MAP, en maintenant l'utérus dans un état de quiescence contractile, par induction de la prolifération des cellules myométriales et prévention de la différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie. Cependant, cette concentration (6.25 ng/ml) étant une concentration physiologique retrouvée chez tous les sujets, il semble que la leptine ne soit pas un bon candidat en tant qu'agent tocolytique dans la prévention de la MAP.

Ces résultats suggèrent également que l'hyperleptinémie observée chez les femmes obèses pourrait être directement impliquée dans les troubles de l'accouchement observés chez ces femmes, *via* une perturbation des mécanismes cellulaires indispensables à la mise en place d'un phénotype contractile. En effet, la leptine à 50 ng/ml, concentration retrouvée chez les femmes obèses, est capable d'activer la voie pro-inflammatoire IL-6R/NFκB impliquée dans la mise en route du travail, et d'induire une différenciation complète (hypertrophie, excitabilité, synchronisation) des cellules myométriales. Ces résultats fournissent ainsi une plausibilité biologique aux observations cliniques mettant en évidence une association entre obésité et troubles de l'accouchement, soulignant notamment un rôle direct de la leptine dans la survenue d'un accouchement prématuré chez la femme obèse.

PERSPECTIVES

Une des perspectives à court terme est de finaliser le second travail portant sur les effets de la leptine sur la transition des cellules myométriales en phase d'hypertrophie. Nos résultats préliminaires ont mis en évidence que la leptine, selon la dose utilisée, serait capable d'induire (leptine à 50 ng/ml) ou de s'opposer (6.25 et 25 ng/ml) à la différenciation des cellules myométriales. Il serait alors intéressant de continuer ce travail afin de confirmer cette hypothèse. Pour cela, des tests fonctionnels permettant d'évaluer la synchronisation des cellules (Lucifer Yellow) et la capacité des cellules myométriales différenciées à se contracter (Matrice de collagène), seront réalisés sur des co-cultures stimulées par la leptine aux trois concentrations étudiées en présence ou non de LPS. Les différentes expériences seront également effectuées en présence de l'antagoniste du récepteur à la leptine, le SHLA, ou en présence de l'anticorps neutralisant du récepteur à l'IL-6, le Tocilizumab, dans le but de mettre en évidence la voie impliquée dans ce phénomène. En effet, notre première étude ayant mis en évidence une association entre des concentrations élevées de leptine et une activation du récepteur à l'IL-6, il serait alors intéressant d'évaluer si la différenciation cellulaire induite par la leptine à 50 ng/ml est spécifique d'une stimulation du récepteur à l'IL-6, jouant un rôle important dans l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires et donc dans la mise en route du travail. Nos premiers résultats démontrant des effets différents de la leptine selon la dose utilisée, cette étude permettrait une meilleure compréhension des troubles de l'accouchement observés chez les femmes en surpoids et obèses (accouchements prématurés ou dépassement de terme).

Après avoir investigué les effets de la leptine au niveau de la sphère utéro-placentaire, il serait également intéressant, aux vues des effets inflammatoires, d'étudier ses effets sur les capacités d'activation et de migration des monocytes circulants.

En effet, il est clairement établi chez l'homme que la mise en route du travail est associée à une réaction inflammatoire au niveau des tissus gestationnels déclenchée d'une part par l'infiltration massive de leucocytes au niveau de la sphère utéroplacentaire [49, 91], et d'autre part par une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, principalement secrétées par les lymphocytes ayant infiltrés ces tissus [100]. Ainsi, il a été mis en évidence que la mise en route du travail nécessite une prolifération et une activation des monocytes circulants maternels [100], qui vont ensuite migrer vers les tissus gestationnels, y adhérer, les infiltrer et sécréter des cytokines pro-inflammatoires [49, 107]. De plus, des études indiquent une altération des fonctions des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) chez les sujets obèses [354-355]. En effet, la sécrétion de MCP1 et d'IFN γ en réponse à une stimulation par différents agonistes est diminuée de près de 90% chez les sujets obèses comparativement à des sujets de poids normal [354]. De façon similaire et complémentaire, une étude récente réalisée chez des femmes souffrant d'obésité morbide a montré une réduction de la sécrétion d'IL-6, de TNF α et d'IFN γ par rapport à des femmes de poids normal [355]. Enfin, une étude a également mis en évidence une altération des fonctions des PBMC chez des femmes enceintes obèses au deuxième trimestre de grossesse [356].

L'activation périphérique et la migration myométriale des monocytes maternels apparaissant donc comme étant une étape clé dans la mise en route du travail, notre hypothèse physiopathologique est que l'altération des capacités d'activation et de migration des monocytes circulants maternels par la leptine, pourrait être associée aux perturbations du travail observées chez les femmes obèses. L'objectif de cette étude est donc de déterminer si la leptine est capable d'interférer avec les capacités d'activation et de migration des monocytes circulants dans le but d'apporter des arguments supplémentaires en faveur d'un rôle direct de la leptine dans les troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses. Pour cela, les expériences seront réalisées sur des PBMC extraits de Buffy Coat, puis stimulés ou non par la leptine aux trois concentrations précédemment utilisées (6.25, 25 et 50 ng/ml). L'évaluation des capacités d'activation des

monocytes circulants sera appréciée *via* leur sécrétion d'IL-6, d'IL-1 β , de TNF α et de MCP-1. Leur capacité de migration sera évaluée au sein d'une chambre chimiotactique en réponse à un agent de synthèse. De plus, afin de déterminer si la leptine seule est capable d'interférer avec les mécanismes de l'accouchement ou si ces altérations sont dues à une composante systémique globale, les PBMC extraits de Buffy Coat seront également stimulés par le sérum issu de prélèvements sanguins, réalisés au moment de l'accouchement, chez des femmes de poids normal (témoin négatif) et présentant une obésité pré-conceptionnelle (témoin positif).

La mise en évidence de telles altérations dans le sang maternel pourrait aider à mieux comprendre les différents troubles de l'accouchement observés chez les femmes obèses, selon les différents grades de l'obésité, et confirmerait le rôle de la leptine dans ces troubles. Ainsi, la leptine jouerait un rôle au niveau des cellules myométriales, en induisant l'activation de voie de signalisation pro-inflammatoire et une différenciation des cellules myométriales en phase d'hypertrophie, mais également au niveau périphérique, en altérant les capacités d'activation et de migration des monocytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Blencowe, H., Cousens S., Chou D., Oestergaard M., Say L., *et coll.*, 2013. *Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births*. *Reprod Health*, 10 Suppl 1: p. S2.
- [2] Goldenberg, R.L., Culhane J.F., Iams J.D., and Romero R., 2008. *Epidemiology and causes of preterm birth*. *Lancet*, 371(9606): p. 75-84.
- [3] Beck, S., Wojdyla D., Say L., Betran A.P., Merialdi M., *et coll.*, 2010. *The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity*. *Bull World Health Organ*, 88(1): p. 31-8.
- [4] Martin, J.A., Hamilton B.E., Ventura S.J., Osterman M.J., and Mathews T.J., 2013. *Births: final data for 2011*. *Natl Vital Stat Rep*, 62(1): p. 1-69, 72.
- [5] Ancel, P.Y. and Goffinet F., 2014. *EPIPAGE 2: a preterm birth cohort in France in 2011*. *BMC Pediatr*, 14: p. 97.
- [6] Di Renzo, G.C. and Roura L.C., 2006. *Guidelines for the management of spontaneous preterm labor*. *J Perinat Med*, 34(5): p. 359-66.
- [7] Moore KL, D.A., *Anatomie médicale. Aspects fondamentaux et applications cliniques*. 2001: de Boeck.
- [8] Tucker-Blackburn, S., *Maternal, Fetal and Neonatal Physiology: A clinical perspective*. Fourth edition ed. 2013: Elsevier.
- [9] Mehats, C., Schmitz T., Marcellin L., and Breuiller-Fouche M., 2011. *[Biochemistry of fetal membranes rupture]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 39(6): p. 365-9.
- [10] Smith, R., 2007. *Parturition*. *N Engl J Med*, 356(3): p. 271-83.
- [11] Romero, R., Gomez R., Chaiworapongsa T., Conoscenti G., Kim J.C., *et coll.*, 2001. *The role of infection in preterm labour and delivery*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 15 Suppl 2: p. 41-56.
- [12] Ancel, P.Y., 2002. *[Preterm labor: pathophysiology, risk factors and outcomes]*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 31(7 Suppl): p. 5S10-21.
- [13] Galinsky, R., Polglase G.R., Hooper S.B., Black M.J., and Moss T.J., 2013. *The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development*. *J Pregnancy*, 2013: p. 412831.
- [14] Lee, J., Kim J.S., Park J.W., Park C.W., Park J.S., *et coll.*, 2013. *Chronic chorioamnionitis is the most common placental lesion in late preterm birth*. *Placenta*, 34(8): p. 681-9.
- [15] Goldenberg, R.L., Hauth J.C., and Andrews W.W., 2000. *Intrauterine infection and preterm delivery*. *N Engl J Med*, 342(20): p. 1500-7.
- [16] Mueller-Heubach, E., Rubinstein D.N., and Schwarz S.S., 1990. *Histologic chorioamnionitis and preterm delivery in different patient populations*. *Obstet Gynecol*, 75(4): p. 622-6.
- [17] Czik, M.J., McCarthy F.P., and Murphy K.E., 2011. *Chorioamnionitis: from pathogenesis to treatment*. *Clin Microbiol Infect*, 17(9): p. 1304-11.
- [18] Kallapur, S.G., Presicce P., Rueda C.M., Jobe A.H., and Chouhnet C.A., 2014. *Fetal immune response to chorioamnionitis*. *Semin Reprod Med*, 32(1): p. 56-67.
- [19] Romero, R., Espinoza J., Kusanovic J.P., Gotsch F., Hassan S., *et coll.*, 2006. *The preterm parturition syndrome*. *BJOG*, 113 Suppl 3: p. 17-42.
- [20] Accoceberry, M., Carbonnier M., Boeuf B., Ughetto S., Sapin V., *et coll.*, 2005. *[Neonatal morbidity after conservative management followed by systematic delivery at thirty-four weeks of gestation in preterm rupture of membranes]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 33(9): p. 577-81.
- [21] Pasquier, J.C. and Doret M., 2008. *[Fetal membranes: embryological development, structure and the physiopathology of the preterm premature rupture of membranes]*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 37(6): p. 579-88.
- [22] 2011. *Association between stillbirth and risk factors known at pregnancy confirmation*. *JAMA*, 306(22): p. 2469-79.

