

Université de Montréal

Caractérisation du rôle du neuromédine U récepteur 2 dans le déclenchement du travail préterme et développement de modulateurs peptidiques de son activité utérotonique pour prévenir la naissance prématurée.

par Amarilys BOUDREAULT

Département de Sciences biomédicales,
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es science (M.Sc.)
en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

Avril, 2017

© Amarilys BOUDREAULT, 2017

Résumé

Soixante-quinze pourcent des naissances prématurées sont dûes au travail préterme dans lequel les contractions myométriales sont causées par les protéines activatrices de l'utérus qui sont davantage induites en présence d'inflammation. De plus, naître prématurément augmente fortement les risques de mortalité et morbidité néonatales et/ou de complications à long terme. Pour le moment, les options pharmacologiques les plus utilisées en clinique sont celles qui préservent ou induisent la quiescence de l'utérus. Toutefois, les tocolytiques (agents inhibant les contractions) ne sont pas assez efficaces pour prolonger la gestation de plus de 48 heures et causent de nombreux effets indésirables chez la mère et le fœtus. Nous avons récemment découvert que les neuropeptides neuromédines U (NmU) et S (NmS) favorisent la contraction utérine en induisant la relâche intracellulaire de calcium *via* le neuroméline U récepteur 2 (NmU-R2). Nous avons cherché à élucider l'implication de ce système pro-contractile dans le déclenchement du travail utérin à terme et préterme ainsi que le mécanisme d'action de NmU-R2 dans les myocytes myométriaux murins. Nous avons également caractérisé cinq petits peptides antagonistes du NmU-R2, conçus dans notre laboratoire, afin de choisir le meilleur candidat pour le développement d'un nouveau tocolytique. Jusqu'à présent, nos données montrent que: 1) NmU et NmS induisent la contraction utérine *ex vivo* et le travail utérin *in vivo* et la relâche intracellulaire de calcium *in vitro* de façon dose-dépendante, âge gestationnel-dépendante et NmU-R2-dépendante; 2) une activation transitoire (5-15 minutes) de Akt et Erk1/2 a lieu après stimulation *in vitro* avec NmU et NmS; 3) p38, JNK et c-jun ne sont pas impliqués dans la signalisation de NmU-R2; 4) le *knock-down* de NmU-R2 inhibe significativement cette activation de Akt et Erk1/2 en plus

de réduire considérablement la relâche intracellulaire de calcium, démontrant que ces effets induits par NmU et NmS sont NmU-R2-dépendants; 5) la signalisation de NmU-R2 est exclusive à la fin de la gestation en approche du travail utérin; 6) le peptide 5 inhibe davantage la contraction utérine *ex vivo* (inhibition de 40-50%); 7) ces contractions utérines ne sont pas inhibées par le peptide scrambled; 8) les peptides 4 et 5 inhibent la relâche de calcium de façon dose-dépendante (IC₅₀ de la courbe dose-réponse pour le peptide 5: 23nM); 9) la phosphorylation de Akt (mais pas de Erk1/2) est inhibée de manière dose-dépendante par le peptide 5. Ainsi, nos résultats suggèrent que NmU-R2 joue un rôle dans la contraction utérine, dans l'induction du travail préterme associé à l'infection et signale *via* Erk1/2, Akt et la relâche calcique dans les myocytes myométriaux dans l'utérus à terme. De plus, le peptide 5 a de meilleures propriétés antagonistes contre NmU-R2 et constitue le meilleur candidat pour développer un potentiel agent tocolytique contre NmU-R2 et prévenir le travail préterme. Très prochainement, il est prévu de poursuivre la caractérisation du peptide candidat anti-NmU-R2 afin de poursuivre le développement de cette molécule et de trouver une nouvelle thérapie potentielle pour prévenir la naissance prématurée.

Mots-clés : Neuromédine U, Neuromédine S, Contraction, Calcium, Travail utérin, Travail préterme, NmU-R2, Prématurité, Inflammation, Tocolytiques, Grossesse

Abstract

Seventy-five percent of preterm births are due to preterm labor in which myometrial contractions are caused by uterine activation proteins, more expressed in an inflammatory context. Moreover, being born premature highly increase risks of neonatal mortality and morbidities and/or long-term complications. For now, the pharmacological options mostly used in clinic are the ones that preserve or induce the quiescence of the uterus. However, tocolytics (agents inhibiting contractions) are not efficient enough to prolong gestation for more than 48 hours and induce numerous maternal and fetal side effects. We recently discovered that neuropeptides called neuromedins U (NmU) and S (NmS) favor uterine contractions by inducing intracellular calcium release *via* the neuromedin U receptor 2 (NmU-R2). We wanted to elucidate the implication of this pro-contractile system in the onset of term and preterm uterine labor as well as the mechanism of action of NmU-R2 in murine myometrial myocytes. We also characterized five small antagonist peptides against NmU-R2, designed in our laboratory, in order to select the best candidate for the development of a new tocolytic. Until now, our data show that: 1) NmU and NmS induce uterine contraction *ex vivo*, uterine labor *in vivo* and intracellular calcium release *in vitro* in a dose-dependant, gestational age-dependant and NmU-R2-dependant manner; 2) a transient activation (5-15 minutes) of Akt and Erk1/2 occurs after *in vitro* stimulation with NmU or NmS; 3) p38, JNK, c-jun are not involved in the signaling pathway of NmU-R2; 4) the knockdown of NmU-R2 significantly inhibits Akt and Erk1/2 activation and considerably reduce the intracellular calcium release, showing that these effects induced by NmU and NmS are NmU-R2-dependant; 5) the signaling of NmU-R2 is exclusive to the end of the gestation as we approach uterine labor; 6)

peptide 5 inhibits uterine contraction *ex vivo* (40-50% inhibition); 7) these uterine contractions are not inhibited by the scrambled peptide; 8) peptides 4 and 5 inhibit the intracellular calcium release in a dose-dependant manner (IC₅₀ of the dose-response curve for peptide 5: 23nM); 9) the phosphorylation of Akt (but not of Erk1/2) is inhibited in a dose-dependant manner by peptide 5. Therefore, our results suggest that NmU-R2 plays a role in the uterine contraction, in the induction of preterm labor associated with infection and that its signaling activates Erk1/2, Akt and the calcium release in myometrial myocytes within term uterus. In addition, peptide 5 possesses antagonist properties against NmU-R2, suggesting it as the best candidate for a potential tocolytic agent targeting NmU-R2 to prevent preterm labor. In the near future, it is planned to continue the characterization of the anti-NmU-R2 candidate peptide in order to pursue the development of the molecule and find a new potential therapy to prevent premature birth.

Keywords : Neuromedin U, Neuromedin S, Contraction, Calcium, Uterine labor, Preterm labor, NmU-R2, Prematurity, Inflammation, Tocolytics, Pregnancy

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Dédicace.....	xv
Remerciements.....	xvi
1. Introduction.....	1
1.1 Le travail utérin.....	2
1.1.1 Processus physiologique et molécules impliquées.....	2
1.2 La naissance prématurée.....	7
1.2.1 Causes principales et facteurs de risque.....	9
1.2.2 Conséquences de la naissance prématurée.....	14
1.3 L'inflammation.....	17
1.3.1 L'inflammasome et l'interleukine-1.....	20
1.4 Contexte clinique actuel.....	23
1.4.1 La classification des nouveau-nés prématurés.....	24
1.4.2 Survie <i>versus</i> décès chez les nouveau-nés prématurés.....	25
1.4.3 Les classes de tocolytiques.....	27
1.4.3.1 Les β -mimétiques.....	28
1.4.3.2 Bloqueurs de canaux calciques.....	29
1.4.3.3 Donneurs d'oxyde nitrique.....	30
1.4.3.4 Antagonistes du récepteur de l'ocytocine.....	30
1.4.3.5 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou inhibiteurs de cyclo-oxygénases.....	31
1.4.3.6 Autres (e.g.alcool, relaxine, sulfate de magnésium, progestérone).....	32

1.4.3.7 En développement (e.g.ghréline, oméga-3, anti-FP)	33
1.4.4 Molécules en développement ciblant l'inflammation pour prévenir le travail préterme	34
1.4.4.1 Le 101.10 ou rytvela	35
1.5 Le système utérotonique des neuromédines U et S / neuromédine U récepteur 2.....	36
1.5.1 Les neuromédines U et S	36
1.5.1.1 Neuromédine U	36
1.5.1.2 Récepteurs de NmU	37
1.5.1.3 Nombreuses fonctions de NmU	39
1.5.1.4 Neuromédine S et ses récepteurs	40
1.5.1.5 Multiples rôles de NmS	41
1.5.2 Potentiel thérapeutique dans la prévention du travail préterme.....	41
1.6 Caractérisation de peptides	43
1.6.1 Agonisme/Antagonisme.....	43
1.6.1.1 Composés orthostériques <i>versus</i> allostériques.....	43
1.6.1.2 Modulation allostérique surmontable/réversible.....	45
1.6.1.3 Antagonisme allostérique insurmontable/irréversible	45
1.6.2 Caractéristiques de l'allostérisme	45
1.6.2.1 Saturation de l'effet	46
1.6.2.2 Sélectivité fonctionnelle ou signalisation biaisée	46
1.6.2.3 Effets sélectifs sur l'affinité et l'efficacité	47
1.6.3 Conception des peptides antagonistes contre NmU-R2.....	47
Hypothèse	50
Objectifs	52
2. Matériel et méthodes	53
2.1 Approbation éthique.....	53
2.2 Animaux.....	53
2.3 Produits chimiques.....	54
2.4 Isolation et culture de cellules primaires de muscles lisses de myomètres murins	54

2.5 Culture cellulaire.....	56
2.6 Contraction utérine <i>ex vivo</i> en bains	58
2.7 Essais de calcium	59
2.8 Extraction de protéines des biopsies de myomètres humains.....	60
2.9 Induction de la naissance préterme	61
2.10 Production des lentivirus.....	61
2.11 Modèle de travail préterme induit par le LPS.....	63
2.12 Extraction de l'ARN et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)	63
2.13 Transfert de protéines par immunobuvardage de type Western	64
2.14 Immunocytochimie	67
2.15 Analyse statistique	67
3. Résultats	68
<u>A) NmU et NmS impliquées dans l'induction du travail à terme (physiologique)</u>	
3.1 NmU et NmS induisent la contraction utérine <i>ex vivo</i> de manière dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante chez la souris.....	68
3.2 NmU et NmS induisent le travail utérin de façon dose-dépendante chez la souris	68
3.3 NmU-R2 est essentiel pour l'induction du travail préterme causée par l'infection chez la souris.....	70
3.4 L'expression de NmS (mais pas celle de NmU) augmente à l'approche du travail chez la souris et chez l'humain	70
3.5 L'expression génique et protéique de NmU-R2 dans l'utérus est maximale à l'approche du travail	71
<u>B) Mécanisme d'action et voie de signalisation intracellulaire</u>	
3.6 NmU et NmS induisent une relâche intracellulaire de calcium dans les myocytes murins de façon dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante	72
3.7 NmU et NmS activent les kinases Akt et Erk1/2 de façon dose-dépendante et âge-gestationnel dépendante dans les myomètres murins	73

C) Caractérisation de peptides antagonistes de NmU-R2

3.8 Peptide 5 inhibe les contractions utérines murines <i>ex vivo</i> effectuées à terme en réponse à NmU.....	74
3.9 Peptides 4 et 5 inhibent la relâche intracellulaire de calcium en réponse à NmU dans les cellules myométriales de souris	75
3.10 Le peptide 5 module de façon sélective la voie de signalisation de NmU-R2 dans les cellules myométriales primaires de souris	75
Figures et tableaux	77
4. Discussion	105
4.1 NmU et NmS induisent la contraction utérine <i>ex vivo</i> , le travail utérin <i>in vivo</i> et l'activation d'Akt et Erk1/2 ainsi que la relâche calcique <i>in vitro</i> , via NmU-R2.....	105
4.2 NmU-R2 est une cible valide pour prévenir la PTB.....	106
4.3 Les tocolytiques comme moyen de prévention de la PTB.....	108
4.4 Conception de peptides.....	109
4.5 Les antagonistes de RCPGs comme option thérapeutique	110
a) Le peptide 5 inhibent les contractions <i>ex vivo</i> et la relâche de calcium <i>in vitro</i>	111
b) Le peptide 5 module la signalisation de NmU-R2 et montre une caractéristique de l'allostérisme.....	112
5. Conclusion	116
6. Directions futures	116
7. Publications	118
8. Bibliographie	119

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Les nombreux rôles physiologiques attribués à la NmU, impliquant NmU-R1 et/ou NmU-R2, et le potentiel thérapeutique associé à chaque rôle	40
Tableau 2.1 Séquences utilisées pour la conception des shRNA contre NmU-R2	62
Tableau 2.2. Séquence des amorces utilisées pour la quantification de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel.....	64
Tableau 3.1 L'efficacité de NmU et de PGF _{2α} à induire le travail utérin chez la souris dépend de l'âge gestationnel	82

Liste des figures

Figure 1.1. Les différentes phases de la gestation	4
Figure 1.2 La naissance prématurée	13
Figure 1.3 Les neuromédines U et S.....	38
Figure 1.4 Structure chimique du PSOP (haut) et du R-PSOP (bas).....	42
Figure 1.5 Modélisation du neuromédine U récepteur 2.....	49
Figure 3.1 NmU et NmS induisent la contraction utérine <i>ex vivo</i> de manière dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante	78
Figure 3.2 NmU et NmS induisent le travail utérin de façon dose-dépendante	80
Figure 3.3 NmU-R2 est essentiel pour l'induction du travail préterme causée par l'infection ..	83
Figure 3.4 L'expression de NmS (mais pas celle de NmU) augmente à l'approche du travail ..	85
Figure 3.5 L'expression génique et protéique de NmU-R2 dans l'utérus est maximale à l'approche du travail	87
Figure 3.6 NmU et NmS induisent une relâche intracellulaire de calcium dans les myocytes murins de façon dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante	89
Figure 3.7 NmU et NmS activent les kinases Akt et Erk1/2 de façon dose-dépendante et âge-gestationnel dépendante	92
Figure 3.8 Peptide 5 (mais pas le peptide 3) inhibe les contractions utérines <i>ex vivo</i> effectuées à terme en réponse à NmU.....	98
Figure 3.9 Peptides 4 et 5 inhibent la relâche intracellulaire de calcium en réponse à NmU ...	100
Figure 3.10 Le peptide 5 module de façon sélective la voie de signalisation de NmU-R2	103

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

AVP : arginine vasopressine

BPD : brochodysplasie pulmonaire (*bronchopulmonary dysplasia*)

COX-2 : cyclo-oxygénase de type 2

CRH : *corticotropin-releasing hormone*

CX-43 : connexine-43

DAMP : motifs moléculaires associés aux dommages (*damage-associated molecular patterns*)

e.g. : par exemple

ET-1 : endothéline-1

etc : et cetera

FDA : *Food and Drug Administration*

FIRS : syndrome de réponse inflammatoire fœtale (*fetal inflammatory response syndrome*)

FP ou PTGFR : récepteur de la prostaglandine F_{2α}

G : jour de gestation

h : heure(s)

i.e. : c'est-à-dire

IL : interleukine

IVH : hémorragie intra-ventriculaire (*intraventricular hemorrhage*)

LH : hormone lutéinisante

LPS : lipopolysaccharide

LTA : acide lipotéichoïque (*lipoteichoic acid*)

MEC : matrice extra-cellulaire

min : minutes

mm : millimètres

MMPs : métalloprotéinases

mSMC : cellules musculaires lisses de myomètres murins (*murine smooth muscle cells*)

NEC : entérocolite nécrosante (*necrotizing enterocolitis*)

NF- κ B : facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor-kappa B*)
NLRP3 : *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, pyrin domain containing 3*
NmS : neuromédine S
NmU : neuromédine U
NmU-R1 : neuromédine U récepteur 1
NmU-R2 : neuromédine U récepteur 2
OT : ocytocine
OXTR: récepteur de l'ocytocine
PAF : facteur activateur de plaquettes (*platelet-activating factor*)
PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PGDH : prostaglandine déshydrogénase
PGE₂ : prostaglandine E₂
PGF_{2 α} : prostaglandine F_{2 α}
PGHS2 : prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PPROM : rupture préterme et prématurée des membranes (*preterm premature rupture of membranes*)
PTB : naissance prématurée (*preterm birth*)
PTL : travail préterme (*preterm labor*)
PTNL : accouchement préterme sans travail utérin (*via césarienne*) (*preterm non labor*)
RCPG(s) : récepteur(s) couplé(s) aux protéines G
RDS : syndrome de détresse respiratoire (*respiratory distress syndrome*)
ROP : rétinopathie du prématuré (*retinopathy of prematurity*)
sec : secondes
SMSN : syndrome de mort subite du nourrisson
TL : travail à terme (*term labor*)
TNL : accouchement à terme sans travail utérin (*via césarienne*) (*term non labor*)
TLR : récepteurs de type toll (*toll-like receptors*)
vs : versus
TNF α : facteur de nécrose tumorale α (*tumor necrosis factor α*)

UAP(s) : protéine(s) activatrice(s) de l'utérus (*uterine activation proteins*)

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelium growth factor*)

VIH : virus d'immunodéficience humain

Je dédie ce mémoire à mes parents, mon frère ainsi que mes proches amies qui m'ont constamment soutenue tout au long de ma maîtrise. Merci beaucoup!!

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche, Dr Sylvain Chemtob, de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce projet fort intéressant. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, votre support et votre précieuse collaboration pendant mon passage au CHU Ste-Justine. Merci d'avoir cru en mes capacités depuis le tout début. Mon expérience au sein du laboratoire a été des plus enrichissantes et j'en ressors grandie au niveau scientifique mais aussi au niveau personnel.

Un merci tout spécial aux divers organismes subventionnaires (Fondation du CHU Ste-Justine, Réseau de Recherche en Santé de la Vision [RRSV], Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal [FESP], Instituts de Recherche en Santé du Canada [IRSC], Fonds de Recherche du Québec en Santé [FRQS]) ainsi qu'à Dr Sylvain Chemtob pour leur soutien financier pendant ma maîtrise.

Je remercie particulièrement Mathieu Nadeau-Vallée d'avoir initié ce projet passionnant, de m'avoir appris plusieurs techniques et pour tous les bons conseils que tu m'as donnés à chaque étape du projet. Un merci spécial à Dre Christiane Quiniou qui m'a guidée, conseillée et encouragée dans ce projet, en plus d'avoir conçu des peptides antagonistes que j'ai caractérisés. Merci pour tes innombrables connaissances et pour les discussions tant scientifiques que sur d'autres sujets comme la musique. Je remercie aussi Dr Xin Hou pour sa précieuse collaboration et sans qui certaines expériences *in vivo* et *ex vivo* n'auraient pas été possible. Merci également à Raphaël Rouget et Ankush Madaan qui m'ont montré des techniques expérimentales, à Tang Zhu pour son expertise avec le *knock-down* du NmU-R2

ainsi qu'à Estefania, Alexandra, Prabhas, Lydia, Joanna et tous les autres membres du laboratoire (passés et présents) que j'ai pu côtoyer. Vous avez rendu mon quotidien agréable et stimulant. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler, mais aussi à échanger et rire avec chacun d'entre vous. Estefania, *muchas gracias* pour ton aide et tes encouragements constants. Ce fut un réel privilège de vivre cette expérience avec toi du début à la fin! Alexandra, merci beaucoup pour ton support. Je suis heureuse d'être restée assez longtemps pour avoir la chance de te rencontrer! Merci aussi à Joy et Antoine qui ont rendu ma rédaction un peu plus agréable. Grâce à vous tous, je garderai de très bons souvenirs de mes deux années aux études graduées.

Je remercie sincèrement tous les collaborateurs et co-auteurs de l'article intitulé « *Uterotonic Neuromedin U Receptor 2 and Its Ligands Are Upregulated by Inflammation in Mice and Humans, and Elicit Preterm Birth* ». Je veux particulièrement souligner l'implication de Kelycia, Dima et Marie-Ève. Merci à tous et à toutes pour votre bon travail et votre participation dans ce projet.

Finalement, je remercie du fond du cœur mes parents Guylaine et Laurent, mon frère Raphaël ainsi que mes amies Audrée-Anne, Annie et Audrey pour leurs encouragements persistants et leur compréhension pour tout le temps que j'ai consacré à ma maîtrise.

1. Introduction

Plus de 10% des naissances sont prématurées dans le monde, tant dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. De plus, en dépit des avancées scientifiques dans le domaine de la périnatalogie au cours des dernières décennies, le taux de naissances prématurées (PTB) augmente, ce qui en fait une préoccupation majeure mondialement. Présentement, aucun agent pharmacologique (i.e. tocolytique, étant utilisé pour inhiber les contractions utérines et donnant un délai suffisant pour favoriser la maturation pulmonaire) n'est suffisamment efficace pour prolonger la grossesse bien au-delà de 48 h. De plus, naître avant terme (i.e. avant 37 semaines complètes de grossesse) constitue une cause majeure de mortalité et de morbidités néonatales, lesquelles ne sont pas ciblées par l'usage de tocolytiques. Il est connu que plusieurs molécules interagissent en fin de grossesse afin de coordonner et de déclencher le travail menant à l'accouchement (e.g. prostaglandines, eicosanoïdes, ocytocine, cytokines pro-inflammatoires, hormones). Plus récemment, certains neuropeptides nommés neuromédines se sont vus attribuer des propriétés pro-contractiles. En effet, les neuromédines U et S induisent notamment la contraction utérine.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* le système utérotonique (i.e. induisant la contraction de l'utérus) des neuromédines U et S agissant via le neuromédine U récepteur 2 (NmU-R2) dans l'induction du travail préterme et à terme, mais également de caractériser des peptides antagonistes du NmU-R2 dans le but de trouver le meilleur candidat qui induirait la tocolyse et préviendrait la PTB.

1.1 Le travail utérin

1.1.1 Processus physiologique et molécules impliquées

L'utérus est l'organe dans lequel l'embryon, puis le fœtus se développe durant la grossesse. La paroi utérine est composée de trois couches distinctes : endomètre, myomètre et périmètre. Le myomètre est constitué de cellules musculaires lisses (ou myocytes), impliquées dans la contraction utérine (Illanes et al., 2014).

Le travail utérin, processus physiologique précédant l'accouchement chez les vivipares, s'effectue graduellement et vise à expulser le fœtus (Blencowe et al., 2012; Chmaj-Wierzchowska et al., 2016; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Il peut survenir à terme (entre 37 et 42 semaines de grossesse chez l'humain) ou préterme (entre 20 semaines (Iacovidou et al., 2010) [seuil de viabilité du fœtus : 23 semaines] et 36 semaines inclusivement) (Blencowe et al., 2012; Chmaj-Wierzchowska et al., 2016). Malgré de multiples étiologies menant au travail à terme (TL) ou préterme (PTL), la cascade d'événements qui a lieu est similaire (divisé en quatre phases distinctes (Richard E Behrman & Butler, 2007; Kimura et al., 1999); **Figure 1.1**) et implique plusieurs molécules affectant notamment le métabolisme de la mère (Romero et al., 2006). Généralement, l'utérus doit passer d'un état quiescent (phase 0) à un état activé et subir de nombreuses modifications biochimiques, électrophysiologiques et morphologiques tels que : 1) la dilatation et l'effacement du col utérin; 2) la rupture des membranes fœtales (i.e. chorion, amnion) et de la caduque (*decidua*) ainsi que; 3) l'augmentation de la contractilité du myomètre (fréquence et intensité des contractions) (Bennett, 2012; Bernal & Norwitz, 2012; Gotsch et al., 2009; Migale et al., 2016; Nadeau-

Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006). De plus en plus d'évidences montrent que pour activer l'utérus (phases 1 et 2), une production locale de protéines activatrices de l'utérus (UAPs) est induite par les utérotrophines (e.g. cytokines pro-inflammatoires (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016) et stéroïdes) telles que l'œstrogène, la progestérone, le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) ainsi que les interleukines (IL) suivantes : IL-1 β , IL-6, IL-8 (Cappelletti et al., 2016; Christiaens et al., 2008). L'augmentation de l'expression des UAPs (e.g. récepteur de l'ocytocine [OXTR], récepteur de la prostaglandine F $_{2\alpha}$ [FP ou PTGFR], connexine-43 ou GJA1 [CX-43; dans les jonctions communicantes], prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [PGHS2 ou cyclo-oxygénase], récepteur de l'endothéline-1) sensibilise l'utérus à des molécules endogènes nommées utérotonines, dont l'ocytocine (OT), la prostaglandine F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$), la prostaglandine E $_2$ (PGE $_2$), l'endothéline-1 et le facteur activateur de plaquettes (PAF), lesquelles initient le déclenchement du travail utérin via leur récepteur spécifique (Bolden, 2014; Cook et al., 2003; Cook et al., 2000; Germain et al., 1994; Hirst et al., 2005; Yallampalli & Garfield, 1994).

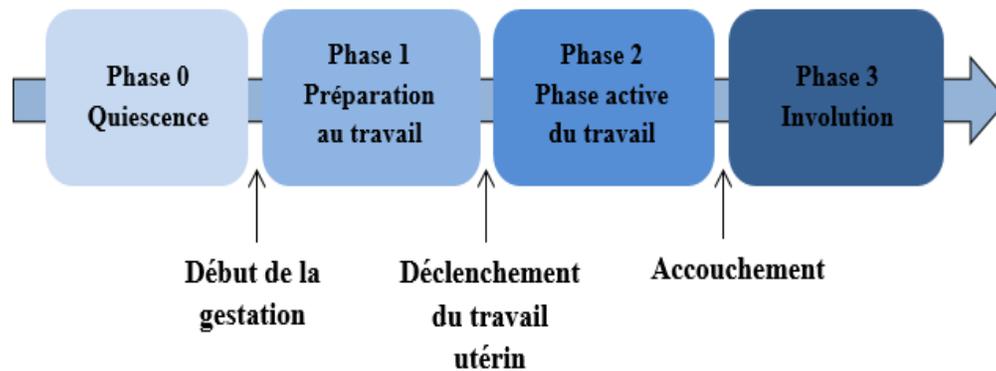


Figure 1.1 | Les différentes phases de la gestation. Quatre phases peuvent être distinguées tout au long de la gestation; la phase 0 étant la plus longue chez toutes les espèces. Durant cette phase, l'utérus est en quiescence et la progestérone pourrait être impliquée. Ensuite, pendant les phases 1 à 3, l'utérus passe graduellement à un état activé, grâce à diverses substances appelées utérotrophines, protéines activatrices de l'utérus (UAPs) et utérotonines, lesquelles participent à la progression de la gestation vers le déclenchement du travail menant à l'accouchement. Modifié de : Kimura, T., et al. (1999). "What knockout mice can tell us about parturition." *Rev Reprod* 4(2): 73-80.