- [23] McManemy, J., Cooke E., Amon E., and Leet T., 2007. *Recurrence risk for preterm delivery*. Am J Obstet Gynecol, 196(6): p. 576 e1-6; discussion 576 e6-7.
- [24] Schempff, A.H., Branum A.M., Lukacs S.L., and Schoendorf K.C., 2007. *Maternal age and parity-associated risks of preterm birth: differences by race/ethnicity*. Paediatr Perinat Epidemiol, 21(1): p. 34-43.
- [25] Torloni, M.R., Betran A.P., Daher S., Widmer M., Dolan S.M., et coll., 2009. *Maternal BMI and preterm birth: a systematic review of the literature with meta-analysis*. J Matern Fetal Neonatal Med, 22(11): p. 957-70.
- [26] McDonald, S.D., Han Z., Mulla S., and Beyene J., 2010. *Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses*. BMJ, 341: p. c3428.
- [27] Khatibi, A., Brantsaeter A.L., Sengpiel V., Kacerovsky M., Magnus P., et coll., 2012. *Prepregnancy maternal body mass index and preterm delivery*. Am J Obstet Gynecol, 207(3): p. 212 e1-7.
- [28] Hendler, I., Goldenberg R.L., Mercer B.M., Iams J.D., Meis P.J., et coll., 2005. *The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth*. Am J Obstet Gynecol, 192(3): p. 882-6.
- [29] Ehrenberg, H.M., Dierker L., Milluzzi C., and Mercer B.M., 2003. *Low maternal weight, failure to thrive in pregnancy, and adverse pregnancy outcomes*. Am J Obstet Gynecol, 189(6): p. 1726-30.
- [30] Mercer, B.M., Goldenberg R.L., Moawad A.H., Meis P.J., Iams J.D., et coll., 1999. *The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome*. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Am J Obstet Gynecol, 181(5 Pt 1): p. 1216-21.
- [31] Shelley, J., 2014. *Spacing babies*. BMJ, 349: p. g4717.
- [32] Nerlander, L.M., Callaghan W.M., Smith R.A., and Barfield W.D., 2014. *Short Interpregnancy Interval Associated with Preterm Birth in US Adolescents*. Matern Child Health J.
- [33] Northway, W.H., Jr., Moss R.B., Carlisle K.B., Parker B.R., Popp R.L., et coll., 1990. *Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia*. N Engl J Med, 323(26): p. 1793-9.
- [34] Marret, S., Zupan V., Gressens P., Lagercrantz H., and Evrard P., 1998. *[Periventricular leukomalacia. I. Histological and pathophysiological aspects]*. Arch Pediatr, 5(5): p. 525-37.
- [35] Topp, M., Langhoff-Roos J., and Uldall P., 1997. *Preterm birth and cerebral palsy. Predictive value of pregnancy complications, mode of delivery, and Apgar scores*. Acta Obstet Gynecol Scand, 76(9): p. 843-8.
- [36] Haas, D.M., Caldwell D.M., Kirkpatrick P., McIntosh J.J., and Welton N.J., 2012. *Tocolytic therapy for preterm delivery: systematic review and network meta-analysis*. BMJ, 345: p. e6226.
- [37] Naik Gaunekar, N., Raman P., Bain E., and Crowther C.A., 2013. *Maintenance therapy with calcium channel blockers for preventing preterm birth after threatened preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, 10: p. CD004071.
- [38] Haas, D.M., Benjamin T., Sawyer R., and Quinney S.K., 2014. *Short-term tocolytics for preterm delivery - current perspectives*. Int J Womens Health, 6: p. 343-9.
- [39] King, J.F., Flenady V.J., Papatsonis D.N., Dekker G.A., and Carbonne B., 2003. *Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, (1): p. CD002255.
- [40] Conde-Agudelo, A., Romero R., and Kusanovic J.P., 2011. *Nifedipine in the management of preterm labor: a systematic review and metaanalysis*. Am J Obstet Gynecol, 204(2): p. 134 e1-20.
- [41] Neilson, J.P., West H.M., and Dowswell T., 2014. *Betamimetics for inhibiting preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, 2: p. CD004352.
- [42] Papatsonis, D.N., Flenady V., and Liley H.G., 2013. *Maintenance therapy with oxytocin antagonists for inhibiting preterm birth after threatened preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, 10: p. CD005938.

- [43] Crowther, C.A., Brown J., McKinlay C.J., and Middleton P., 2014. *Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, 8: p. CD001060.
- [44] Romero, R., Dey S.K., and Fisher S.J., 2014. *Preterm labor: one syndrome, many causes*. Science, 345(6198): p. 760-5.
- [45] Menon, R. and Fortunato S.J., 2004. *The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes*. J Soc Gynecol Investig, 11(7): p. 427-37.
- [46] Cockle, J.V., Gopichandran N., Walker J.J., Levene M.I., and Orsi N.M., 2007. *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications*. Reprod Sci, 14(7): p. 629-45.
- [47] Vadillo-Ortega, F. and Estrada-Gutierrez G., 2005. *Role of matrix metalloproteinases in preterm labour*. BJOG, 112 Suppl 1: p. 19-22.
- [48] Athayde, N., Edwin S.S., Romero R., Gomez R., Maymon E., et coll., 1998. *A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol, 179(5): p. 1248-53.
- [49] Osman, I., Young A., Ledingham M.A., Thomson A.J., Jordan F., et coll., 2003. *Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term*. Mol Hum Reprod, 9(1): p. 41-5.
- [50] Challis, J.R., Lockwood C.J., Myatt L., Norman J.E., Strauss J.F., 3rd, et coll., 2009. *Inflammation and pregnancy*. Reprod Sci, 16(2): p. 206-15.
- [51] Choi, S.J., Jung K.L., Oh S.Y., Kim J.H., and Roh C.R., 2009. *Cervicovaginal matrix metalloproteinase-9 and cervical ripening in human term parturition*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 142(1): p. 43-7.
- [52] Stygar, D., Wang H., Vladic Y.S., Ekman G., Eriksson H., et coll., 2002. *Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix*. Biol Reprod, 67(3): p. 889-94.
- [53] Zakar, T. and Hertelendy F., 2007. *Progesterone withdrawal: key to parturition*. Am J Obstet Gynecol, 196(4): p. 289-96.
- [54] Golightly, E., Jabbour H.N., and Norman J.E., 2011. *Endocrine immune interactions in human parturition*. Mol Cell Endocrinol, 335(1): p. 52-9.
- [55] Mesiano, S. and Welsh T.N., 2007. *Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition*. Semin Cell Dev Biol, 18(3): p. 321-31.
- [56] Kamel, R.M., 2010. *The onset of human parturition*. Arch Gynecol Obstet, 281(6): p. 975-82.
- [57] Mitchell, M.D., Romero R.J., Edwin S.S., and Trautman M.S., 1995. *Prostaglandins and parturition*. Reprod Fertil Dev, 7(3): p. 623-32.
- [58] Olson, D.M., Mijovic J.E., and Sadowsky D.W., 1995. *Control of human parturition*. Semin Perinatol, 19(1): p. 52-63.
- [59] Wathes, D.C., Borwick S.C., Timmons P.M., Leung S.T., and Thornton S., 1999. *Oxytocin receptor expression in human term and preterm gestational tissues prior to and following the onset of labour*. J Endocrinol, 161(1): p. 143-51.
- [60] Blanks, A.M. and Thornton S., 2003. *The role of oxytocin in parturition*. BJOG, 110 Suppl 20: p. 46-51.
- [61] Molnar, M., Rigo J., Jr., Romero R., and Hertelendy F., 1999. *Oxytocin activates mitogen-activated protein kinase and up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human myometrial cells*. Am J Obstet Gynecol, 181(1): p. 42-9.
- [62] Aguilar, H.N. and Mitchell B.F., 2010. *Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility*. Hum Reprod Update, 16(6): p. 725-44.
- [63] Yu, J.T. and Lopez Bernal A., 1998. *The cytoskeleton of human myometrial cells*. J Reprod Fertil, 112(1): p. 185-98.
- [64] Wang, R., Li Q., and Tang D.D., 2006. *Role of vimentin in smooth muscle force development*. Am J Physiol Cell Physiol, 291(3): p. C483-9.