Au cours de ce processus physiologique (ou pathologique s'il est déclenché trop tôt), de nombreuses interactions ont lieu au niveau moléculaire. Les CX-43, favorisant la propagation de l'excitation et des messagers entre les myocytes, sont davantage exprimées sous l'effet des prostaglandines et de l'œstrogène alors que la présence de progestérone inhibe leur expression (Bolden, 2014; Romero et al., 2006). La progestérone maintient l'utérus en quiescence (Gimpl & Fahrenholz, 2001; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016), diminue la production de cytokines par les membranes fœtales en plus d'empêcher la maturation du col utérin alors que les œstrogènes permettent d'accroître la contractilité du myomètre et favorise la maturation du col utérin (Romero et al., 2006). Ainsi, la caduque est activée et la réponse tissulaire à la progestérone diminue à l'approche du travail en échange d'une synthèse accrue d'œstrogènes et de métalloprotéinases (MMPs; e.g. MMP-9), du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de l'isoforme C du récepteur de la progestérone (Richard

E Behrman & Butler, 2007; Challis, Patel, & Pomini, 1999; Christiaens et al., 2008; Goldenberg, Culhane, Iams, & Romero, 2008). Chez la souris, une baisse du niveau de progestérone se produit avant l'accouchement et déclenche le travail utérin alors que chez l'humain, l'absence de l'enzyme 17 α hydroxylase/17, 20 lyase (CYP 17) au sein du placenta empêche la conversion de la prégnénolone en œstradiol. Par conséquent, la progestérone demeure en circulation, mais son effet est moindre en raison d'une diminution de l'expression de ses récepteurs et de l'augmentation des œstrogènes (provenant notamment du placenta), lesquelles participent au déclenchement du travail utérin (Kota et al., 2013; Migale et al., 2016; Wahid et al., 2015). Les MMPs participent à la maturation du col utérin pendant le travail tandis que la croissance et le maintien de la caduque sont assurés par le VEGF (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Par ailleurs, la concentration intra-utérine de cortisol augmente suite à la baisse d'activité de l'enzyme prostaglandine déshydrogénase (PGDH), favorisant ainsi la production des prostaglandines (Challis et al., 1999; Christiaens et al., 2008; Goldenberg et al., 2008), lesquelles ont pour effet d'augmenter la sensibilité des tissus gestationnels aux agents utérotoniques ainsi que de stimuler et synchroniser les contractions myométriales (Cook et al., 2000; Goupil et al., 2010; Xu et al., 2015). En effet, les PGF_{2 α} et PGE₂, produites dans le myomètre, la caduque, le placenta et les membranes fœtales (Makino et al., 2007), lient leur récepteur respectif (FP et EP1 ou EP3) et participent à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), à l'induction de la contraction du myomètre et au remodelage du col utérin (Richard E Behrman & Butler, 2007; Hong et al., 2016; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016), à la séparation du placenta et l'involution utérine (Makino et al., 2007). Les prostaglandines pourraient également stimuler l'activation des cytokines, l'expression de l'OT et de son récepteur (OXTR) au sein de la caduque et l'expression du

VEGF tout en diminuant la sensibilité à la progestérone (Makino et al., 2007) et en assurant la viabilité cellulaire et l'intégrité de la matrice protéique par une voie autocrine/paracrine (Keelan et al., 2003). Il est également de plus en plus reconnu que le fœtus participe au mécanisme d'initiation du travail à l'aide d'hormones glucocorticoïdes (e.g. cortisol), lesquelles sont régulées par l'estriol du sérum maternel (Goldenberg et al., 2008; Goodwin, 1999; Jenkin & Young, 2004) et via la sécrétion de corticolibérine (corticotropin-releasing hormone ou CRH) par le placenta (McLean et al., 1995a). Le cortisol fœtal compétitionne avec la progestérone pour réguler la concentration de CRH dans la circulation maternelle, une hormone qui contribue à contrôler la contraction du myomètre et le déclenchement du travail utérin (Grammatopoulos & Hillhouse, 1999; Guzeloglu-Kayisli et al., 2015; McLean et al., 1995a; Romero et al., 2006). L'OT est aussi une molécule-clé dans la préparation et l'initiation du travail utérin en induisant la relâche de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (des membranes fœtales et de l'endomètre) et de PGE_2 (des tissus du col utérin) (Fuchs et al., 1995; Goldenberg et al., 2008). De plus, l'OT est responsable d'assurer le maintien des contractions du myomètre lors de la phase d'involution (phase 3), empêchant le saignement dû à la séparation du placenta (Richard E Behrman & Butler, 2007; Blackburn, 2013). Finalement, afin qu'une contraction myométriale ait lieu, la concentration de calcium intracellulaire doit augmenter favorisant la formation de complexes d'ions calciques liés à la calmoduline. Ces complexes vont ensuite activer les kinases des chaînes légères de myosine, ce qui hydrolyse l'adénosine triphosphate (ATP) et fournit l'énergie nécessaire aux fibres de myosine et d'actine pour interagir entre elles, induisant la contraction musculaire (Illanes et al., 2014).

Dans plusieurs cas, ces événements surviennent de manière plus précoce et donne lieu à la PTB.

1.2 La naissance prématurée

Tel que mentionné précédemment, la PTB, caractérisée par des contractions utérines, la rupture des membranes fœtales et une transformation du col utérin, (Romero et al., 2006) survient avant 37 semaines complètes de grossesse (Chmaj-Wierzchowska et al., 2016; Goldenberg et al., 2008; Haram, Mortensen, & Morrison, 2015). La naissance préterme a lieu suite à une activation pathologique d'une ou de nombreuses molécules participant au déclenchement du travail utérin menant à l'accouchement (e.g. chimiokines, leucocytes, cytokines pro-inflammatoires, prostaglandines, MMPs, UAPs) (Gomez-Lopez et al., 2010; Romero et al., 2006). L'avortement spontané diffère de la PTB et caractérise un accouchement qui survient avant 23 semaines de gestation, soit le seuil de viabilité du fœtus (Chmaj-Wierzchowska et al., 2016; Gotsch et al., 2009).

Malgré les avancées scientifiques dans le domaine de la périnatalogie au cours des dernières années, le taux de PTB reste élevé au sein des pays industrialisés (e.g. Canada, États-Unis, Europe) (Gracie et al., 2010) et a augmenté au Canada depuis les années 1980 (Klam & Leduc, 2004). Ceci peut s'expliquer par les observations suivantes : 1) l'augmentation des traitements de fécondation *in vitro*; 2) l'âge plus avancé des mères qui favorisent l'apparition d'autres problèmes de santé chronique; 3) la hausse du nombre d'interventions médicales en fin de grossesse qui accroît le nombre de prématurés tardifs (Blencowe et al., 2013).

Principale cause de mortalité et de morbidité néonatales et infantiles dans le monde, la naissance préterme est la première cause de mortalité au cours du premier mois de vie (Blencowe et al., 2012; Glass et al., 2015) en plus d'être responsable de 75% de la mortalité néonatale (la PTB est une cause directe de mortalité néonatale dans >27% des cas (Simmons

et al., 2010)) et de plus de 50% des atteintes et conséquences à long terme chez les nouveau-nés (Goldenberg et al., 2008).

Importante préoccupation de santé internationale, la PTB est perçue comme un syndrome en raison de sa complexité et de son hétérogénéité (Gotsch et al., 2009; Migale et al., 2016). Cinq caractéristiques lui ont été associées : « 1) plusieurs étiologies; 2) longue étape pré-clinique; 3) implication du fœtus fréquente ; 4) manifestations cliniques souvent de nature adaptative; 5) prédisposition à un syndrome particulier influencée par les interactions entre les gènes et l'environnement et/ou les interactions complexes entre des gènes maternels et fœtaux. » (Gotsch et al., 2009; Romero et al., 2006).

Bien que modérément présente dans le travail utérin à terme, l'inflammation est fortement impliquée dans la naissance préterme (Keelan et al., 2003; Romero et al., 2006). En présence d'infection (e.g. intra-utérine, intra-amniotique, streptocoque de groupe B), les molécules impliquées dans le travail physiologique (à terme) peuvent être induites plus tôt dans les tissus reproducteurs (myomètre, col utérin, membranes fœtales et caduque) et déclencher le travail de façon prématurée (Gomez-Lopez et al., 2010). L'interface fœto-maternel (entre le chorion et la caduque) est un micro-environnement inflammatoire (en présence ou en absence d'infection) où ont lieu de multiples interactions entre les cytokines pro-inflammatoires (e.g. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8) et les leucocytes (e.g. macrophages, neutrophiles, lymphocytes T et B), permettant la lyse du collagène tissulaire et participant à la maturation du col utérin ainsi qu'à la rupture des membranes fœtales (Gomez-Lopez et al., 2010; Keelan et al., 2003; Wahid et al., 2015). Cette rupture membranaire est favorisée par la digestion de la MEC sous l'effet des MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 et MMP-9, lesquelles sont produites en présence de l' $\text{IL-1}\beta$ et du $\text{TNF}\alpha$ (Gomez-Lopez et al., 2010; Gotsch et al.,

2007; Keelan et al., 2003). Les MMPs permettent également le remodelage et la réparation tissulaire en *postpartum* (Wahid et al., 2015).

Chez une patiente enceinte infectée, des chimiokines (e.g. CCL2, CCL3, IL-8, CXCL10) attirent les leucocytes dans les tissus reproducteurs où se trouvent les produits bactériens et engendrent le travail préterme. L'IL-8 assure le maintien de la réponse inflammatoire et de la production de prostaglandines, engendrant ainsi le déclenchement prématuré du travail utérin ou de la rupture des membranes (Gomez-Lopez et al., 2010). L'activation du système du complément (immunité innée) est uniquement impliquée dans le travail préterme (pour remodeler le col utérin) (Gonzalez, Dong, Romero, & Girardi, 2011).

1.2.1 Causes principales et facteurs de risque

La pathophysiologie de la PTB n'est pas complètement élucidée, mais il est reconnu que ce syndrome est multifactoriel (**Figure 1.2**). Dans certains cas, le travail préterme est idiopathique et l'activation du processus physiologique normal engendrant l'accouchement se produit plus tôt que prévu (Goldenberg et al., 2008). Le travail utérin peut aussi survenir spontanément (même si les membranes fœtales demeurent intactes ou dans les cas de rupture prématurée des membranes fœtales [PPROM]), ce qui représente deux tiers des accouchements avant terme (Blencowe et al., 2012; Goldenberg et al., 2008; Gotsch et al., 2009; Gracie et al., 2010; Guinn et al., 1995). L'utérus quiescent devient alors activé et les contractions engendrent la naissance du bébé avant terme (Blencowe et al., 2012, 2013; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Dans 50% des cas de PTB spontanée, la cause demeure inconnue (Blencowe et al., 2013).

Une multitude de facteurs de risque, tant génétiques et épigénétiques que environnementaux et sociaux, constituent des indicateurs de PTB (Blencowe et al., 2013; Cappelletti et al., 2016; Gracie et al., 2010). Être de nationalité africaine (Blencowe et al., 2013; Cappelletti et al., 2016; Gracie et al., 2010), un historique d'accouchement(s) prématuré(s) précédent(s) (Blencowe et al., 2013; Gracie et al., 2010; Guinn et al., 1995), un court col utérin (Goldenberg et al., 2008; Gracie et al., 2010; Guinn et al., 1995), un trauma ou une anomalie de l'utérus (Blencowe et al., 2013), des carences nutritionnelles chez la mère (Goldenberg et al., 2008; Gracie et al., 2010; Guinn et al., 1995), un stress maternel ou fœtal (Gracie et al., 2010; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006), les données démographiques de la mère (i.e. faible éducation, faible revenu, état civil célibataire, l'âge avancé ou très jeune) lors de la grossesse (Blencowe et al., 2013; Gracie et al., 2010), des excès d'alcool ou de tabac (Blencowe et al., 2013; Guinn et al., 1995) et une concentration importante de fibronectine fœtale figurent parmi les facteurs de risque et prédictors de naissance préterme spontanée (Blencowe et al., 2012; Goldenberg et al., 2008; Gotsch et al., 2009; Guinn et al., 1995).

Le tiers restant des naissances prématurées correspond à un travail prématuré iatrogénique, c'est-à-dire induit, ou encore à une naissance par césarienne pour le bien et la santé de la mère et/ou du fœtus (e.g. pré-éclampsie sévère, rupture du placenta ou de l'utérus, anomalies congénitales (Blencowe et al., 2013), restriction de croissance intra-utérine ou détresse fœtale (Blencowe et al., 2013; Gracie et al., 2010; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016), obésité, diabète (Blencowe et al., 2013; Cappelletti et al., 2016; Gracie et al., 2010), hypertension, asthme, maladies rénales (Blencowe et al., 2013)). Une pléiade d'autres étiologies (e.g. insuffisance du col utérin (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al.,

2006), surdistension de l'utérus (Adams Waldorf et al., 2015; Blencowe et al., 2013; Romero et al., 2006), ischémie utérine ou utéro-placentaire (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006), reconnaissance allogénique anormale (Cappelletti et al., 2016; Romero et al., 2006), désordres endocriniens (e.g. déficience en progestérone) (Goodwin, 1999; Romero et al., 2006), réaction de type allergique (Romero et al., 2006), maladies vasculaires, saignement vaginal et PPRM) sont liées à la PTB. De plus, la procréation assistée et les grossesses gémellaires augmentent le risque de travail préterme (Goldenberg et al., 2008; Gotsch et al., 2009; Gracie et al., 2010) jusqu'à dix fois (Blencowe et al., 2013). Une association a aussi été établie entre la PTB et la génétique (polymorphismes et interactions gène-gène ou gène-environnement) ou le nombre de leucocytes chez la mère (Goldenberg et al., 2008; Gracie et al., 2010; Guinn et al., 1995). Le risque de naissance préterme s'accroît aussi en présence d'infections urinaires, de malaria, de VIH (virus d'immunodéficience humaine), de syphilis ou de vaginose bactérienne chez la mère (Blencowe et al., 2013). Cependant, malgré les nombreuses causes probables, la plupart étant d'ailleurs liées à une inflammation systémique accrue, seules l'infection et l'inflammation intra-utérine sont officiellement considérées comme causant le PTL, représentant entre 25 et 40% des naissances prématurées (Gotsch et al., 2009; Haram et al., 2015; Illanes et al., 2014; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006).

La détection des femmes enceintes à risque de PTB est difficile puisqu'aucun signe ou symptôme observé en clinique n'explique pourquoi le travail préterme a commencé (Gotsch et al., 2009). Parmi les marqueurs biologiques ayant un lien avec le PTL, très peu ont une utilité envisageable en clinique en raison de leurs faibles sensibilité et spécificité, de leur variabilité élevée entre individus et d'un faible taux de valeurs prédictives positives (Gracie et al., 2010).

Par ailleurs, plusieurs marqueurs pro-inflammatoires (e.g. cytokines et chimiokines) ou encore la MMP-9 et l'œstriol augmentent significativement à l'approche du travail, mais trop tardivement pour que l'intervention améliore significativement la situation du nouveau-né. En effet, à ce stade, le risque de morbidités est très faible (Goldenberg et al., 2008). Marqueur d'une perturbation choriociduaire, seule la présence de fibronectine fœtale dans le liquide cervicovaginal est pertinente pour identifier les femmes à risque d'accoucher prématurément (Goldenberg et al., 2008; Hamilton & Tower, 2010; Iams et al., 2008). On peut également procéder à un examen du col utérin (e.g. score Bishop) ou à une sonographie transvaginale du col de l'utérus afin d'identifier la population à risque de donner naissance avant terme (Hamilton & Tower, 2010; Haram et al., 2015; Iams et al., 2008). La corticolibérine (corticotropin-releasing hormone) maternelle correspond aussi à un biomarqueur étudié pour cibler les femmes à risque d'accouchement prématuré (Gracie et al., 2010).

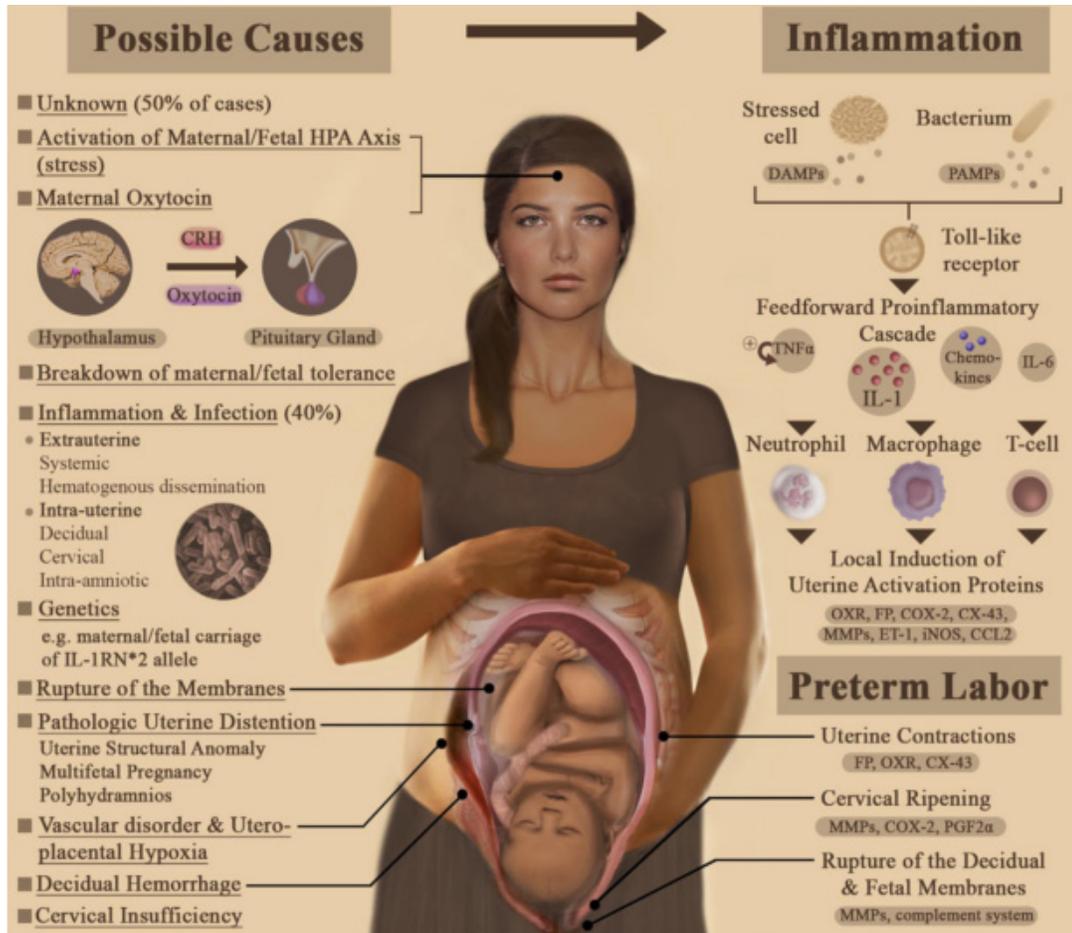


Figure 1.2 | La naissance prématurée. Une multitude de causes de PTB, la cascade inflammatoire (commune à de nombreuses étiologies) et les molécules impliquées dans l'induction du PTB (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). *Reproduit avec la permission de Dima Obari, créatrice du schéma.*

Une meilleure compréhension des causes de chaque catégorie de PTB va permettre l'amélioration des pratiques médicales pour réduire l'ampleur des conséquences de ce fléau mondial en plus de servir de point de départ pour développer de nouveaux traitements de prévention de PTB.

1.2.2 Conséquences de la naissance prématurée

Au cours des dernières années, les soins donnés aux prématurés se sont améliorés notamment grâce à l'administration de surfactant, à l'utilisation de la ventilation assistée et des corticostéroïdes anténataux (Iacovidou et al., 2010). Cependant, en raison d'un meilleur taux de survie dans les dernières années chez la population de prématurés, les cas de morbidités rencontrés sont plus nombreux (Glass et al., 2015).

La PTB accroît également le risque de décéder suite à une infection néonatale (e.g. tétanos, diarrhée) (Blencowe et al., 2012). Les enfants nés à 24 semaines de gestation ou moins ont un risque important de décéder (x120 (Gotsch et al., 2009)) ou d'être affectés par une ou plusieurs morbidités (Anderson et al., 2016). Ce syndrome (la PTB) induit des atteintes touchant plusieurs organes, lesquelles peuvent persister à l'âge adulte (Glass et al., 2015). Par exemple, le syndrome de détresse respiratoire (RDS; *respiratory distress syndrome*) (Gracie et al., 2010), l'hémorragie intra-ventriculaire (IVH; *intraventricular hemorrhage*), l'entérocolite nécrosante (NEC ; *necrotizing enterocolitis*), la rétinopathie du prématuré (ROP; *retinopathy of prematurity*) (Arenas-Hernandez et al., 2015; Bhandari et al., 2016; Gracie et al., 2010) et le sepsis néonatal sont des complications à court terme possible alors que la paralysie cérébrale (Arenas-Hernandez et al., 2015; Bhandari et al., 2016; Blencowe et al., 2012; Gracie et al., 2010), la maladie pulmonaire chronique, les difficultés d'apprentissage et troubles de comportement, le retard de développement (Blencowe et al., 2012; Gracie et al., 2010), la cécité (Blencowe et al., 2012; Gracie et al., 2010) et la surdité (Arenas-Hernandez et al., 2015; Bhandari et al., 2016; Gracie et al., 2010) sont des complications à long terme possible (Gotsch et al., 2009; Haram et al., 2015). Les enfants nés prématurément ont également un

risque plus élevé de développer une maladie chronique une fois devenus adultes (Blencowe et al., 2012). Plus l'âge gestationnel et le poids à la naissance sont faibles, plus grand est le risque d'être atteints d'au moins une morbidité citée précédemment (Blencowe et al., 2013; Gracie et al., 2010). Même les prématurés tardifs (i.e. nés à 34-36 semaines inclusivement; représentant 75% des prématurés (Gracie et al., 2010)) auraient une augmentation du risque de détresse respiratoire et d'IVH (Blencowe et al., 2013), de paralysie cérébrale, de mortalité néonatale et infantile ainsi que d'être moins performants au niveau neuro-développemental et à l'école (Blencowe et al., 2012).

Un âge gestationnel plus élevé, un poids à la naissance plus élevé, être de sexe féminin et accoucher par césarienne sont des facteurs favorisant la survie néonatale (Anderson et al., 2016). Les garçons prématurés (correspondant à 55% des PTB) sont davantage à risque de mortalité et de déficits à long terme (Blencowe et al., 2012).

En plus des conséquences physiques et physiologiques sur le nouveau-né qui est arrivé trop tôt, la PTB représente un fardeau économique et social énorme pour la société qui doit supporter les coûts de l'hospitalisation et des soins intensifs accordés à ces petits êtres fragiles, mais également pour la famille (Blencowe et al., 2012; Gracie et al., 2010). Cette dernière peut être confrontée à la perte d'un enfant prématuré, à un long séjour à l'hôpital et aussi au recours à des services sociaux pour favoriser le bon développement et le bon déroulement de l'éducation de leur enfant s'il rencontre des difficultés ou retards de développement (Blencowe et al., 2012). Les coûts relatifs aux soins requis par les prématurés à court et à long terme demeurent importants; correspondant à 8% des naissances aux États-Unis, les enfants prématurés à faible poids à la naissance requièrent des soins totalisant 47% des coûts liés à l'hospitalisation de nouveau-nés (Barradas et al., 2016; Haas et al., 2014). Au Canada, environ

8% des naissances sont prématures en 2009-2010 (Johnston et al., 2014), et un rapport du *Canadian Institute for Health Information*, publié en 2006, indique que plus de 179 millions de dollars ont été alloués à l'hospitalisation et aux soins néonataux de prématurés (Canadian Institute for Health Information, 2006). Par ailleurs, l'étude de Johnston et al. qui est basée sur des informations provenant du Québec (i.e. Régie de l'assurance maladie du Québec), rapporte que le coût des soins donnés aux prématurés canadiens dans les dix premières années de vie (1996-2006) s'élèvent à plus de 587 millions de dollars (Johnston et al., 2014).

Prévoir les conséquences d'une PTB peut s'avérer compliqué puisqu'il faut tenir compte de plusieurs éléments qui interagissent ensemble, notamment l'âge gestationnel et le poids du fœtus (Iacovidou et al., 2010), mais surtout la présence d'infection ou d'inflammation (systémique ou localisée dans l'utérus) due à un micro-organisme (bactérie, virus, champignon) (Cappelletti et al., 2016).

1.3 L'inflammation

L'inflammation est une réponse immunitaire qui peut être bénéfique, par exemple, lorsqu'elle sert à limiter la propagation de l'infection, attirer certaines cellules et molécules localement pour enrayer l'infection ou en favorisant la réparation tissulaire. Cependant, lorsque le processus inflammatoire est chronique ou exagéré, la réponse immunitaire devient pathologique (Gotsch et al., 2007). L'inflammation se caractérise notamment par une vasodilatation des vaisseaux sanguins, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL-1 β , IL-8, TNF α (Romero et al., 2006)), de médiateurs inflammatoires (e.g. prostaglandines, leucotriènes, oxyde nitrique, espèces réactives oxygénées, PAF) et chimiokines, par une diminution de l'expression des cytokines anti-inflammatoires (e.g. IL-10) (Romero et al., 2006) ainsi qu'une migration de cellules immunitaires au site affecté (Gotsch et al., 2007; Rock et al., 2010). C'est pourquoi les signes cliniques d'une inflammation sont la rougeur, la chaleur, l'enflure, la douleur et la perte de fonction (Gotsch et al., 2007).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire, exprimée dans l'utérus et le placenta au cours de la grossesse, qui limite l'inflammation dans les tissus gestationnels ainsi que les lésions tissulaires subséquentes (Cappelletti et al., 2016) et aide au maintien de la grossesse (Romero et al., 2006).

L'infection et l'inflammation sont des facteurs de risque bien reconnus de la PTB (Cappelletti et al., 2016), surtout chez les grands prématurés (Migale et al., 2016). L'inflammation contribue à la dilatation du col utérin (Gomez-Lopez et al., 2013) et est fortement impliquée dans la rupture du follicule ovarien, l'implantation du blastocyste et le

travail utérin (Gomez-Lopez et al., 2013; Gotsch et al., 2007) à terme (TL) et préterme (PTL), même en l'absence d'infection (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). L'inflammation a aussi un impact sur les morbidités touchant les prématurés. En effet, elle favorise d'une part la maturation pulmonaire mais induit d'autre part une vulnérabilité aux maladies pulmonaires chroniques et aux dommages cérébraux (e.g. IVH, paralysie cérébrale, leucomalacie périventriculaire) (Gracie et al., 2010). Environ un tiers des PTB est associé à l'infection ou l'inflammation (Migale et al., 2016).

L'induction du travail utérin, même à terme, implique une transition d'un état non-inflammatoire vers un état inflammatoire chez la mère et à l'interface foeto-maternel (Arenas-Hernandez et al., 2015; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016) (où un déséquilibre entre l'immunité innée et l'immunité adaptative se produit), ce qui favorise l'activation utérine menant à l'accouchement (Arenas-Hernandez et al., 2015). Les voies de signalisation impliquées dans le travail préterme sont similaires chez l'humain et la souris (Migale et al., 2016). Une hausse de production de cytokines et chimiokines au sein de l'utérus, du col utérin, des membranes fœtales et du placenta est suivie par l'induction des prostaglandines (qui promeuvent les contractions utérines (Cappelletti et al., 2016; Illanes et al., 2014), le recrutement de leucocytes dans les tissus gestationnels et l'augmentation de l'expression des UAPs (définies en détails en introduction page 3) (Gomez-Lopez et al., 2013; Gotsch et al., 2007; Wahid et al., 2015).