- [65] Taggart, M.J. and Morgan K.G., 2007. *Regulation of the uterine contractile apparatus and cytoskeleton*. Semin Cell Dev Biol, 18(3): p. 296-304.
- [66] Draeger, A., Amos W.B., Ikebe M., and Small J.V., 1990. *The cytoskeletal and contractile apparatus of smooth muscle: contraction bands and segmentation of the contractile elements*. J Cell Biol, 111(6 Pt 1): p. 2463-73.
- [67] Gunst, S.J. and Zhang W., 2008. *Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction*. Am J Physiol Cell Physiol, 295(3): p. C576-87.
- [68] Riley, M., Baker P.N., Tribe R.M., and Taggart M.J., 2005. *Expression of scaffolding, signalling and contractile-filament proteins in human myometria: effects of pregnancy and labour*. J Cell Mol Med, 9(1): p. 122-34.
- [69] Shynlova, O., Tsui P., Dorogin A., Chow M., and Lye S.J., 2005. *Expression and localization of alpha-smooth muscle and gamma-actins in the pregnant rat myometrium*. Biol Reprod, 73(4): p. 773-80.
- [70] Wray, S., 2007. *Insights into the uterus*. Exp Physiol, 92(4): p. 621-31.
- [71] Mitchell, B.F., Aguilar H.N., Mosher A., Wood S., and Slater D.M., 2013. *The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth*. Facts Views Vis Obgyn, 5(1): p. 72-81.
- [72] Luckas, M.J., Taggart M.J., and Wray S., 1999. *Intracellular calcium stores and agonist-induced contractions in isolated human myometrium*. Am J Obstet Gynecol, 181(2): p. 468-76.
- [73] Wray, S., Jones K., Kupittayanant S., Li Y., Matthew A., et coll., 2003. *Calcium signaling and uterine contractility*. J Soc Gynecol Investig, 10(5): p. 252-64.
- [74] Aguilar, H.N., Zielnik B., Tracey C.N., and Mitchell B.F., 2010. *Quantification of rapid Myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput in-cell Western assays: comparison to Western immunoblots*. PLoS One, 5(4): p. e9965.
- [75] Taggart, M.J., Menice C.B., Morgan K.G., and Wray S., 1997. *Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca²⁺, phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle*. J Physiol, 499 (Pt 2): p. 485-96.
- [76] Oh, J.H., You S.K., Hwang M.K., Ahn D.S., Kwon S.C., et coll., 2003. *Inhibition of rho-associated kinase reduces MLC20 phosphorylation and contractility of intact myometrium and attenuates agonist-induced Ca²⁺ sensitization of force of permeabilized rat myometrium*. J Vet Med Sci, 65(1): p. 43-50.
- [77] Word, R.A., Stull J.T., Casey M.L., and Kamm K.E., 1993. *Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women*. J Clin Invest, 92(1): p. 29-37.
- [78] Word, R.A., Tang D.C., and Kamm K.E., 1994. *Activation properties of myosin light chain kinase during contraction/relaxation cycles of tonic and phasic smooth muscles*. J Biol Chem, 269(34): p. 21596-602.
- [79] Lopez Bernal, A., 2003. *Mechanisms of labour--biochemical aspects*. BJOG, 110 Suppl 20: p. 39-45.
- [80] Buhimschi, I., Yallampalli C., Dong Y.L., and Garfield R.E., 1995. *Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 172(5): p. 1577-84.
- [81] Morgan, K.G. and Gangopadhyay S.S., 2001. *Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins*. J Appl Physiol (1985), 91(2): p. 953-62.
- [82] Kordowska, J., Hetrick T., Adam L.P., and Wang C.L., 2006. *Phosphorylated I-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading*. Exp Cell Res, 312(2): p. 95-110.
- [83] Morgan, K.G., 2014. *The importance of the smooth muscle cytoskeleton to preterm labour*. Exp Physiol, 99(3): p. 525-9.
- [84] Li, Y., Je H.D., Malek S., and Morgan K.G., 2003. *ERK1/2-mediated phosphorylation of myometrial caldesmon during pregnancy and labor*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 284(1): p. R192-9.

- [85] Li, Y., Reznichenko M., Tribe R.M., Hess P.E., Taggart M., *et coll.*, 2009. *Stretch activates human myometrium via ERK, caldesmon and focal adhesion signaling*. PLoS One, 4(10): p. e7489.
- [86] Paul, J., Maiti K., Read M., Hure A., Smith J., *et coll.*, 2011. *Phasic phosphorylation of caldesmon and ERK 1/2 during contractions in human myometrium*. PLoS One, 6(6): p. e21542.
- [87] Shirinsky, V.P., Biryukov K.G., Hettasch J.M., and Sellers J.R., 1992. *Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin*. J Biol Chem, 267(22): p. 15886-92.
- [88] Winterhager, E. and Kidder G.M., 2015. *Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health*. Hum Reprod Update.
- [89] Garfield, R.E., Blennerhassett M.G., and Miller S.M., 1988. *Control of myometrial contractility: role and regulation of gap junctions*. Oxf Rev Reprod Biol, 10: p. 436-90.
- [90] Marret, S., Marpeau L., Zupan-Simunek V., Eurin D., Leveque C., *et coll.*, 2007. *Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial**. BJOG, 114(3): p. 310-8.
- [91] Hamilton, S., Oomomian Y., Stephen G., Shynlova O., Tower C.L., *et coll.*, 2012. *Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor*. Biol Reprod, 86(2): p. 39.
- [92] Thomson, A.J., Telfer J.F., Young A., Campbell S., Stewart C.J., *et coll.*, 1999. *Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process*. Hum Reprod, 14(1): p. 229-36.
- [93] Keski-Nisula, L., Katila M.L., Kirkinen P., Ollikainen M., and Saarikoski S., 1997. *Amniotic fluid leukocytes and leukocyte esterase activity in parturients delivered by caesarean section*. Scand J Infect Dis, 29(3): p. 291-6.
- [94] Bokstrom, H., Brannstrom M., Alexandersson M., and Norstrom A., 1997. *Leukocyte subpopulations in the human uterine cervical stroma at early and term pregnancy*. Hum Reprod, 12(3): p. 586-90.
- [95] Ledingham, M.A., Thomson A.J., Jordan F., Young A., Crawford M., *et coll.*, 2001. *Cell adhesion molecule expression in the cervix and myometrium during pregnancy and parturition*. Obstet Gynecol, 97(2): p. 235-42.
- [96] Gomez-Lopez, N., Estrada-Gutierrez G., Jimenez-Zamudio L., Vega-Sanchez R., and Vadillo-Ortega F., 2009. *Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor*. J Reprod Immunol, 80(1-2): p. 122-31.
- [97] Gomez-Lopez, N., Tanaka S., Zaeem Z., Metz G.A., and Olson D.M., 2013. *Maternal circulating leukocytes display early chemotactic responsiveness during late gestation*. BMC Pregnancy Childbirth, 13 Suppl 1: p. S8.
- [98] Esplin, M.S., Peltier M.R., Hamblin S., Smith S., Fausett M.B., *et coll.*, 2005. *Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor*. Placenta, 26(8-9): p. 661-71.
- [99] Bardou, M., Hadi T., Mace G., Pesant M., Debermont J., *et coll.*, 2014. *Systemic increase in human maternal circulating CD14+CD16- MCP-1+ monocytes as a marker of labor*. Am J Obstet Gynecol, 210(1): p. 70 e1-9.
- [100] Yuan, M., Jordan F., McInnes I.B., Harnett M.M., and Norman J.E., 2009. *Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour*. Mol Hum Reprod, 15(11): p. 713-24.
- [101] Bollapragada, S., Youssef R., Jordan F., Greer I., Norman J., *et coll.*, 2009. *Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix*. Am J Obstet Gynecol, 200(1): p. 104 e1-11.
- [102] Tribe, R.M., Moriarty P., Dalrymple A., Hassoni A.A., and Poston L., 2003. *Interleukin-1beta induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle*. Biol Reprod, 68(5): p. 1842-9.

- [103] Rauk, P.N. and Chiao J.P., 2000. *Interleukin-1 stimulates human uterine prostaglandin production through induction of cyclooxygenase-2 expression*. Am J Reprod Immunol, 43(3): p. 152-9.
- [104] Sadowsky, D.W., Adams K.M., Gravett M.G., Witkin S.S., and Novy M.J., 2006. *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, 195(6): p. 1578-89.
- [105] Russello, O., Romanini A., Civalleri D., Rosso R., Nicolin A., et coll., 1989. *Time-dependent interactions between 5-fluorouracil and mitomycin C on a human colon carcinoma cell line, HCT-8, in vitro*. Eur J Cancer Clin Oncol, 25(3): p. 571-2.
- [106] Huang, W.C., Sala-Newby G.B., Susana A., Johnson J.L., and Newby A.C., 2012. *Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB*. PLoS One, 7(8): p. e42507.
- [107] Young, A., Thomson A.J., Ledingham M., Jordan F., Greer I.A., et coll., 2002. *Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term*. Biol Reprod, 66(2): p. 445-9.
- [108] Winkler, M. and Rath W., 1999. *Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition*. J Perinat Med, 27(1): p. 45-60.
- [109] Ito, A., Sato T., Iga T., and Mori Y., 1990. *Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts*. FEBS Lett, 269(1): p. 93-5.
- [110] Osmers, R.G., Blaser J., Kuhn W., and Tschesche H., 1995. *Interleukin-8 synthesis and the onset of labor*. Obstet Gynecol, 86(2): p. 223-9.
- [111] Herstel, W., 1976. *[Technology in the hospital]*. Tijdschr Ziekenverpl, 29(6): p. 269-71.
- [112] Srikhajon, K., Shynlova O., Preechapornprasert A., Chanrachakul B., and Lye S., 2014. *A new role for monocytes in modulating myometrial inflammation during human labor*. Biol Reprod, 91(1): p. 10.
- [113] Finkel, T., 2001. *Reactive oxygen species and signal transduction*. IUBMB Life, 52(1-2): p. 3-6.
- [114] Richter, C., 1992. *Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria*. Mutat Res, 275(3-6): p. 249-55.
- [115] Bedard, K. and Krause K.H., 2007. *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 87(1): p. 245-313.
- [116] Moncada, S., Palmer R.M., and Higgs E.A., 1991. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 43(2): p. 109-42.
- [117] Droge, W., 2002. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 82(1): p. 47-95.
- [118] Jay, D., Hitomi H., and Griendling K.K., 2006. *Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications*. Free Radic Biol Med, 40(2): p. 183-92.
- [119] Halliwell, B., 1987. *Oxidants and human disease: some new concepts*. FASEB J, 1(5): p. 358-64.
- [120] Al-Gubory, K.H., Fowler P.A., and Garrel C., 2010. *The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes*. Int J Biochem Cell Biol, 42(10): p. 1634-50.
- [121] Gupta, S., Agarwal A., Banerjee J., and Alvarez J.G., 2007. *The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review*. Obstet Gynecol Surv, 62(5): p. 335-47; quiz 353-4.
- [122] Wall, P.D., Pressman E.K., and Woods J.R., Jr., 2002. *Preterm premature rupture of the membranes and antioxidants: the free radical connection*. J Perinat Med, 30(6): p. 447-57.
- [123] Fainaru, O., Almog B., Pinchuk I., Kupferminc M.J., Lichtenberg D., et coll., 2002. *Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo*. BJOG, 109(8): p. 938-41.
- [124] Woods, J.R., Jr., 2001. *Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review*. Placenta, 22 Suppl A: p. S38-44.