Les récepteurs de type toll (TLRs), activés par des molécules relâchées par des microbes (*pathogen-associated molecular patterns* [PAMPs]) ou suite à un stress ou une lésion tissulaire (*damage-associated molecular patterns* [DAMPs]), font partie du système immunitaire inné et engendrent la production de cytokines pro-inflammatoires, de

chimiokines, de prostaglandines ainsi que des CX-43 (Cappelletti et al., 2016), en plus d'induire l'extravasation des leucocytes dans les tissus gestationnels (e.g. placenta, membranes fœtales, caduque, col utérin, liquide amniotique) (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Wahid et al., 2015). Les TLRs sont exprimés à la surface des cellules immunitaires et non-immunitaires, notamment dans le placenta, la caduque, les membranes (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016) et l'épithélium amniotique (Romero et al., 2006) durant la grossesse. Plus spécifiquement, le TLR2 reconnaît les lipoprotéines (Wahid et al., 2015) des bactéries à Gram positif alors que le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) (Wahid et al., 2015) des bactéries à Gram négatif (Cappelletti et al., 2016; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006). D'autres TLRs vont reconnaître des molécules endogènes produites à la suite d'une lésion tissulaire (Cappelletti et al., 2016). Chez la souris, l'emploi du LPS va activer le TLR4 alors que l'administration de l'acide lipotéichoïque (LTA) va activer le TLR2; tous deux vont augmenter l'expression de gènes pro-inflammatoires et pro-travail au sein de l'utérus, menant ultimement à la naissance préterme (Cappelletti et al., 2016; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Wahid et al., 2015).

Le fœtus peut être impliqué dans l'induction du PTL dans un contexte inflammatoire systémique, par exemple dans un cas de syndrome de réponse inflammatoire fœtale (FIRS), lequel peut mener à une PTB (Gotsch et al., 2007; Romero et al., 2006). Le cas échéant, le système immunitaire inné fœtal réagit à une infection intra-utérine, un virus ou à une PPRM ainsi qu'à un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL-6) (Gotsch et al., 2007).

1.3.1 L'inflammasome et l'interleukine-1

De plus en plus d'évidences démontrent que l'interleukine (IL)-1 est un inducteur majeur de l'inflammation dans le PTL en présence d'infection, d'inflammation aigue ou encore dans le PTL spontané (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006). Par ailleurs, une grande concentration d'IL-1 β chez le fœtus peut engendrer des dommages dans plusieurs organes ainsi que des lésions neurologiques (Sharma et al., 2015).

Parmi les évidences accumulées, on retrouve l'effet pro-contractile sur le myomètre (Gracie et al., 2010; Romero et al., 2006) (en modulant la signalisation calcique (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016)) et la stimulation de la production de prostaglandines (Romero et al., 2006) (e.g. PGHS-2 ou COX-2, PGE₂, PGF_{2 α}), lesquelles contribue à la maturation du col utérin tant dans le TL que le PTL (Gracie et al., 2010; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Une hausse des niveaux d'IL-1 dans le myomètre, les membranes fœtales et le col utérin a été observée à l'accouchement chez l'humain, même en absence d'infection (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Le PTL a été associé à une concentration élevée d'IL-1 β dans le liquide amniotique de femmes enceintes infectées ou dans le plasma maternel (Gracie et al., 2010; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). L'IL-1 induit l'expression génique des UAPs dans des cellules humaines dérivées de l'utérus (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). De plus, chez les animaux qui reçoivent l'IL-1 pendant la gestation, le PTL est induit et suivi par la PTB (évitable lorsqu'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 est administré) (Gracie et al., 2010; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). L'IL-1 β administrée chez la souris produit une activation utérine et résulte en l'augmentation de la contractilité myométriale, tout comme chez l'humain. Finalement, l'IL-1 influence la dégradation de la progestérone (menant au travail

utérin), altérant le maintien de la quiescence utérine, la relâche de CRH provenant du placenta humain ainsi que l'expression du récepteur CRH-R1 dans le myomètre. D'autres études suggèrent un rôle pour IL-1 dans la régulation d'hormones telles que l'ocytocine, l'endothéline-1 et l'œstrogène (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016).

L'IL-1 β requiert deux signaux distincts afin d'être produit sous sa forme active. D'abord, en présence d'infection, des molécules sécrétées par des cellules subissant un stress ou encore des produits bactériologiques sont reconnus par les TLRs, ce qui favorise l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) ainsi que la production intracellulaire des précurseurs inactifs de l'IL-1 β et de la caspase-1 : pro-IL-1 β et pro-caspase-1 (Lappas, 2014; Rock et al., 2010; Sharma et al., 2015). Le second signal implique un clivage protéolytique du pro-IL-1 β par la caspase-1 (Rock et al., 2010) dans un inflammasome spécifique : le *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, pyrin domain containing 3* (NLRP3) (Lappas, 2014; Sharma et al., 2015). L'inflammasome est un complexe de plusieurs unités (e.g. molécule senseur [*pattern recognition receptors*], protéine adaptatrice ASC, pro-caspase-1) qui est exprimé et activé suite à la production accrue de NLRP3 (molécule senseur de l'inflammasome) et de médiateurs tels que les radicaux libres, l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'adénosine triphosphate (ATP) (Sharma et al., 2015) et ce, en présence de stressseurs (reconnu par les DAMPs ou PAMPs) ou lors d'un TL spontané (en contexte d'inflammation stérile) (Romero et al., 2016). Une fois l'inflammasome activé, la pro-caspase-1 subi un clivage auto-catalytique pour devenir sa forme active (caspase-1). Ainsi, l'IL-1 β provenant des membranes fœtales devient mature suite à son passage dans l'inflammasome où sa forme inactive est hydrolysée sous l'action de la caspase-1 (Rock et al., 2010; Romero et al., 2016).

Dans le contexte inflammatoire dû à la chorioamniotite, l'IL-1 β induit l'expression des prostaglandines dans la caduque et inhibe l'expression des récepteurs de la progestérone, contribuant grandement à la prématurité. La chorioamniotite correspond à une inflammation à l'interface fœto-maternel, engendrant la relâche de cytokines, puis la maturation du col utérin, la rupture des membranes (i.e. PPRM) et l'activation du myomètre (Guzeloglu-Kayisli et al., 2015).

En raison d'une redondance dans le réseau de cytokines pro-inflammatoires lié à la PTB, l'absence d'une cytokine (e.g. IL-1 β) peut être compensée par la présence d'IL-6 ou IL-8 par exemple. C'est la raison pour laquelle la prévention du PTL par l'inhibition d'une seule cytokine peut être insuffisante en contexte infectieux (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016; Romero et al., 2006).

Dans les dernières décennies, la recherche en périnatalogie et prématurité a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action et molécules impliquées, même si le schéma global demeure incomplet. Quand est-il du milieu clinique?

1.4 Contexte clinique actuel

En dépit de tous les facteurs de risque listés précédemment, il n'est pas évident d'évaluer les patientes enceintes et de distinguer celles qui sont à risque d'accoucher prématurément. Selon les pays, les facteurs socio-culturels et les pratiques cliniques diffèrent quant à la définition du seuil de viabilité (entre 22 et 24 sem dans les pays développés; 32 sem dans les pays en développement (Blencowe et al., 2013)), aux façons d'établir l'âge gestationnel et à la classification des conditions médicales (e.g. anomalies congénitales, grossesses multiples, bébés mort-nés). De plus, les pays développés et en développement ne disposent pas des mêmes moyens et du même matériel (Blencowe et al., 2013). Les statistiques qui en découlent sont d'ailleurs nettement influencées par ces divergences et rendent les comparaisons difficiles.

Certains biomarqueurs (fibronectine fœtale, CRH maternel) ont été étudiés afin de cibler les patientes à risque de PTL, mais leur sensibilité et spécificité sont faibles (Gracie et al., 2010).

Actuellement, il est reconnu que les cliniciens administrent des corticostéroïdes anténataux, un ou plusieurs tocolytiques, des antibiotiques (surtout avant 20 semaines de grossesse pour traiter la vaginose bactérienne et prévenir l'infection au streptocoque de groupe B chez le prématuré) dans le but de réduire la mortalité et les morbidités néonatales (Iams et al., 2008). De plus, afin de contrer la PTB et/ou ses complications, quelques méthodes existent présentement. Il s'agit du cerclage du col utérin (plus efficace en absence d'inflammation chez les femmes ayant déjà accouché prématurément), de la mise en place d'un pessaire vaginal, de l'induction de la tocolyse, de l'administration d'antibiotiques (e.g. clindamycine,

erythromycine, metronidazole), de corticostéroïdes anténataux (e.g. betaméthasone, dexaméthasone), d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de progestérone vaginale (Haas et al., 2014; Haram et al., 2015; Iams et al., 2008; Illanes et al., 2014).

Dans les 15 dernières années, le taux de mortalité néonatale a connu une baisse de 2,4% par an (tendance générale mondiale) (Gulmezoglu et al., 2016). En dépit des progrès scientifiques visant à réduire le taux de mortalité néonatale, les complications dues à la PTB représentent la principale cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans (Gulmezoglu et al., 2016). Il est donc primordial de poursuivre les recherches et les études afin de trouver des solutions à ce fléau mondial.

1.4.1 La classification des nouveau-nés prématurés

Dans le milieu clinique, les naissances prématurées sont catégorisées selon divers aspects tels que l'âge gestationnel à la naissance (i.e. la durée de la grossesse exprimée en semaines complétées), le poids à la naissance (Blencowe et al., 2012), les facteurs *antepartum* et *intrapartum* (e.g. stress maternel ou fœtal, comorbidités chez la mère), les caractéristiques du fœtus (e.g. anomalies congénitales, grossesses multiples) (Esplin, 2016), l'histologie du placenta (Catov et al., 2017; Chisholm et al., 2016; Esplin, 2016) ou encore la nature (spontanée ou idiopathique) de la PTB (Blencowe et al., 2012; Goldenberg et al., 2008).

Plus l'âge gestationnel et le poids à la naissance sont faibles, plus les risques de complications et de morbidités sont grands et plus les soins néonataux requis seront importants (Blencowe et al., 2012). L'une des classifications selon l'âge gestationnel divise les prématurés en 3 groupes, soient les prématurés extrêmes (avant 28 sem), les grands prématurés (28 sem à moins de 32 sem) ou les prématurés modérés à tardifs (32-36 sem

inclusivement) (Blencowe et al., 2012; Gotsch et al., 2009). Une autre classification selon l'âge gestationnel des nouveau-nés existe et consiste en 4 groupes : naître avant 28 sem correspond à une prématurité extrême (environ 5% des PTB); naître entre 28 et 31 sem complètes de gestation représente une prématurité sévère (approximativement 15% des PTB); une naissance à 32 ou 33 sem de gestation est considérée comme une prématurité modérée (environ 20% des PTB); puis entre 34 et 36 sem de gestation, les bébés naissants sont appelés prématurés tardifs (60-70%) (Goldenberg et al., 2008; Hamilton & Tower, 2010). Selon le poids à la naissance, les prématurés sont catégorisés ainsi : très petit poids (*very low birth weight*; < 1500 grammes) et extrême petit poids (*extremely low birth weight*; < 1000 grammes) (Glass et al., 2015).

Il est difficile de pouvoir établir des comparaisons entre les différentes naissances prématurées dans le monde puisqu'aucun système de classification n'est uniforme quant aux définitions d'une PTB en soi ou par rapport aux caractéristiques cliniques observées. Il est donc nécessaire de mettre en place un système de classification universel et standardisé qui tiendra compte des définitions cliniques uniformes, des données enregistrées sur les patient(e)s, des évaluations effectuées en laboratoire, mais aussi du phénotype clinique global, c'est-à-dire des aspects liés à la mère, au fœtus, au placenta de même qu'aux caractéristiques de l'accouchement (Esplin, 2016).

1.4.2 Survie *versus* décès chez les nouveau-nés prématurés

Le nombre de naissances prématurées tend à augmenter depuis les deux dernières décennies, excepté pour trois pays (i.e. Équateur, Croatie, Estonie) qui voient une diminution de PTB (Blencowe et al., 2012). Le taux de prématurité varie selon les régions : autour de 12-

13% aux États-Unis, entre 5 et 9% en Europe et dans d'autres pays développés (Illanes et al., 2014) alors que dans certains pays d'Afrique (e.g. Malawi), c'est plutôt 15-18% des naissances qui sont prématurées (Arenas-Hernandez et al., 2015; Blencowe et al., 2012). Au Canada, entre 7,5% et 8,2% des naissances vivantes survenues de 2001 à 2010 correspondent à des PTB (Public Health Agency of Canada, 2013). Globalement, il y a environ 15 millions de naissances prétermes annuellement (données rassemblées dans un total de 184 pays); la plupart survenant en Asie du sud-est et en Afrique subsaharienne (e.g. Inde, Chine, Nigeria, Pakistan, Indonésie, Bangladesh, Philippines, République démocratique du Congo). Parmi les pays développés, ce sont les États-Unis qui ont le taux de PTB le plus haut. Environ 84% de ces naissances prématurées se produisent entre 32 et 37 semaines de grossesse, ce qui correspond à des prématurés modérés à tardifs (Blencowe et al., 2012). Chez les prématurés tardifs (nés entre 33 et 36 semaines de gestation), le risque de mortalité au cours de la première année de vie (syndrome de mort subite du nourrisson [SMSN]) est nettement supérieur par rapport à la population des bébés nés à terme (Gotsch et al., 2009).

En raison des inégalités sociales, le devenir de ces nouveau-nés peut différer. Autrement dit, au-delà de 60% des prématurés nés avant 28 semaines vont survivre dans les pays développés (les deux tiers n'ayant pas de problèmes de santé à long terme), comparativement à 10% ou moins dans les pays en développement (parmi lesquels plusieurs vont décéder après quelques jours). Ceci peut s'expliquer par la différence d'accès aux soins intensifs néonataux (Blencowe et al., 2012). La comparaison de bébés d'origine différente (pour un même âge gestationnel) a notamment permis d'établir un constat, quoique paradoxal : même si les bébés de descendance africaine viennent au monde généralement plus tôt que leurs homologues caucasiens, ils seraient moins susceptibles d'être affectés par une détresse

respiratoire, de mourir dans la période néonatale et de nécessiter des soins spéciaux (Blencowe et al., 2013).

De plus, il existe une grande différence dans l'âge gestationnel à partir duquel le nouveau-né prématuré a 50% de chances de survie selon les pays : dans les pays développés, on parle de 24 semaines de grossesse, alors que dans les pays moins fortunés dans lesquels les soins de base sont moins accessibles, on parle plutôt de 34 semaines (Blencowe et al., 2012).

Il est important de noter que les comparaisons entre pays sont parfois difficiles, puisque selon les pays, les outils diagnostiques diffèrent ainsi que les définitions de bébé mort-né et de prématurité en plus de changer avec les années. Il y a également de la variation dans les données de rapports médicaux conservés par rapport à l'inclusion et l'exclusion d'anomalies congénitales, de naissances uniques ou multiples, etc. (Blencowe et al., 2012).

1.4.3 Les classes de tocolytiques

En clinique, il est ardu de cibler les femmes enceintes à risque et de prédire les naissances prématurées (Bolden, 2014). Les critères diagnostiques sont variés et nécessitent plus d'uniformité (Haram et al., 2015). Il est plus facile de gérer les contractions myométriales que les causes de PTB. Ainsi, l'une des options des spécialistes de la santé est le recours aux tocolytiques (i.e. agents inhibant les contractions donc induisant la tocolyse) afin de cesser les contractions utérines et de prolonger la grossesse suffisamment (i.e. de 2 à 7 jours) pour permettre l'administration de corticostéroïdes anténataux. Ceux-ci réduisent la mortalité néonatale, le risque de plusieurs morbidités (e.g. bronchodysplasie pulmonaire, RDS, IVH, NEC) et favorisent la maturation pulmonaire du fœtus (i.e. production de surfactant) (Haas et al., 2014; Haram et al., 2015; Iams et al., 2008). De plus, les tocolytiques utilisés à court terme

(même si ces agents ont été approuvés pour d'autres indications que la tocolyse) (Klam & Leduc, 2004) donnent un délai qui permet de rassembler le personnel médical et les ressources nécessaires pour gérer les possibles complications liées à la prématurité (Haram et al., 2015). La tocolyse de maintenance n'est toutefois pas recommandée puisqu'aucun bénéfice ne peut en être tiré et peut parfois être néfaste (Bolden, 2014; Haas et al., 2014). L'administration de tocolytiques n'est pas envisageable non plus dans les cas de décollement du placenta ou de chorioamniotite puisque le fœtus est menacé (Haram et al., 2015). Les tocolytiques actuels n'améliorent malheureusement pas la santé du nouveau-né en soi; c'est le prolongement de la grossesse (et donc la poursuite du développement fœtal) qui diminue le risque de complications néonatales. De plus, on a généralement recours à ces agents entre 24 et 34 sem de grossesse (Bolden, 2014), ce qui est souvent trop tard pour prévenir l'accouchement (puisque les contractions ont déjà commencé) (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Il existe quelques classes d'agents pharmacologiques visant à induire une tocolyse.

1.4.3.1 β -mimétiques

Cette classe d'agents tocolytiques est abondamment utilisée et inclut la terbutaline, la ritodrine (qui sont les plus connus aux États-Unis et au Canada), mais aussi le salbutamol, l'albuterol, le fenoterol, la prenaline, le metaproterenol, la nylidrine, et l'orciprenaline (utilisés ailleurs dans le monde). Ils lient les récepteurs β_2 -adrénergiques, interfèrent avec la quantité de calcium intracellulaire disponible et minimisent la contractilité du myomètre. Toutefois, ces agonistes β_2 -adrénergiques ont une durée d'action limitée ainsi que des effets indésirables notables chez la mère et chez le fœtus (Haas et al., 2014; Klam & Leduc, 2004). Ces effets secondaires sont amplifiés par l'usage de combinaison de tocolytiques (Haram et al., 2015). En raison d'un manque de spécificité (une liaison au récepteur β_1 -adrénergique est aussi

possible), des effets secondaires cardiaques (e.g.tachycardie, hypotension, palpitations) de même que des tremblements, l'essoufflement, des céphalées, la congestion nasale et l'hyperglycémie peuvent survenir chez la mère. Plus rarement, ces agents induisent un œdème pulmonaire, des arythmies, un infarctus du myocarde voire la mort. Finalement, les β -mimétiques n'améliorent pas la santé des prématurés et ne sont pas considérés comme des tocolytiques de premier choix (Klam & Leduc, 2004). Ils sont donc de moins en moins utilisés et la ritodrine a même été retirée des marchés américain et canadien (Bolden, 2014; Haas et al., 2014; Haram et al., 2015).

1.4.3.2 Bloqueurs de canaux calciques

Les bloqueurs de canaux calciques (e.g.nifedipine, nicardipine) inhibent la contraction en empêchant l'influx de calcium dans les cellules myométriales et l'activation de la myosine, ce qui prolonge la grossesse. Ayant des effets secondaires plus légers chez la mère (e.g.céphalée, rougeur, hypotension si pris en sublingual, et parfois œdème pulmonaire, dyspnée et infarctus du myocarde), la nifédipine induit une tocolyse efficace et est plus sécuritaire que les agents de la classe précédente. Ainsi, les bloqueurs de canaux calciques constitueraient de bons tocolytiques de première ligne et semblent être parmi les plus sécuritaires également. En effet, ils diminuent les risques de complications (e.g.RDS, NEC, IVH, jaunisse) chez les nouveau-nés. Par conséquent, ce sont les agents les plus populaires présentement (Bolden, 2014; Flenady et al., 2014; Haas et al., 2014; Haram et al., 2015; Klam & Leduc, 2004).

1.4.3.3 Donneurs d'oxyde nitrique

En administrant la nitroglycérine (favorisant la vasodilatation et la relaxation musculaire), le risque d'accoucher prématurément est plus faible et peu d'effets secondaires sont rencontrés. Ainsi, le risque de morbidités et de mortalité néonatale est significativement moindre. Par contre, les données accumulées chez l'humain concernant l'effet tocolytique des donneurs d'oxyde nitrique ne sont pas unanimes. Ainsi, la nitroglycérine semble moins prometteuse malgré le fait qu'elle soit mieux tolérée (Haas et al., 2014; Haram et al., 2015; Klam & Leduc, 2004).

1.4.3.4 Antagonistes du récepteur de l'ocytocine

Ayant l'un des meilleurs profils de sécurité chez la mère et le fœtus, l'atosiban est un agent tocolytique qui interfère avec le calcium intracellulaire et inhibe la contraction myométriale. Seulement disponible cliniquement en Europe, l'atosiban cause de l'hypersensibilité (type IV) et d'autres réactions mineures au site d'injection (l'administration se fait par voie intra-veineuse) (Haas et al., 2014; Klam & Leduc, 2004). Malgré une étude montrant que l'atosiban est efficace pour prolonger certaines grossesses lorsqu'administré tôt (Nanetti et al., 2015) et une thérapie de maintenance sécuritaire (Klam & Leduc, 2004), la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis a certaines réserves concernant ce produit à cause d'une autre étude qui a associé la mortalité fœtale chez les extrêmes prématurés (< 26 sem de grossesse) à la prise d'atosiban (Haas et al., 2014). Cependant, d'autres études seraient les bienvenues puisque les résultats obtenus sont questionnables pour les raisons suivantes : 1) la randomisation n'était pas adéquate (davantage de femmes à moins de 26 sem de grossesse se sont retrouvées dans le groupe recevant l'atosiban); 2) plusieurs

facteurs confondant ont pu amener un biais dans les résultats. Pour le moment, aucun avantage significatif n'a été attribué à l'atosiban par rapport aux autres agents tocolytiques en ce qui a trait à l'amélioration des complications néonatales (Haas et al., 2014). De plus, il semble que les bloqueurs des canaux calciques soient plus efficaces pour induire la tocolyse (Haram et al., 2015).

1.4.3.5 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou inhibiteurs de cyclo-oxygénases

L'indométhacine est le principal représentant de cette classe de tocolytiques utilisés en clinique (agent de 2^e ligne (Klam & Leduc, 2004)) pour contrer la synthèse des prostaglandines (générées à partir de l'acide arachidonique, grâce aux cyclo-oxygénases), lesquelles favorisent la contraction myométriale (Bolden, 2014; Haas et al., 2014). Ainsi, les inhibiteurs des prostaglandines minimisent la formation de jonctions communicantes entre les cellules de même que le niveau de calcium intracellulaire et l'activation de la myosine. Les inhibiteurs de prostaglandines figurent parmi les plus efficaces pour prolonger la grossesse de 48 heures (h). Toutefois, l'indométhacine est seulement utilisé chez les patientes ayant plus de 32 sem de grossesse (à la plus faible dose efficace (Antonucci et al., 2012)) afin d'éviter des problèmes de fermeture du ductus arteriosus (Haas et al., 2014; Klam & Leduc, 2004). De plus, en se rendant au placenta, cette molécule cause des effets indésirables chez le fœtus tels que l'oligohydramnios, l'oligurie, la constriction du ductus arteriosus (Haram et al., 2015; Hirst et al., 2005) et augmente le risque de NEC et d'IVH chez le bébé prématuré (Klam & Leduc, 2004). L'usage prolongé de ce médicament peut affecter les reins, les poumons, le squelette, le système cardiovasculaire et le cerveau du nouveau-né (Antonucci et al., 2012).

1.4.3.6 Autres (e.g. alcool, relaxine, sulfate de magnésium, progestérone)

Parmi les autres agents étudiés en obstétrique pour inhiber les contractions figurent l'alcool, la relaxine, le sulfate de magnésium et la progestérone. D'abord, l'alcool ne fait plus partie de l'arsenal thérapeutique depuis les années 1970 en raison des nombreux effets secondaires pour la mère et le fœtus, mais aussi étant donné que d'autres agents sont disponibles, efficaces et plus sécuritaires (Haas et al., 2014).

La relaxine a été testée chez des modèles animaux, mais ne s'est pas avérée efficace chez l'humain. De plus, il se peut qu'elle favorise la PTB plutôt que de la prévenir. Par conséquent, les cliniciens ne l'utilisent pas présentement (Bain, Heatley, Hsu, & Crowther, 2013).

Malgré une tocolyse dont l'efficacité est controversée, le sulfate de magnésium continue d'être adopté en obstétrique pour son effet neuroprotecteur bien établi chez les prématurés (Bolden, 2014; Haram et al., 2015; Jacquemyn, Zecic, Van Laere, & Roelens, 2015). Son autre avantage est qu'il prévient l'éclampsie chez la mère (Illanes et al., 2014). Administré avant 32 sem de grossesse, il diminuerait le risque de paralysie cérébrale (Bolden, 2014; Haram et al., 2015; Jacquemyn et al., 2015). Le sulfate de magnésium compétitionne avec le calcium et interfère soit avec la relâche d'acétylcholine dans la fente synaptique (limitant l'excitation), soit avec l'influx intracellulaire de calcium permettant d'activer la myosine. Un large éventail d'effets indésirables ont été répertoriés, allant de faible (e.g. rougeur et somnolence) à sévère (e.g. dépression respiratoire et arythmies cardiaques), quoique ces derniers soient plus rares (Haas et al., 2014). De plus, certaines études montrent

que le risque de mortalité fœtale et néonatale est plus élevé chez les individus ayant reçus le sulfate de magnésium (Klam & Leduc, 2004).

Présentement, seule l'administration d'une progestérone synthétique (17-alpha hydroxyprogesterone caproate), ayant le nom commercial de Makena, est approuvée dans le but de prévenir le PTL chez les femmes ayant un historique de PTL (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Malgré l'approbation de la *Food and Drug Administration*, la progestérone s'avère peu efficace à prolonger la durée de la grossesse (Saccone, Suhag, & Berghella, 2015) et est seulement donnée aux populations à risque élevé de PTB (Haas et al., 2014). De plus, les marqueurs inflammatoires demeurent élevés et la survie néonatale n'est pas améliorée avec l'usage de la progestérone (MacIntyre, Sykes, Teoh, & Bennett, 2012). Une toute récente étude a montré que l'administration de ce médicament n'était pas efficace pour empêcher les récurrences de PTL et que le nombre de cas de diabète gestationnel était plus élevé (Nelson et al.).

1.4.3.7 En développement (e.g. ghréline, oméga-3, anti-FP)

La ghréline a démontré, dans des études *in vitro*, une capacité à inhiber la contraction myométriale (Hehir, Glavey, & Morrison, 2008). Il serait donc intéressant de continuer à l'étudier afin de mieux comprendre son influence sur la modulation des contractions utérines.

Une étude à double-insu de phase III semble montrer que les oméga-3 tels que l'acide docosahexaénoïque pourrait diminuer le risque de PTL lorsqu'ils sont administrés en seconde moitié de la grossesse (Illanes et al., 2014).

Il est connu que l'expression du récepteur de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; récepteur : FP) augmente dès le déclenchement du travail utérin (contrairement au récepteur de

l'ocytocine (OT; récepteur : OXTR) qui devient davantage exprimé plus tardivement dans le processus (Goupil et al., 2010)) et que sans FP, le travail ne survient pas (dans un modèle murin *knock-out* pour FP) (Bourguet et al., 2011). Le récepteur de la $PGF_{2\alpha}$ est donc une cible intéressante pour inhiber les contractions utérines (Bourguet et al., 2011; Goupil et al., 2010). L'étude de Hirst et al. a montré qu'un peptide antagoniste sélectif pour le FP, le THG113, prolongeait la gestation murine et contraignait la PTB induite par l'injection de lipopolysaccharide (LPS) au 16^e jour de gestation. Chez le mouton, le THG113.31 a réussi à inhiber les contractions de bandes de myomètre stimulées avec la $PGF_{2\alpha}$ et à allonger la durée de la gestation (Hirst et al., 2005). Plus récemment, un dérivé de ce composé, le PDC113.824 s'est avéré efficace à moduler sélectivement la signalisation du FP, à réduire les contractions utérines en réponse au $PGF_{2\alpha}$ et à prévenir le PTL chez la souris (Goupil et al., 2010). Par la suite, des résultats prometteurs ont été obtenus avec le PDC31 (composé allostérique inhibiteur du FP qui a été optimisé (Goupil et al., 2010)) dans une étude pour traiter la dysménorrhée primaire chez l'humain (Bottcher et al., 2014). Il reste quelques études à effectuer pour s'assurer de la sécurité et de l'efficacité de cette molécule prometteuse (Bottcher et al., 2014; Hirst et al., 2005).