- [125] Woods, J.R., Jr., Plessinger M.A., and Miller R.K., 2001. *Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes?* Am J Obstet Gynecol, 185(1): p. 5-10.
- [126] Hadi, T., Bardou M., Mace G., Sicard P., Wendremaire M., *et coll.*, 2015. *Glutathione prevents preterm parturition and fetal death by targeting macrophages-induced reactive oxygen species production in the myometrium.* FASEB J.
- [127] Viatour, P., Merville M.P., Bours V., and Chariot A., 2005. *Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation.* Trends Biochem Sci, 30(1): p. 43-52.
- [128] Lindstrom, T.M. and Bennett P.R., 2005. *The role of nuclear factor kappa B in human labour.* Reproduction, 130(5): p. 569-81.
- [129] Khanjani, S., Kandola M.K., Lindstrom T.M., Sooranna S.R., Melchionda M., *et coll.*, 2011. *NF-kappaB regulates a cassette of immune/inflammatory genes in human pregnant myometrium at term.* J Cell Mol Med, 15(4): p. 809-24.
- [130] Lim, S., MacIntyre D.A., Lee Y.S., Khanjani S., Terzidou V., *et coll.*, 2012. *Nuclear factor kappa B activation occurs in the amnion prior to labour onset and modulates the expression of numerous labour associated genes.* PLoS One, 7(4): p. e34707.
- [131] Terzidou, V., Blanks A.M., Kim S.H., Thornton S., and Bennett P.R., 2011. *Labor and inflammation increase the expression of oxytocin receptor in human amnion.* Biol Reprod, 84(3): p. 546-52.
- [132] Pirianov, G., Waddington S.N., Lindstrom T.M., Terzidou V., Mehmet H., *et coll.*, 2009. *The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) delays lipopolysaccharide-induced preterm delivery and reduces mortality in the newborn mouse.* Endocrinology, 150(2): p. 699-706.
- [133] Yoo, H.G., Shin B.A., Park J.S., Lee K.H., Chay K.O., *et coll.*, 2002. *IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 298(2): p. 251-6.
- [134] Richmond, A., 2002. *Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth.* Nat Rev Immunol, 2(9): p. 664-74.
- [135] Terzidou, V., Lee Y., Lindstrom T., Johnson M., Thornton S., *et coll.*, 2006. *Regulation of the human oxytocin receptor by nuclear factor-kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta.* J Clin Endocrinol Metab, 91(6): p. 2317-26.
- [136] Olson, D.M., Zaragoza D.B., Shallow M.C., Cook J.L., Mitchell B.F., *et coll.*, 2003. *Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor--a review.* Placenta, 24 Suppl A: p. S47-54.
- [137] Soloff, M.S., Cook D.L., Jr., Jeng Y.J., and Anderson G.D., 2004. *In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of cox-2 and il-8 in cultured human myometrial cells.* Endocrinology, 145(3): p. 1248-54.
- [138] Libermann, T.A. and Baltimore D., 1990. *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.* Mol Cell Biol, 10(5): p. 2327-34.
- [139] Khanjani, S., Terzidou V., Johnson M.R., and Bennett P.R., 2012. *NFkappaB and AP-1 drive human myometrial IL8 expression.* Mediators Inflamm, 2012: p. 504952.
- [140] Lappas, M., Permezel M., Georgiou H.M., and Rice G.E., 2002. *Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro.* Biol Reprod, 67(2): p. 668-73.
- [141] Elliott, C.L., Allport V.C., Loudon J.A., Wu G.D., and Bennett P.R., 2001. *Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells.* Mol Hum Reprod, 7(8): p. 787-90.
- [142] Shynlova, O., Oldenhof A., Dorogin A., Xu Q., Mu J., *et coll.*, 2006. *Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation.* Biol Reprod, 74(5): p. 839-49.

- [143] Shynlova, O., Tsui P., Jaffer S., and Lye S.J., 2009. *Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 144 Suppl 1: p. S2-10.
- [144] Charpigny, G., Leroy M.J., Breuiller-Fouche M., Tanfin Z., Mhaouty-Kodja S., et coll., 2003. *A functional genomic study to identify differential gene expression in the preterm and term human myometrium*. Biol Reprod, 68(6): p. 2289-96.
- [145] Mehats, C., Tanguy G., Dallot E., Cabrol D., Ferre F., et coll., 2001. *Is up-regulation of phosphodiesterase 4 activity by PGE2 involved in the desensitization of beta-mimetics in late pregnancy human myometrium?* J Clin Endocrinol Metab, 86(11): p. 5358-65.
- [146] Ronca-Testoni, S., Galbani P., Melis G., Gambacciani M., and Fioretti P., 1984. *Benzodiazepine binding sites in human myometrium*. Int J Tissue React, 6(5): p. 437-41.
- [147] Meloche, S. and Pouyssegur J., 2007. *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. Oncogene, 26(22): p. 3227-39.
- [148] Meloche, S., Seuwen K., Pages G., and Pouyssegur J., 1992. *Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity*. Mol Endocrinol, 6(5): p. 845-54.
- [149] Kahan, C., Seuwen K., Meloche S., and Pouyssegur J., 1992. *Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition*. J Biol Chem, 267(19): p. 13369-75.
- [150] Jaffer, S., Shynlova O., and Lye S., 2009. *Mammalian target of rapamycin is activated in association with myometrial proliferation during pregnancy*. Endocrinology, 150(10): p. 4672-80.
- [151] Sanborn, B.M., 2007. *Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics*. Semin Cell Dev Biol, 18(3): p. 305-14.
- [152] Kota, S.K., Gayatri K., Jammula S., Krishna S.V., Meher L.K., et coll., 2013. *Endocrinology of parturition*. Indian J Endocrinol Metab, 17(1): p. 50-9.
- [153] Miller, L.B., 1994. *History and the Peales*. Trans Stud Coll Physicians Phila, 16(5): p. 101-6.
- [154] Roh, C.R., Oh W.J., Yoon B.K., and Lee J.H., 2000. *Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells*. Mol Hum Reprod, 6(1): p. 96-102.
- [155] Choi, S.J., Oh S., Kim J.H., and Roh C.R., 2007. *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, 132(2): p. 182-8.
- [156] O'Brien, M., O'Shaughnessy D., Ahamide E., Morrison J.J., and Smith T.J., 2007. *Differential expression of the metalloproteinase MMP3 and the alpha5 integrin subunit in human myometrium at labour*. Mol Hum Reprod, 13(9): p. 655-61.
- [157] Lirussi, F., O'Brien M., Wendremaire M., Goirand F., Sagot P., et coll., 2010. *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, 159(6): p. 1354-66.
- [158] Leong, A.S., Norman J.E., and Smith R., 2008. *Vascular and myometrial changes in the human uterus at term*. Reprod Sci, 15(1): p. 59-65.
- [159] Lirussi, F., Rakotoniaina Z., Madani S., Goirand F., Breuiller-Fouche M., et coll., 2008. *ADRB3 adrenergic receptor is a key regulator of human myometrial apoptosis and inflammation during chorioamnionitis*. Biol Reprod, 78(3): p. 497-505.
- [160] Leroy, M.J., Dallot E., Czerkiewicz I., Schmitz T., and Breuiller-Fouche M., 2007. *Inflammation of choriodecidual induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells*. Biol Reprod, 76(5): p. 769-76.
- [161] 2000. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 894: p. i-xii, 1-253.

- [162] Stein, C.J. and Colditz G.A., 2004. *The epidemic of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 89(6): p. 2522-5.
- [163] Agrawal, S., Van Dessel E., Akin F., Van Cauwenberge S., and Dillemans B., 2010. *Laparoscopic adjustable banded sleeve gastrectomy as a primary procedure for the super-super obese (body mass index > 60 kg/m²)*. Obes Surg, 20(8): p. 1161-3.
- [164] Alanis, M.C., Goodnight W.H., Hill E.G., Robinson C.J., Villers M.S., et coll., 2010. *Maternal super-obesity (body mass index > or = 50) and adverse pregnancy outcomes*. Acta Obstet Gynecol Scand, 89(7): p. 924-30.
- [165] Kuehn, B.M., 2009. *Guideline for pregnancy weight gain offers targets for obese women*. JAMA, 302(3): p. 241-2.
- [166] Han, T.S., Sattar N., and Lean M., 2006. *ABC of obesity. Assessment of obesity and its clinical implications*. BMJ, 333(7570): p. 695-8.
- [167] Ng, M., Fleming T., Robinson M., Thomson B., Graetz N., et coll., 2014. *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 384(9945): p. 766-81.
- [168] INSERM., KANTAR-HEALTH., and ROCHE. *Obépi 2012 - enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité* [en ligne], Dernière mise à jour: 23/03/2015; Disponible sur: http://www.roche.fr/content/dam/corporate/roche_fr/doc/obepi_2012.pdf.
- [169] Flegal, K.M., Carroll M.D., Kit B.K., and Ogden C.L., 2012. *Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010*. JAMA, 307(5): p. 491-7.
- [170] Usha Kiran, T.S., Hemmadi S., Bethel J., and Evans J., 2005. *Outcome of pregnancy in a woman with an increased body mass index*. BJOG, 112(6): p. 768-72.
- [171] Zhang, J., Bricker L., Wray S., and Quenby S., 2007. *Poor uterine contractility in obese women*. BJOG, 114(3): p. 343-8.
- [172] Blondel, B., Lelong N., Kermarrec M., and Goffinet F., 2012. *[Trends in perinatal health in France between 1995 and 2010: Results from the National Perinatal Surveys]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 41(2): p. 151-66.
- [173] Cao, H., 2014. *Adipocytokines in obesity and metabolic disease*. J Endocrinol, 220(2): p. T47-59.
- [174] Despres, J.P. and Lemieux I., 2006. *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 444(7121): p. 881-7.
- [175] Lehr, S., Hartwig S., Lamers D., Famulla S., Muller S., et coll., 2012. *Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes*. Mol Cell Proteomics, 11(1): p. M111 010504.
- [176] Trayhurn, P., 2005. *The biology of obesity*. Proc Nutr Soc, 64(1): p. 31-8.
- [177] Clement, K. and Vignes S., 2009. *[Inflammation, adipokines and obesity]*. Rev Med Interne, 30(9): p. 824-32.
- [178] Lasselin, J., Magne E., Beau C., Ledaguenel P., Dexpert S., et coll., 2014. *Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 99(1): p. E53-61.
- [179] Kim, D., Kim J., Yoon J.H., Ghim J., Yea K., et coll., 2014. *CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice*. Diabetologia, 57(7): p. 1456-65.
- [180] Heilbronn, L.K. and Campbell L.V., 2008. *Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity*. Curr Pharm Des, 14(12): p. 1225-30.
- [181] Lumeng, C.N., Bodzin J.L., and Saltiel A.R., 2007. *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 117(1): p. 175-84.
- [182] Canello, R. and Clement K., 2006. *Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue*. BJOG, 113(10): p. 1141-7.
- [183] Rao, S.R., 2012. *Inflammatory markers and bariatric surgery: a meta-analysis*. Inflamm Res, 61(8): p. 789-807.