1.4.4 Molécules en développement ciblant l'inflammation pour prévenir le travail préterme

Étant donné que les causes de PTB sont diverses et qu'il n'y a pas de solution unique applicable à toute situation, il est fortement justifié d'avoir plusieurs options (en combinaison ou non) pour induire la tocolyse ou prévenir la naissance préterme en ciblant l'inflammation.

Les molécules anti-inflammatoires sont une alternative aux tocolytiques sérieusement étudiée dans le contexte de PTL en raison de la grande contribution de la composante inflammatoire dans le syndrome de PTB (MacIntyre et al., 2012; Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016). Toutefois, le problème de cette option pharmacologique réside dans le fait qu'on ignore encore le moment idéal pour administrer ces agents, principalement à cause du manque d'outils diagnostiques pour cibler les patientes à risque (Nadeau-Vallee, Obari, et al., 2016).

1.4.4.1 Le 101.10 ou rytvela

Récemment, un modulateur allostérique du récepteur de l'IL-1, le 101.10, a été synthétisé (Quiniou et al., 2008), puis caractérisé chez la souris (Nadeau-Vallee et al., 2015). Ce petit composé réduit l'expression de gènes pro-inflammatoires et pro-travail, diminue le nombre de leucocytes circulants et prévient la PTB induite par IL-1 β , le LPS ou le LTA (Nadeau-Vallee et al., 2015), en plus d'améliorer le développement fœtal lorsqu'administré en anténatal (Nadeau-Vallée et al., 2017). D'autres études sont prévues avant que cette molécule soit approuvée pour usage clinique dans la prévention du travail préterme ou encore le traitement de la dysménorrhée primaire.

Récemment, des neuropeptides de la famille des neuromédines se sont vus attribuer une propriété pro-contractile au niveau de l'utérus (Minamino et al., 1985; Zhang et al., 2011), mais ont peu été étudiés dans le contexte de travail préterme. Les neuromédines U et S ainsi que leur récepteur constituent donc un système intéressant dans la recherche de nouvelles cibles pour prévenir la PTB.

1.5 Le système utérotonique des neuromédines U et S / neuroméline U récepteur 2

1.5.1 Les neuromédines U et S

Les neuromédines U (NmU) (Brighton, Wise, Dass, & Willars, 2008) et S (NmS) (Mori, Miyazato, & Kangawa, 2008) font partie de la famille des neuropeptides nommés « neuromédines », laquelle comprend également les neuromédines B et C (ressemblant à la bombésine), K (ou neurokinine B), L (ou neurokinine A) et N (semblable à la neurotensine) (Budhiraja & Chugh, 2009; Kaczmarek et al., 2006; Martinez & O’Driscoll, 2015). Les NmU et NmS sont des neuropeptides respectivement découverts vers 1985 (Minamino et al., 1985) et 2005 (Mori et al., 2008), qui ont notamment une propriété pro-contractile au niveau des cellules musculaires lisses (Martinez & O’Driscoll, 2015; Mori et al., 2008).

1.5.1.1 Neuroméline U

La NmU tient son nom de la première activité biologique qui lui a été conférée, l’induction de la contraction utérine (Mitchell, Maguire, & Davenport, 2009; Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016), et a été isolée à partir de la moelle épinière de porc (Minamino et al., 1985). Depuis, la caractérisation de la NmU chez de nombreuses espèces de vertébrés suggère fortement une conservation physiologique et moléculaire de son action. La purification de la NmU porcine a mené à l’identification de trois peptides possédant une portion C-terminale commune (i.e. Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn; **Figure 1.3** (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004)) : NmU-25 (chez l’humain et le porc), NmU-23 (chez les rongeurs) et NmU-8 (chez d’autres espèces) (Mitchell et al., 2009). La composition peptidique de la portion C-terminale est importante pour l’induction de la contraction musculaire alors que celle de la portion N-

terminale influencerait plutôt la stabilité et la puissance du neuropeptide (Martinez & O'Driscoll, 2015). La forme active de NmU provient de la maturation d'un précurseur (ou propeptide) de 174 acides aminés qui est ensuite clivé successivement par des protéases cellulaires (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004; Budhiraja & Chugh, 2009; Liu et al., 2009; Martinez & O'Driscoll, 2015).

1.5.1.2 Récepteurs de NmU

Dans les années 2000, la NmU a été identifiée comme le ligand de deux récepteurs de la classe A (rhodopsine) (Alhosaini, 2011) de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) jusque-là orphelins : NmU-R1 (FM-3 ou GPR66) et NmU-R2 (FM-4 ou hTGR-1) (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004; Brighton et al., 2008; Fukue et al., 2006; Kojima et al., 2000; Liu et al., 2009; Mitchell et al., 2009). NmU-R1 est majoritairement présent en périphérie, en particulier dans le tractus gastro-intestinal, tandis que NmU-R2 se retrouve surtout exprimé dans le système nerveux central (e.g. hypophyse et hypothalamus), mais également dans l'ovaire. La NmU ou son précurseur se retrouvent essentiellement au niveau du tube digestif et du système nerveux central, mais également dans le tractus génito-urinaire (uretères, urètres, ovaires, trompes de Fallope, prostate, vas deferens), la rate, le pancréas, la thyroïde, les lymphocytes, la moelle osseuse et les glandes surrénales (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004; Budhiraja & Chugh, 2009; Kaczmarek et al., 2006; Lin, Wu, Lee, Hsiao, & Luo, 2013; Mitchell et al., 2009). Il est déjà connu que les NmU-R1 et NmU-R2 sont couplés aux voies $G\alpha_i$ et $G\alpha_{q/11}$ - phospholipase C. L'activation de cette dernière conduit, par cascade de signalisation, à une relâche de calcium intracellulaire qui engendre la contraction de muscles lisses (Alhosaini, 2011; Brighton, Szekeres, Wise, & Willars, 2004; Brighton et al., 2008; Budhiraja & Chugh, 2009; Kaczmarek et al., 2006; Prendergast, Morton, Figueroa, Wu,

& Shankley, 2006). Il existe environ 50% d'homologie entre les deux récepteurs (Alhosaini, 2011; Brighton, Szekeres, & Willars, 2004).

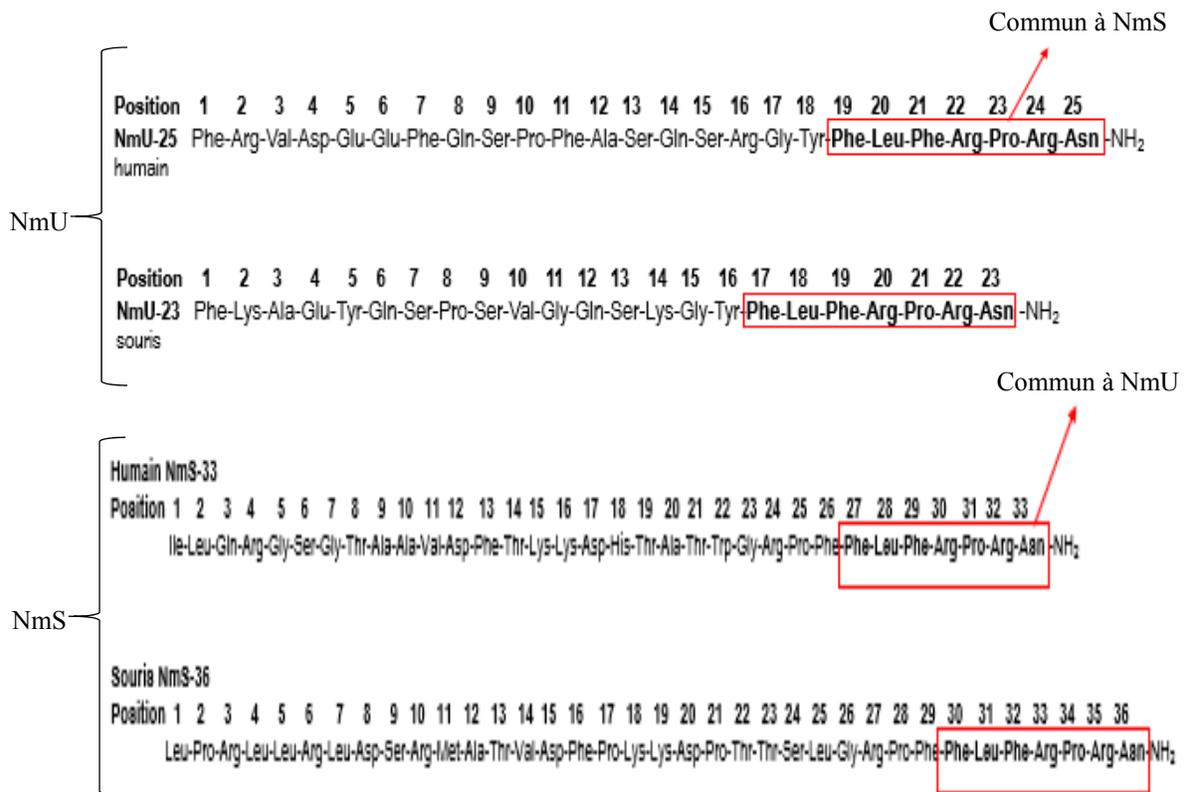


Figure 1.3 | Les neuromédines U et S. Séquences d'acides aminés des neuromédines U et S chez l'humain et chez la souris. Encadrée en rouge, la séquence d'acides aminés conservée entre espèces et responsable de l'activité biologique. Adapté de : *Brighton, P.J. et al. (2004). "Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles." Pharmacol Rev 56(2): 231-248* et *Mori, K et al. (2008). Neuromedin S: Discovery and Functions. In O. Civelli & Q.-Y. Zhou (Eds.), Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides (Vol. 46, pp. 201–212). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/400_2007_054.*

1.5.1.3 Nombreuses fonctions de NmU

La NmU constitue un neuropeptide multifonctionnel, dépendamment de l'expression prédominante des récepteurs (NmU-R1 ou NmU-R2) et de l'espèce animale concernée. Parmi les nombreuses fonctions physiologiques qui ont été assignées à la NmU depuis sa découverte se retrouvent notamment la contraction de muscles lisses (vaisseaux sanguins, utérus et tractus gastro-intestinal), la régulation de l'appétit, la diminution de la sécrétion d'insuline et la relâche d'hormones (**Tableau 1.1**) (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004; Brighton et al., 2008; Budhiraja & Chugh, 2009; Kaczmarek et al., 2006; Kojima et al., 2000; Martinez & O'Driscoll, 2015; Prendergast et al., 2006). Jusqu'à présent, les études sur la NmU se sont peu concentrées sur la contraction utérine et ont donc très peu considéré le placenta, malgré son importance majeure dans le travail utérin.

Tableau 1.1 | Les nombreux rôles physiologiques attribués à la NmU, impliquant NmU-R1 et/ou NmU-R2, et le potentiel thérapeutique associé à chaque rôle.

Rôle physiologique	Potentiel thérapeutique	Récepteur de NmU impliqué
Contraction de muscles lisses (utérus)	NmU inhibée : prévenir le travail utérin prématuré	NmU-R2
Contraction de muscles lisses (tube digestif) et motilité intestinale	NmU inhibée : contrer les problèmes liés à la contraction de muscles lisses (ex : incontinence)	NmU-R1
Relâche de corticotrophine	NmU inhibée : diminution du stress	NmU-R1
Régulation de l'axe adrénocortical	Rôle de NmU dans la réponse physiologique de stress	NmU-R1 et NmU-R2 (controversé dans la littérature)
Suppression de LH/FSH; Déclenchement de la puberté	NmU inhibée : retarder la puberté chez les filles/femelles	NmU-R1 et surtout NmU-R2
Diminution de l'appétit et régulation de l'homéostasie énergétique	Agonistes de NmU pour contrer l'obésité	NmU-R1 (périphérie) et NmU-R2 (central)
Excitation des neurones de la nociception	NmU inhibée : traiter la douleur neuropathique	NmU-R2
Augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle	NmU inhibée : contrer l'hypertension et contrôler le flot sanguin local	NmU (via NmU-R2) régule le système nerveux sympathique
Relâche de cytokines (interleukines)	Traiter les allergies, l'asthme, les maladies auto-immunes, les cancers	NmU-R1
Inhibition de l'augmentation de la masse osseuse	NmU inhibée : traite l'ostéoporose	NmU-R2 (NmU-R1 pas testé)
Cancer	Agonistes de NmU : limite la progression tumorale	NmU-R2
Suppression de la relâche d'insuline	NmU inhibée : augmente la relâche d'insuline	NmU-R1
Régulation du rythme circadien et de la température corporelle	La photopériode influence le contrôle neuroendocrinien physiologique chez les animaux.	L'expression génique de NmU suit un rythme circadien. NmU et la TSH (thyroid stimulating hormone) sont influencés par la photopériode.

Adapté de : Budhiraja, S. and A. Chugh (2009). "Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential." *Fundam Clin Pharmacol* 23(2): 149-15 et Martinez, V. G. and L. O'Driscoll (2015). "Neuromedin U: A Multifunctional Neuropeptide with Pleiotropic Roles." *Clin Chem* 61(3): 471-482.