- [184] Fantuzzi, G., 2005. *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 115(5): p. 911-9; quiz 920.
- [185] Trayhurn, P. and Wood I.S., 2004. *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 92(3): p. 347-55.
- [186] Moschen, A.R., Kaser A., Enrich B., Mosheimer B., Theurl M., et coll., 2007. *Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties*. J Immunol, 178(3): p. 1748-58.
- [187] Cianflone, K., Xia Z., and Chen L.Y., 2003. *Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents*. Biochim Biophys Acta, 1609(2): p. 127-43.
- [188] Park, H.K. and Ahima R.S., 2013. *Resistin in rodents and humans*. Diabetes Metab J, 37(6): p. 404-14.
- [189] Zhang, Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., et coll., 1994. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 372(6505): p. 425-32.
- [190] Dinarello, C.A., Simon A., and van der Meer J.W., 2012. *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases*. Nat Rev Drug Discov, 11(8): p. 633-52.
- [191] Schottelius, A.J., Mayo M.W., Sartor R.B., and Baldwin A.S., Jr., 1999. *Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding*. J Biol Chem, 274(45): p. 31868-74.
- [192] Wolf, A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., and Tilg H., 2004. *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 323(2): p. 630-5.
- [193] Sangi, H. and Mueller W.H., 1991. *Which measure of body fat distribution is best for epidemiologic research among adolescents?* Am J Epidemiol, 133(9): p. 870-83.
- [194] Krist, J., Wieder K., Kloting N., Oberbach A., Kralisch S., et coll., 2013. *Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity*. Obes Facts, 6(1): p. 57-69.
- [195] Deruelle, P., 2011. *[Obesity and pregnancy]*. Gynecol Obstet Fertil, 39(2): p. 100-5.
- [196] Metwally, M., Li T.C., and Ledger W.L., 2007. *The impact of obesity on female reproductive function*. Obes Rev, 8(6): p. 515-23.
- [197] Balen, A.H. and Anderson R.A., 2007. *Impact of obesity on female reproductive health: British Fertility Society, Policy and Practice Guidelines*. Hum Fertil (Camb), 10(4): p. 195-206.
- [198] Metwally, M., Ong K.J., Ledger W.L., and Li T.C., 2008. *Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence*. Fertil Steril, 90(3): p. 714-26.
- [199] Ramsay, J.E., Greer I., and Sattar N., 2006. *ABC of obesity. Obesity and reproduction*. BMJ, 333(7579): p. 1159-62.
- [200] Le Goff, S., Ledee N., and Bader G., 2008. *[Obesity and reproduction: a literature review]*. Gynecol Obstet Fertil, 36(5): p. 543-50.
- [201] Ducarme, G., Rodrigues A., Aissaoui F., Davitian C., Pharisien I., et coll., 2007. *[Pregnancy in obese patients: which risks is it necessary to fear?]*. Gynecol Obstet Fertil, 35(1): p. 19-24.
- [202] Cedergren, M.I., 2004. *Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome*. Obstet Gynecol, 103(2): p. 219-24.
- [203] Weiss, J.L., Malone F.D., Emig D., Ball R.H., Nyberg D.A., et coll., 2004. *Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study*. Am J Obstet Gynecol, 190(4): p. 1091-7.
- [204] Cnattingius, S., Villamor E., Johansson S., Edstedt Bonamy A.K., Persson M., et coll., 2013. *Maternal obesity and risk of preterm delivery*. JAMA, 309(22): p. 2362-70.
- [205] Bhattacharya, S., Campbell D.M., and Liston W.A., 2007. *Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies*. BMC Public Health, 7: p. 168.
- [206] Baeten, J.M., Bukusi E.A., and Lambe M., 2001. *Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women*. Am J Public Health, 91(3): p. 436-40.

- [207] Meenakshi, Srivastava R., Sharma N.R., Kushwaha K.P., and Aditya V., 2012. *Obstetric behavior and pregnancy outcome in overweight and obese women: maternal and fetal complications and risks in relation to maternal overweight and obesity*. J Obstet Gynaecol India, 62(3): p. 276-80.
- [208] Kumari, A.S., 2001. *Pregnancy outcome in women with morbid obesity*. Int J Gynaecol Obstet, 73(2): p. 101-7.
- [209] Robinson, H.E., O'Connell C.M., Joseph K.S., and McLeod N.L., 2005. *Maternal outcomes in pregnancies complicated by obesity*. Obstet Gynecol, 106(6): p. 1357-64.
- [210] Denison, F.C., Price J., Graham C., Wild S., and Liston W.A., 2008. *Maternal obesity, length of gestation, risk of postdates pregnancy and spontaneous onset of labour at term*. BJOG, 115(6): p. 720-5.
- [211] Vahratian, A., Zhang J., Troendle J.F., Savitz D.A., and Siega-Riz A.M., 2004. *Maternal prepregnancy overweight and obesity and the pattern of labor progression in term nulliparous women*. Obstet Gynecol, 104(5 Pt 1): p. 943-51.
- [212] Stotland, N.E., Washington A.E., and Caughey A.B., 2007. *Prepregnancy body mass index and the length of gestation at term*. Am J Obstet Gynecol, 197(4): p. 378 e1-5.
- [213] Khashan, A.S. and Kenny L.C., 2009. *The effects of maternal body mass index on pregnancy outcome*. Eur J Epidemiol, 24(11): p. 697-705.
- [214] Arrowsmith, S., Wray S., and Quenby S., 2011. *Maternal obesity and labour complications following induction of labour in prolonged pregnancy*. BJOG, 118(5): p. 578-88.
- [215] Wolfe, K.B., Rossi R.A., and Warshak C.R., 2011. *The effect of maternal obesity on the rate of failed induction of labor*. Am J Obstet Gynecol, 205(2): p. 128 e1-7.
- [216] Scott-Pillai, R., Spence D., Cardwell C.R., Hunter A., and Holmes V.A., 2013. *The impact of body mass index on maternal and neonatal outcomes: a retrospective study in a UK obstetric population, 2004-2011*. BJOG, 120(8): p. 932-9.
- [217] Garabedian, M.J., Williams C.M., Pearce C.F., Lain K.Y., and Hansen W.F., 2011. *Extreme morbid obesity and labor outcome in nulliparous women at term*. Am J Perinatol, 28(9): p. 729-34.
- [218] Hermann, M., Le Ray C., Blondel B., Goffinet F., and Zeitlin J., 2015. *The risk of prelabor and intrapartum cesarean delivery among overweight and obese women: possible preventive actions*. Am J Obstet Gynecol, 212(2): p. 241 e1-9.
- [219] Grillaud, M., Bandon D., Nancy J., Delbos Y., and Vaysse F., 2005. *[The polyols in pediatric dentistry: advantages of xylitol]*. Arch Pediatr, 12(7): p. 1180-6.
- [220] Hamon, C., Fanello S., Catala L., and Parot E., 2005. *[Maternal obesity: effects on labor and delivery: Excluding other diseases that might modify obstetrical management]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 34(2): p. 109-14.
- [221] Ahima, R.S. and Flier J.S., 2000. *Leptin*. Annu Rev Physiol, 62: p. 413-37.
- [222] Gong, D.W., Bi S., Pratley R.E., and Weintraub B.D., 1996. *Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene*. J Biol Chem, 271(8): p. 3971-4.
- [223] Denver, R.J., Bonett R.M., and Boorse G.C., 2011. *Evolution of leptin structure and function*. Neuroendocrinology, 94(1): p. 21-38.
- [224] Grasso, P., Leinung M.C., Ingher S.P., and Lee D.W., 1997. *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, 138(4): p. 1413-8.
- [225] Houseknecht, K.L., Baile C.A., Matteri R.L., and Spurlock M.E., 1998. *The biology of leptin: a review*. J Anim Sci, 76(5): p. 1405-20.
- [226] Lago, F., Dieguez C., Gomez-Reino J., and Gualillo O., 2007. *Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation*. Nat Clin Pract Rheumatol, 3(12): p. 716-24.
- [227] Xu, Y., Elmquist J.K., and Fukuda M., 2011. *Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system*. Ann N Y Acad Sci, 1243: p. 1-14.
- [228] Fantuzzi, G. and Faggioni R., 2000. *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 68(4): p. 437-46.

- [229] Sierra-Honigmann, M.R., Nath A.K., Murakami C., Garcia-Cardena G., Papapetropoulos A., *et coll.*, 1998. *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. *Science*, 281(5383): p. 1683-6.
- [230] Brann, D.W., Wade M.F., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., and Buchanan C.D., 2002. *Leptin and reproduction*. *Steroids*, 67(2): p. 95-104.
- [231] Teerds, K.J., de Rooij D.G., and Keijer J., 2011. *Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models*. *Hum Reprod Update*, 17(5): p. 667-83.
- [232] Farooqi, I.S. and O'Rahilly S., 2014. *20 years of leptin: human disorders of leptin action*. *J Endocrinol*, 223(1): p. T63-70.
- [233] Hu, Z., Xu L., and Wen X., 2013. *Mesoporous silicas synthesis and application for lignin peroxidase immobilization by covalent binding method*. *J Environ Sci (China)*, 25(1): p. 181-7.
- [234] Dardeno, T.A., Chou S.H., Moon H.S., Chamberland J.P., Fiorenza C.G., *et coll.*, 2010. *Leptin in human physiology and therapeutics*. *Front Neuroendocrinol*, 31(3): p. 377-93.
- [235] Smith-Kirwin, S.M., O'Connor D.M., De Johnston J., Lancey E.D., Hassink S.G., *et coll.*, 1998. *Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk*. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(5): p. 1810-3.
- [236] Henson, M.C., Swan K.F., and O'Neil J.S., 1998. *Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term*. *Obstet Gynecol*, 92(6): p. 1020-8.
- [237] Schwartz, M.W., Peskind E., Raskind M., Boyko E.J., and Porte D., Jr., 1996. *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans*. *Nat Med*, 2(5): p. 589-93.
- [238] Maffei, M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., *et coll.*, 1995. *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nat Med*, 1(11): p. 1155-61.
- [239] Ahima, R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., *et coll.*, 1996. *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. *Nature*, 382(6588): p. 250-2.
- [240] Saladin, R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girard J., *et coll.*, 1995. *Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration*. *Nature*, 377(6549): p. 527-9.
- [241] Korbonits, M., Trainer P.J., Little J.A., Edwards R., Kopelman P.G., *et coll.*, 1997. *Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46(6): p. 751-7.
- [242] Sinha, M.K., Sturis J., Ohannesian J., Magosin S., Stephens T., *et coll.*, 1996. *Ultradian oscillations of leptin secretion in humans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 228(3): p. 733-8.
- [243] Ahima, R.S. and Osei S.Y., 2004. *Leptin signaling*. *Physiol Behav*, 81(2): p. 223-41.
- [244] Harris, R.B., 2014. *Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3): p. 414-23.
- [245] Fruhbeck, G., 2006. *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. *Biochem J*, 393(Pt 1): p. 7-20.
- [246] Tartaglia, L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., *et coll.*, 1995. *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. *Cell*, 83(7): p. 1263-71.
- [247] Gorska, E., Popko K., Stelmaszyk-Emmel A., Ciepiela O., Kucharska A., *et coll.*, 2010. *Leptin receptors*. *Eur J Med Res*, 15 Suppl 2: p. 50-4.
- [248] Bjorbaek, C., Uotani S., da Silva B., and Flier J.S., 1997. *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor*. *J Biol Chem*, 272(51): p. 32686-95.
- [249] Kastin, A.J., Pan W., Maness L.M., Koletsky R.J., and Ernberger P., 1999. *Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor*. *Peptides*, 20(12): p. 1449-53.
- [250] Hoggard, N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., *et coll.*, 1997. *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20): p. 11073-8.

- [251] Ge, H., Huang L., Pourbahrami T., and Li C., 2002. *Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 277(48): p. 45898-903.
- [252] Wendremaire, M., Bardou M., Peyronel C., Hadi T., Sagot P., *et coll.*, 2011. *Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis*. Am J Obstet Gynecol, 205(4): p. 363 e1-9.
- [253] Kitawaki, J., Koshiba H., Ishihara H., Kusuki I., Tsukamoto K., *et coll.*, 2000. *Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 85(5): p. 1946-50.
- [254] Sweeney, G., 2002. *Leptin signalling*. Cell Signal, 14(8): p. 655-63.
- [255] Ihle, J.N. and Kerr I.M., 1995. *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. Trends Genet, 11(2): p. 69-74.
- [256] Kloek, C., Haq A.K., Dunn S.L., Lavery H.J., Banks A.S., *et coll.*, 2002. *Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences*. J Biol Chem, 277(44): p. 41547-55.
- [257] Baumann, H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., *et coll.*, 1996. *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(16): p. 8374-8.
- [258] Catalano, S., Giordano C., Rizza P., Gu G., Barone I., *et coll.*, 2009. *Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation*. J Cell Physiol, 218(3): p. 490-500.
- [259] Myers, M.G., Cowley M.A., and Munzberg H., 2008. *Mechanisms of leptin action and leptin resistance*. Annu Rev Physiol, 70: p. 537-56.
- [260] Moon, H.S., Dalamaga M., Kim S.Y., Polyzos S.A., Hamnvik O.P., *et coll.*, 2013. *Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals*. Endocr Rev, 34(3): p. 377-412.
- [261] Bjorbaek, C., Buchholz R.M., Davis S.M., Bates S.H., Pierroz D.D., *et coll.*, 2001. *Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors*. J Biol Chem, 276(7): p. 4747-55.
- [262] Banks, A.S., Davis S.M., Bates S.H., and Myers M.G., Jr., 2000. *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 275(19): p. 14563-72.
- [263] Sun, X.J., Wang L.M., Zhang Y., Yenush L., Myers M.G., Jr., *et coll.*, 1995. *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*. Nature, 377(6545): p. 173-7.
- [264] Shan, J., Nguyen T.B., Totary-Jain H., Dansky H., Marx S.O., *et coll.*, 2008. *Leptin-enhanced neointimal hyperplasia is reduced by mTOR and PI3K inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(48): p. 19006-11.
- [265] Mattioli, B., Giordani L., Quaranta M.G., and Viora M., 2009. *Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway*. FEBS Lett, 583(7): p. 1102-6.
- [266] Yang, W.H., Liu S.C., Tsai C.H., Fong Y.C., Wang S.J., *et coll.*, 2013. *Leptin induces IL-6 expression through OBRI receptor signaling pathway in human synovial fibroblasts*. PLoS One, 8(9): p. e75551.
- [267] Bjorbak, C., Lavery H.J., Bates S.H., Olson R.K., Davis S.M., *et coll.*, 2000. *SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985*. J Biol Chem, 275(51): p. 40649-57.
- [268] Dalamaga, M., Chou S.H., Shields K., Papageorgiou P., Polyzos S.A., *et coll.*, 2013. *Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives*. Cell Metab, 18(1): p. 29-42.
- [269] de Heredia, F.P., Gomez-Martinez S., and Marcos A., 2012. *Obesity, inflammation and the immune system*. Proc Nutr Soc, 71(2): p. 332-8.
- [270] Gruen, M.L., Hao M., Piston D.W., and Hasty A.H., 2007. *Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis*. Am J Physiol Cell Physiol, 293(5): p. C1481-8.
- [271] Lonqvist, F., Arner P., Nordfors L., and Schalling M., 1995. *Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects*. Nat Med, 1(9): p. 950-3.

- [272] Considine, R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., *et coll.*, 1996. *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. *N Engl J Med*, 334(5): p. 292-5.
- [273] Sinha, M.K., Opentanova I., Ohannesian J.P., Kolaczynski J.W., Heiman M.L., *et coll.*, 1996. *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. *J Clin Invest*, 98(6): p. 1277-82.
- [274] Owecki, M., Nikisch E., Miczke A., Pupek-Musialik D., and Sowinski J., 2010. *Leptin, soluble leptin receptors, free leptin index, and their relationship with insulin resistance and BMI: high normal BMI is the threshold for serum leptin increase in humans*. *Horm Metab Res*, 42(8): p. 585-9.
- [275] Zhang, Y. and Scarpace P.J., 2006. *The role of leptin in leptin resistance and obesity*. *Physiol Behav*, 88(3): p. 249-56.
- [276] Lin, S., Thomas T.C., Storlien L.H., and Huang X.F., 2000. *Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24(5): p. 639-46.
- [277] Mantzoros, C.S. and Flier J.S., 2000. *Editorial: leptin as a therapeutic agent--trials and tribulations*. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(11): p. 4000-2.
- [278] Morris, D.L. and Rui L., 2009. *Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(6): p. E1247-59.
- [279] Zabeau, L., Lavens D., Peelman F., Eyckerman S., Vandekerckhove J., *et coll.*, 2003. *The ins and outs of leptin receptor activation*. *FEBS Lett*, 546(1): p. 45-50.
- [280] Zhang, X., Zhang G., Zhang H., Karin M., Bai H., *et coll.*, 2008. *Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity*. *Cell*, 135(1): p. 61-73.
- [281] Posey, K.A., Clegg D.J., Printz R.L., Byun J., Morton G.J., *et coll.*, 2009. *Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(5): p. E1003-12.
- [282] Banks, W.A., Kastin A.J., Huang W., Jaspan J.B., and Maness L.M., 1996. *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. *Peptides*, 17(2): p. 305-11.
- [283] El-Haschimi, K., Pierroz D.D., Hileman S.M., Bjorbaek C., and Flier J.S., 2000. *Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity*. *J Clin Invest*, 105(12): p. 1827-32.
- [284] Caro, J.F., Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Opentanova I., *et coll.*, 1996. *Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance*. *Lancet*, 348(9021): p. 159-61.
- [285] Ogier, V., Ziegler O., Mejean L., Nicolas J.P., and Stricker-Krongrad A., 2002. *Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(4): p. 496-503.
- [286] van Dielen, F.M., van 't Veer C., Buurman W.A., and Greve J.W., 2002. *Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals*. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4): p. 1708-16.
- [287] Bjorbaek, C., El-Haschimi K., Frantz J.D., and Flier J.S., 1999. *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. *J Biol Chem*, 274(42): p. 30059-65.
- [288] Bjorbaek, C., Elmquist J.K., Frantz J.D., Shoelson S.E., and Flier J.S., 1998. *Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance*. *Mol Cell*, 1(4): p. 619-25.
- [289] Morrison, C.D., White C.L., Wang Z., Lee S.Y., Lawrence D.S., *et coll.*, 2007. *Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age*. *Endocrinology*, 148(1): p. 433-40.
- [290] Misra, V.K. and Trudeau S., 2011. *The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy*. *Obesity (Silver Spring)*, 19(2): p. 416-21.

- [291] Lage, M., Garcia-Mayor R.V., Tome M.A., Cordido F., Valle-Inclan F., *et coll.*, 1999. *Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion*. Clin Endocrinol (Oxf), 50(2): p. 211-6.
- [292] Sivan, E., Lin W.M., Homko C.J., Reece E.A., and Boden G., 1997. *Leptin is present in human cord blood*. Diabetes, 46(5): p. 917-9.
- [293] Hardie, L., Trayhurn P., Abramovich D., and Fowler P., 1997. *Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 47(1): p. 101-6.
- [294] Highman, T.J., Friedman J.E., Huston L.P., Wong W.W., and Catalano P.M., 1998. *Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 178(5): p. 1010-5.
- [295] Hauguel-de Mouzon, S., Lepercq J., and Catalano P., 2006. *The known and unknown of leptin in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 194(6): p. 1537-45.
- [296] Lepercq, J., Catalano P., and Hauguel de Mouzon S., 2007. *[Leptin in pregnancy: facts, questions and future]*. Gynecol Obstet Fertil, 35(2): p. 89-95.
- [297] Misra, V.K., Straughen J.K., and Trudeau S., 2013. *Maternal serum leptin during pregnancy and infant birth weight: the influence of maternal overweight and obesity*. Obesity (Silver Spring), 21(5): p. 1064-9.
- [298] Farley, D.M., Choi J., Dudley D.J., Li C., Jenkins S.L., *et coll.*, 2010. *Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity*. Placenta, 31(8): p. 718-24.
- [299] Ashworth, C.J., Hoggard N., Thomas L., Mercer J.G., Wallace J.M., *et coll.*, 2000. *Placental leptin*. Rev Reprod, 5(1): p. 18-24.
- [300] Masuzaki, H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., *et coll.*, 1997. *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 3(9): p. 1029-33.
- [301] Lea, R.G., Howe D., Hannah L.T., Bonneau O., Hunter L., *et coll.*, 2000. *Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies*. Mol Hum Reprod, 6(8): p. 763-9.
- [302] Linnemann, K., Malek A., Sager R., Blum W.F., Schneider H., *et coll.*, 2000. *Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta*. J Clin Endocrinol Metab, 85(11): p. 4298-301.
- [303] Lepercq, J., Challier J.C., Guerre-Millo M., Cauzac M., Vidal H., *et coll.*, 2001. *Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin*. J Clin Endocrinol Metab, 86(6): p. 2409-13.
- [304] Henson, M.C., Castracane V.D., O'Neil J.S., Gimpel T., Swan K.F., *et coll.*, 1999. *Serum leptin concentrations and expression of leptin transcripts in placental trophoblast with advancing baboon pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 84(7): p. 2543-9.
- [305] Bi, S., Gavrilova O., Gong D.W., Mason M.M., and Reitman M., 1997. *Identification of a placental enhancer for the human leptin gene*. J Biol Chem, 272(48): p. 30583-8.
- [306] Jaquet, D., Leger J., Levy-Marchal C., Oury J.F., and Czernichow P., 1998. *Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 83(4): p. 1243-6.
- [307] Cetin, I., Morpurgo P.S., Radaelli T., Taricco E., Cortelazzi D., *et coll.*, 2000. *Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term*. Pediatr Res, 48(5): p. 646-51.
- [308] Marchini, G., Fried G., Ostlund E., and Hagenas L., 1998. *Plasma leptin in infants: relations to birth weight and weight loss*. Pediatrics, 101(3 Pt 1): p. 429-32.
- [309] Shaarawy, M. and el-Mallah S.Y., 1999. *Leptin and gestational weight gain: relation of maternal and cord blood leptin to birth weight*. J Soc Gynecol Investig, 6(2): p. 70-3.
- [310] Akerman, F., Lei Z.M., and Rao C.V., 2002. *Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes*. Gynecol Endocrinol, 16(4): p. 299-306.

- [311] Schubring, C., Kiess W., Englaro P., Rascher W., Dotsch J., *et coll.*, 1997. *Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight.* J Clin Endocrinol Metab, 82(5): p. 1480-3.
- [312] Teppa, R.J., Ness R.B., Crombleholme W.R., and Roberts J.M., 2000. *Free leptin is increased in normal pregnancy and further increased in preeclampsia.* Metabolism, 49(8): p. 1043-8.
- [313] Lewandowski, K., Horn R., O'Callaghan C.J., Dunlop D., Medley G.F., *et coll.*, 1999. *Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies.* J Clin Endocrinol Metab, 84(1): p. 300-6.
- [314] Nuamah, M.A., Sagawa N., Yura S., Mise H., Itoh H., *et coll.*, 2003. *Free-to-total leptin ratio in maternal plasma is constant throughout human pregnancy.* Endocr J, 50(4): p. 421-8.
- [315] Challier, J., Galtier M., Bintein T., Cortez A., Lepercq J., *et coll.*, 2003. *Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies.* Placenta, 24(1): p. 92-9.
- [316] Tessier, D.R., Ferraro Z.M., and Gruslin A., 2013. *Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity.* Placenta, 34(3): p. 205-11.
- [317] Ladyman, S.R. and Grattan D.R., 2004. *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, 145(8): p. 3704-11.
- [318] Butte, N.F., 2000. *Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus.* Am J Clin Nutr, 71(5 Suppl): p. 1256S-61S.
- [319] Forhead, A.J. and Fowden A.L., 2009. *The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth.* J Physiol, 587(Pt 6): p. 1145-52.
- [320] Magarinos, M.P., Sanchez-Margalet V., Kotler M., Calvo J.C., and Varone C.L., 2007. *Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells.* Biol Reprod, 76(2): p. 203-10.
- [321] Perez-Perez, A., Maymo J., Gambino Y., Duenas J.L., Goberna R., *et coll.*, 2009. *Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells.* Biol Reprod, 81(5): p. 826-32.
- [322] Castellucci, M., De Matteis R., Meisser A., Canello R., Monsurro V., *et coll.*, 2000. *Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion.* Mol Hum Reprod, 6(10): p. 951-8.
- [323] Zhang, Y., Olbort M., Schwarzer K., Nuesslein-Hildesheim B., Nicolson M., *et coll.*, 1997. *The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression.* Biochem Biophys Res Commun, 240(2): p. 492-5.
- [324] Jansson, N., Greenwood S.L., Johansson B.R., Powell T.L., and Jansson T., 2003. *Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments.* J Clin Endocrinol Metab, 88(3): p. 1205-11.
- [325] Maffei, C., Moghetti P., Vettor R., Lombardi A.M., Vecchini S., *et coll.*, 1999. *Leptin concentration in newborns' cord blood: relationship to gender and growth-regulating hormones.* Int J Obes Relat Metab Disord, 23(9): p. 943-7.
- [326] Clement, K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., *et coll.*, 1998. *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.* Nature, 392(6674): p. 398-401.
- [327] Montague, C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., *et coll.*, 1997. *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.* Nature, 387(6636): p. 903-8.
- [328] Perez-Perez, A., Maymo J., Duenas J.L., Goberna R., Calvo J.C., *et coll.*, 2008. *Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway.* Arch Biochem Biophys, 477(2): p. 390-5.
- [329] Perez-Perez, A., Gambino Y., Maymo J., Goberna R., Fabiani F., *et coll.*, 2010. *MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 396(4): p. 956-60.

- [330] Corvinus, F.M., Fitzgerald J.S., Friedrich K., and Markert U.R., 2003. *Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity*. Am J Reprod Immunol, 50(4): p. 316-21.
- [331] Pollheimer, J. and Knofler M., 2005. *Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review*. Placenta, 26 Suppl A: p. S21-30.
- [332] Toro, A.R., Maymo J.L., Ibarbalz F.M., Perez Perez A., Maskin B., et coll., 2014. *Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation*. PLoS One, 9(6): p. e99187.
- [333] Somasundar, P., Frankenberry K.A., Skinner H., Vedula G., McFadden D.W., et coll., 2004. *Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin*. J Surg Res, 118(1): p. 71-82.
- [334] Hardwick, J.C., Van Den Brink G.R., Offerhaus G.J., Van Deventer S.J., and Peppelenbosch M.P., 2001. *Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells*. Gastroenterology, 121(1): p. 79-90.
- [335] Chen, C., Chang Y.C., Liu C.L., Chang K.J., and Guo I.C., 2006. *Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1*. Breast Cancer Res Treat, 98(2): p. 121-32.
- [336] Ptak, A., Kolaczowska E., and Gregoraszczyk E.L., 2013. *Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3 ovarian cancer cells*. Endocrine, 43(2): p. 394-403.
- [337] Xiong, Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., et coll., 1993. *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 366(6456): p. 701-4.
- [338] Quinton, N.D., Laird S.M., Tuckerman E.M., Cork B.A., Li T.C., et coll., 2003. *Expression of leptin receptor isoforms in vitro: lack of effects of leptin on endometrial cytokine and MMP production*. Am J Reprod Immunol, 50(3): p. 224-31.
- [339] Yeh, W.L., Lu D.Y., Lee M.J., and Fu W.M., 2009. *Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production*. Glia, 57(4): p. 454-64.
- [340] Madani, S., De Girolamo S., Munoz D.M., Li R.K., and Sweeney G., 2006. *Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 69(3): p. 716-25.
- [341] Cao, Q., Mak K.M., and Lieber C.S., 2007. *Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells*. J Hepatol, 46(1): p. 124-33.
- [342] Cao, Q., Mak K.M., and Lieber C.S., 2006. *Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H2O2-dependent MAPK pathways*. J Cell Biochem, 97(1): p. 188-97.
- [343] Pavlovskii, L.N., 2010. [Nikolai Ivanovich Pirogov--surgeon, scientist, teacher and public figure]. Lik Sprava, (7-8): p. 119-27, 129.
- [344] Wendremaire, M., Mourtialon P., Goirand F., Lirussi F., Barrichon M., et coll., 2013. *Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an in vitro model of human myometrial inflammation*. Biol Reprod, 88(2): p. 45.
- [345] Moynihan, A.T., Hehir M.P., Glavey S.V., Smith T.J., and Morrison J.J., 2006. *Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro*. Am J Obstet Gynecol, 195(2): p. 504-9.
- [346] Mumtaz, S., AlSaif S., Wray S., and Noble K., 2015. *Inhibitory effect of visfatin and leptin on human and rat myometrial contractility*. Life Sci, 125: p. 57-62.
- [347] Markowska, A., Belloni A.S., Rucinski M., Parenti A.R., Nardelli G.B., et coll., 2005. *Leptin and leptin receptor expression in the myometrium and uterine myomas: Is leptin involved in tumor development?* Int J Oncol, 27(6): p. 1505-9.
- [348] O'Malley, D., Irving A.J., and Harvey J., 2005. *Leptin-induced dynamic alterations in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels*. FASEB J, 19(13): p. 1917-9.
- [349] Wuntakal, R. and Hollingworth T., 2010. *Leptin--a tocolytic agent for the future?* Med Hypotheses, 74(1): p. 81-2.

- [350] Sharma, D., Saxena N.K., Vertino P.M., and Anania F.A., 2006. *Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways*. *Endocr Relat Cancer*, 13(2): p. 629-40.
- [351] Tabb, T., Thilander G., Grover A., Hertzberg E., and Garfield R., 1992. *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*, 167(2): p. 559-67.
- [352] Challier, J.C., Basu S., Bintein T., Minium J., Hotmire K., *et coll.*, 2008. *Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta*. *Placenta*, 29(3): p. 274-81.
- [353] Barrichon, M., Hadi T., Wendremaire M., Ptasinski C., Seigneuric R., *et coll.*, 2015. *Dose-dependent biphasic leptin-induced proliferation is caused by non-specific IL-6/NF-kappaB pathway activation in human myometrial cells*. *Br J Pharmacol*.
- [354] Fontana, L., Eagon J.C., Colonna M., and Klein S., 2007. *Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss*. *Rejuvenation Res*, 10(1): p. 41-6.
- [355] Tussing-Humphreys, L., Pini M., Ponemone V., Braunschweig C., and Fantuzzi G., 2011. *Suppressed cytokine production in whole blood cultures may be related to iron status and hepcidin and is partially corrected following weight reduction in morbidly obese premenopausal women*. *Cytokine*, 53(2): p. 201-6.
- [356] Sen, S., Iyer C., Klebenov D., Histed A., Aviles J.A., *et coll.*, 2013. *Obesity impairs cell-mediated immunity during the second trimester of pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 208(2): p. 139 e1-8.

ANNEXES

I. Articles

M. Barrichon, T. Hadi, M. Wendremaire, C. Ptasinski, R. Seigneureic, G. Marcion, M. Delignette, J. Marchet, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou, C. Garrido, F. Lirussi

« Dose-dependent biphasic leptin-induced proliferation is caused by non-specific IL-6/NF-κB pathway activation in human myometrial cells »

British Journal of Pharmacology 2015 Feb 5. PMID: 25653112 (IF: 4,999)

T. Hadi, M. Bardou, G. Mace, P. Sicard, M. Wendremaire, **M. Barrichon**, S. Richaud, O. Demidov, P. Sagot, C. Garrido, F. Lirussi

« Glutathione prevents preterm parturition and fetal death by targeting macrophages-induced reactive oxygen species production in the myometrium »

FASEB Journal. 2015, PMID: 25757563 (IF: 5,480)

M. Bardou, T. Hadi, G. Mace, M. Pesant, J. De Bermont, **M. Barrichon**, M. Wendremaire, N. Laurent, P. Sagot, F. Lirussi

« Systemic increase in human maternal circulating CD14+CD16- MCP-1+ monocytes as a marker of labor »

American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2014, PMID: 23994222 (IF: 3,877)

T. Hadi, **M. Barrichon**, P. Mourtialon, M. Wendremaire, C. Garrido, P. Sagot, M. Bardou, F. Lirussi

« Biphasic Erk1/2 activation sequentially involving Gs and Gi signaling is required in beta3-adrenergic receptor induced primary smooth muscle cell proliferation » Biochimica and Biophysica Acta,

Molecular Cell Research, 2013, PMID: 23388888 (IF: 4,808)

M. Wendremaire, P. Mourtialon, F. Goirand, F. Lirussi, **M. Barrichon**, T. Hadi, C. Garrido, I. Le Ray, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou

« Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced remodeling in an in vitro model of myometrial inflammation »

Biology of Reproduction, 2013, PMID: 23303680 (IF: 4,027)

II. Communications orales

M. Wendremaire, T. Hadi, **M. Barrichon**, M. Bardou, P. Sagot, C. Garrido, F. Lirussi

« Macrophages are required for in vitro human myometrial cells activation in response to inflammatory stimuli »

61st Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation - Florence - Mars 2014

M. Barrichon, T. Hadi, M. Wendremaire, F. Goirand, P. Mourtialon, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi

« Effects of leptin on human myometrial cell proliferation »

60th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation - Orlando - Mars 2013

T. Hadi, **M. Barrichon**, P. Mourtialon, F. Goirand, I. Le Ray, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou, F. Lirussi

« A sequential Gs then Gi pathway activation is required to induce the B3-AR proliferative effects on myometrial smooth muscle cells»

VII^{ème} congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique - Dijon - Avril 2012

T. Hadi, F. Lirussi, J. De Bermont, P. Mourtialon, P. Loisel, C. Bonnin, V. Bernigal, C. Isambert, A. Maurer, **M. Barrichon**, F. Goirand, I. Le Ray, P. Sagot, M. Bardou

“PhenoMAP study evaluation of the prognostic value of monocytes and lymphocytes phenotyping: new predictive markers for threat of preterm labour (PTL)”

VII^{ème} congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique - Dijon - Avril 2012

T. Hadi, **M. Barrichon**, M. Bardou, F. Goirand, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi

“A sequential Gs/Gi pathway activation is required to induce B3-adrenoceptor (B3-AR) mediated human myometrial cell proliferation in vitro”

59th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation – San Diego - Mars 2012

M. Wendremaire, F. Lirussi, **M. Barrichon**, T. Hadi, M. Sediki, F. Goirand, C. Peyronel, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou.

« Etude des effets de la leptine sur le remodelage myométrial dans un modèle d'inflammation in vitro »

15^{ème} Congrès P2T - Grenoble - Mars 2011

T. Hadi, M. Wendremaire, **M. Barrichon**, C. Peyronel, M. Sediki, F. Goirand, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi, M. Bardou

“3-adrenoceptor (ADRB3) stimulation by SAR150640 induces a cAMP/Erk1/2-mediated human myometrial cell proliferation in vitro”

58th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation - Miami - Mars 2011

III. Communications affichées

M. Barrichon, T. Hadi, M. Wendremaire, G. Macé, M. Bardou, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi.
« Normal- and obese-related leptin doses influence myometrial cell proliferation through distinct ERK1/2 and STAT3 signaling »

61st Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation - Florence - Mars 2014

T. Hadi, M. Bardou, **M. Barrichon**, P. Mourtialon, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi

“Reactive Oxygen Species (ROS) play a key role in the induction of labor-related features”

60th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation - Orlando - Mars 2013

M. Barrichon, T. Hadi, M. Wendremaire, F. Goirand, M. Bardou, P. Mourtialon, P. Sagot, F. Lirussi.
« Effects of leptin on human myometrial cell proliferation »

VII^{ème} Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique - Dijon - Avril 2012

M. Wendremaire, F. Goirand, **M. Barrichon**, F. Lirussi, C. Peyronel, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou.

« Leptin prevents MMP activation in an in vitro model of myometrial inflammation »

VII^{ème} Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique - Dijon - Avril 2012

T. Hadi, **M. Barrichon**, F. Lirussi, P. Moutialon, F. Goirand, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou

“A Sequential Gs/Gi Pathway Activation Is Required to Induce B3-adrenoceptor (B3-AR) Mediated Human Myometrial Cell Proliferation In Vitro “

59th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation – San Diego - Mars 2012

Hadi T, Lirussi F, De Bermont J, Mourtialon P, Loisel P, Bonnin C, Bernigal V, Isambert C, Maurer A, Barrichon M, Goirand F, Le Ray I, Sagot P, Bardou M

« PhenoMAP study evaluation of the prognostic value of monocytes and lymphocytes phenotyping: new predictive markers for threat of preterm labour (PTL)»

VII^{ème} Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique - Dijon - Avril 2012

M. Barrichon, T. Hadi, M. Wendremaire, F. Goirand, P. Mourtialon, P. Sagot, M. Bardou, F. Lirussi

“Effet de la leptine sur la prolifération des cellules myométriales humaines”

18^{ème} FJC – Besançon Septembre 2012

M. Wendremaire, F. Lirussi, **M. Barrichon**, M. Sediki, T. Hadi, F. Goirand, C. Peyronel, M. Dumas, P. Sagot, M. Bardou.

“Leptin prevents MMP activation in an in vitro model of myometrial inflammation”

2^{ème} journée de l’IFR100 – Dijon - Avril 2011

T. Hadi, M. Wendremaire, **M. Barrichon**, C. Peyronel, F. Coppin, M. Sediki, F. Goirand, M. Dumas, P. Sagot, F. Lirussi, M. Bardou

“LPS-induced NFκB activation is associated with ROS production, NADPHox and iNOS activation in an in vitro model of chorioamnionitis”

SIG, 58TH – Miami Mars 2011