1.5.1.4 Neuroméline S et ses récepteurs

Plus récemment, la NmS a été isolée à partir du cerveau de rat (noyau suprachiasmatique) (Mori et al., 2008) et constituerait un ligand pour les récepteurs NmU-R1 et NmU-R2 (Mitchell et al., 2009). Toutefois, son affinité pour NmU-R2 serait supérieure à

celle de NmU, malgré une puissance et une efficacité similaires entre les deux neuropeptides (Mori et al., 2008). NmS et NmU partagent la même séquence d'acides aminés dans la portion C-terminale (i.e. Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn; **Figure 1.3** (Brighton, Szekeres, & Willars, 2004; Mori et al., 2008)), laquelle est responsable de l'activité biologique (Mori et al., 2008). La séquence peptidique active contient 36 acides aminés chez la souris et 33 acides aminés chez l'humain. NmS est exprimé majoritairement dans le cerveau, la rate et les testicules (Mori et al., 2008).

1.5.1.5 Multiples rôles de NmS

NmS est également un neuropeptide multifonctionnel et participe notamment à la régulation du rythme circadien, la contraction des muscles lisses, la régulation de l'appétit et la relâche d'hormones (e.g. hormone lutéinisante [LH], Arginine Vasopressine [AVP]) (Mori et al., 2008). Pour le moment, il n'y a pas beaucoup d'information disponible quant au lien possible entre la NmS et le travail utérin ou encore la NmS et le placenta.

1.5.2 Potentiel thérapeutique dans la prévention du travail préterme

Étant donné que l'administration de NmU induit la contraction de l'utérus *ex vivo* (Minamino et al., 1985), il est probable que ce peptide puisse avoir un rôle dans l'induction du travail utérin. De plus, comme la NmU induit son action *via* son récepteur, il est également plausible que son récepteur constitue une nouvelle UAP. Actuellement, les UAPs constituent des cibles intéressantes pour développer de nouveaux agents thérapeutiques visant à prévenir la PTB.

D'ailleurs, il a récemment été démontré qu'un peptide de la même famille, la neuromédine B (agissant via son récepteur NmBR), contribuait au déclenchement du travail utérin chez la souris (Zhang et al., 2011).

Il y quelques années, Prendergast et al. (2006) ont adroitement démontré que les contractions utérines induites par la NmU étaient NmU-R1-indépendantes (Prendergast et al., 2006), augmentant ainsi notre intérêt dans l'étude du récepteur NmU-R2. Jusqu'à présent, le rôle du NmU-R2 et de ses ligands (NmU et NmS) dans le contexte du travail utérin à terme et préterme demeure peu connu. De plus, seul le PSOP (**Figure 1.4**; (R)-5'-(Phenylaminocarbonylamino)spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octane-3,2'(3'H)-furo[2,3-b]pyridine]) a été créé par la compagnie pharmaceutique AstraZeneca dans le but de traiter certains désordres du système nerveux central. Malheureusement, cet antagoniste du NmU-R2 n'est pas disponible au niveau commercial et leur projet a été arrêté (Liu et al., 2009).

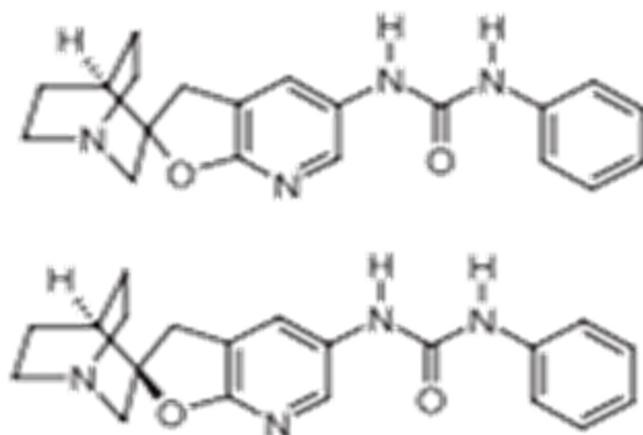


Figure 1.4 | Structure chimique du PSOP (haut) et du R-PSOP (bas). Molécules développées par AstraZeneca pour le traitement de désordres du système nerveux central. Haut : PSOP, composé le plus actif identifié par criblage à haut débit (*high throughput screening*). Bas: R-PSOP, énantiomère actif (Liu et al., 2009).

1.6 Caractérisation de peptides

Les molécules ayant la capacité de lier un récepteur sont des ligands. Diverses interactions peuvent avoir lieu entre un récepteur et un ligand, ce qui affecte la réponse intracellulaire subséquente. En effet, un ligand lie (selon une certaine affinité) un récepteur déjà dans une certaine conformation, laquelle sera stabilisée et pourra ainsi influencer d'autres interactions possibles entre ce même récepteur et d'autres ligands, molécules effectrices ou protéines de signalisation cytosoliques (i.e. protéines G, β -arrestines) (T. P. Kenakin, 2010). L'affinité est définie comme l'énergie grâce à laquelle une molécule lie son récepteur et y demeure liée. L'efficacité représente la réactivité du récepteur et sa prédisposition à engendrer une activité biologique (Terry Kenakin, 2007b; Christiane Quiniou, 2011).

1.6.1 Agonisme/Antagonisme

1.6.1.1 Composés orthostériques versus allostériques

Jusqu'à présent, les récepteurs ont été perçus comme des « interrupteurs » activés ou non. Les ligands, quant à eux, peuvent activer le récepteur complètement ou partiellement (e.g. agonistes complets ou partiels) ou l'inactiver (e.g. antagonistes) (Terry Kenakin, 2005). Pendant longtemps, les antagonistes ont été décrits comme des molécules liant le site orthostérique (site du ligand endogène) et inactivant complètement le récepteur, bloquant la liaison de l'agoniste (par encombrement stérique) et la réponse intracellulaire subséquente (ce qui correspond à un système dit « non permissif »). Avec une quantité suffisante d'antagoniste, l'activité du récepteur sera basale (aucune stimulation). Un peu plus tard, cette vision de l'antagonisme a été révisée pour inclure les antagonistes qui ne bloquent qu'une partie du signal intracellulaire (correspondant à un système dit « permissif » ou modulation

allostérique) (Terry Kenakin, 2005). Certains ligands appelés « agonistes inverses » préfèrent la forme inactive du récepteur et lorsque liés, peuvent contrer l'activité constitutive du récepteur (induisant une réponse biologique sans qu'un agoniste soit lié). Les antagonistes neutres ne vont pas induire de réponse, puisqu'ils n'ont pas de préférences pour la forme active ou inactive du récepteur. Finalement, les agonistes protéiques (*protean agonists*) vont plutôt induire un agonisme inverse et activer le récepteur mais avec une efficacité moindre que l'activité constitutive du récepteur, dans un système actif de manière constitutive (Terry Kenakin, 2007).

Un peptide modulateur qui se lie au site de l'agoniste endogène est un ligand orthostérique compétitif, puisqu'il compétitionne contre les ligands endogènes (ou un ligand radioactif [radioligand]) pour un même site de liaison. Dans ce contexte, il ne peut y avoir au même moment le ligand orthostérique et le radioligand (ou le peptide) liés au récepteur (T. P. Kenakin, 2010).

Un ligand est dit allostérique lorsque son site de liaison au récepteur diffère du site de liaison de la molécule endogène ou du radioligand. Ainsi, lorsque lié, un allostérique va changer la conformation du récepteur sans empêcher la liaison du ligand endogène. Par conséquent, l'allostérique et la molécule endogène peuvent être liés en même temps sur le récepteur. La présence de l'allostérique bloque le récepteur dans une certaine conformation et va moduler (i.e. augmenter, bloquer, potentialiser) la réponse intracellulaire normalement induite par la liaison du ligand endogène ou du radioligand, suite à une modification (i.e. hausse ou diminution) de l'affinité et/ou de l'efficacité du ligand endogène (Bourguet et al., 2011; Gao & Jacobson, 2013; T. P. Kenakin, 2010; Terry Kenakin, 2007).

1.6.1.2 Modulation allostérique surmontable/réversible

En présence d'un allostérique surmontable, l'affinité du récepteur n'est peu voire pas du tout affectée et l'efficacité maximale reste inchangée (absence versus présence de l'allostérique sur le récepteur). De plus, on note un déplacement vers la droite, de manière parallèle, des courbes doses-réponses jusqu'à ce qu'on sature l'effet. Ainsi, les concentrations croissantes d'agoniste orthostérique ne permet pas à l'allostérique de surmonter la réponse biologique (Christiane Quiniou, 2011).

1.6.1.3 Antagonisme allostérique insurmontable/irréversible

En présence d'un antagoniste allostérique insurmontable lié au récepteur, une inhibition de la réponse maximale induite par le ligand orthostérique est observée peu importe l'augmentation de la concentration du ligand naturel. Il est possible que l'affinité soit affectée, mais ce n'est pas toujours le cas (Christiane Quiniou, 2011).

Les RCPGs sont un bon exemple d'allostérisme puisque ce sont des protéines qui peuvent lier deux molécules en même temps (ligands endogène et allostérique) et ce, à des endroits différents. Le cas échéant, leur conformation change et une réponse cellulaire est induite (T. P. Kenakin, 2010; T Kenakin, 2010). Les RCPGs constituent aussi des cibles intéressantes dans le développement de médicaments depuis plusieurs décennies (Gao & Jacobson, 2013; T Kenakin, 2010).

1.6.2 Caractéristiques de l'allostérisme

Les ligands allostériques présentent les avantages suivants par rapport aux molécules orthostériques : 1) une meilleure sélectivité (donc ils sont plus sécuritaires); 2) un contrôle

distinct de l'affinité et de l'efficacité; 3) un contrôle accru du système physiologique (Bourguet et al., 2011; Gao & Jacobson, 2013; T. P. Kenakin, 2010). Ils peuvent aussi modifier l'interaction entre le récepteur et d'autres protéines de taille importante (T Kenakin, 2010). Ils sont donc plus efficaces et moins toxiques en comparaison avec les orthostériques (Gao & Jacobson, 2013; Christiane Quiniou, 2011), mais doivent être administré par voie intra-veineuse à cause de leur dégradation rapide (Bourguet et al., 2011).

1.6.2.1 Saturation de l'effet

Lorsque le modulateur peptidique est lié au site de liaison allostérique du récepteur et que tous ces sites de liaisons disponibles sont occupés, on atteint une saturation de l'effet. Puisque les modulateurs ne lient pas le site orthostérique du récepteur, on atteint un effet maximal lorsque tous les sites allostériques sont saturés. En ajoutant d'autres modulateurs, on parvient à prolonger l'effet dans le temps sans affecter la puissance (Ehlert, 2005; Ehlert Frederick J., 1988). Grâce à cette propriété, les allostériques peuvent moduler sans éliminer complètement l'effet des radioligands (T. P. Kenakin, 2010; T Kenakin, 2010).

1.6.2.2 Sélectivité fonctionnelle ou signalisation biaisée

Contrairement à un ligand orthostérique qui, une fois lié à son récepteur, engendre un ensemble de signaux intracellulaires à une puissance égale (Terry Kenakin, 2007b; Christiane Quiniou, 2011), un ligand allostérique lorsque lié, peut bloquer certaines voies de signalisation et en activer d'autres de manière sélective. Le modulateur allostérique représente un avantage puisqu'il réprime des signaux intracellulaires liés à des pathologies tout en préservant les voies de signalisation ayant une importance physiologique (T Kenakin, 2010; Terry Kenakin, 2005;

C Quiniou et al., 2008) tandis qu'un orthostérique bloque tous les signaux pathologiques ou non (Terry Kenakin, 2005; Christiane Quiniou, 2011). Les modulateurs allostériques influence sélectivement et de manière positive ou négative la cinétique de liaison du ligand orthostérique au récepteur en plus de la réponse biologique (Terry Kenakin, 2005; C Quiniou et al., 2008). Cette propriété est avantageuse dans la quête de diminution des effets secondaires liés au médicament (Bourguet et al., 2011).

1.6.2.3 Effets sélectifs sur l'affinité et l'efficacité

La liaison du modulateur allostérique au récepteur peut modifier l'affinité et/ou l'efficacité d'autres molécules (e.g. ligand endogène) pour le récepteur (en présence de l'allostérique versus en absence d'allostérique). En effet, ce récepteur est dans une certaine conformation induite par l'allostérique lié (T. P. Kenakin, 2010; T Kenakin, 2010). De plus, étant donné que le modulateur lie un site différent du ligand orthostérique (lequel est fort probablement dans une région stabilisatrice de la protéine qui est d'ailleurs sélective pour la conformation du récepteur induite par l'allostérique), son potentiel de sélectivité est augmenté (Quiniou, 2011). On parlera d'antagonisme si l'affinité et/ou l'efficacité est réduite, puisque l'activité de l'agoniste sera diminuée (e.g. déplacement de la courbe concentration-réponse ou diminution de l'effet maximal) (T. P. Kenakin, 2010).

1.6.3 Conception des peptides antagonistes contre NmU-R2

Un ensemble de différents motifs forme les récepteurs. Les régions composées de boucles extracellulaires sont les plus susceptibles d'interagir avec les petits peptides, lesquels sont créés à partir de ces séquences d'acides aminés. En effet, ces régions sont impliquées

dans l'interaction entre le récepteur et d'autres molécules (e.g. sous-unités) de même que dans la stabilisation du récepteur dans une certaine conformation (Quiniou et al., 2008).

Dans ce projet, 15 D-peptides de 9 acides aminés ont été conçus à partir de la séquence du NmU-R2 humain, mais seulement 5 d'entre eux ont été testés (**Figure 1.5**; peptides 1 à 5). L'énantiomère D a été retenu pour la création de peptides puisqu'une meilleure stabilité a déjà été montrée (Chalifour et al., 2003). Afin d'établir les séquences d'acides aminés des divers peptides à tester, la création de potentiels agents pharmacologiques s'est faite de manière rationnelle : la séquence des boucles extracellulaires du NmU-R2 humain a été analysée, puis les domaines hydrophobes et flexibles ont été identifiés à l'aide du logiciel de modélisation Swiss-Model.

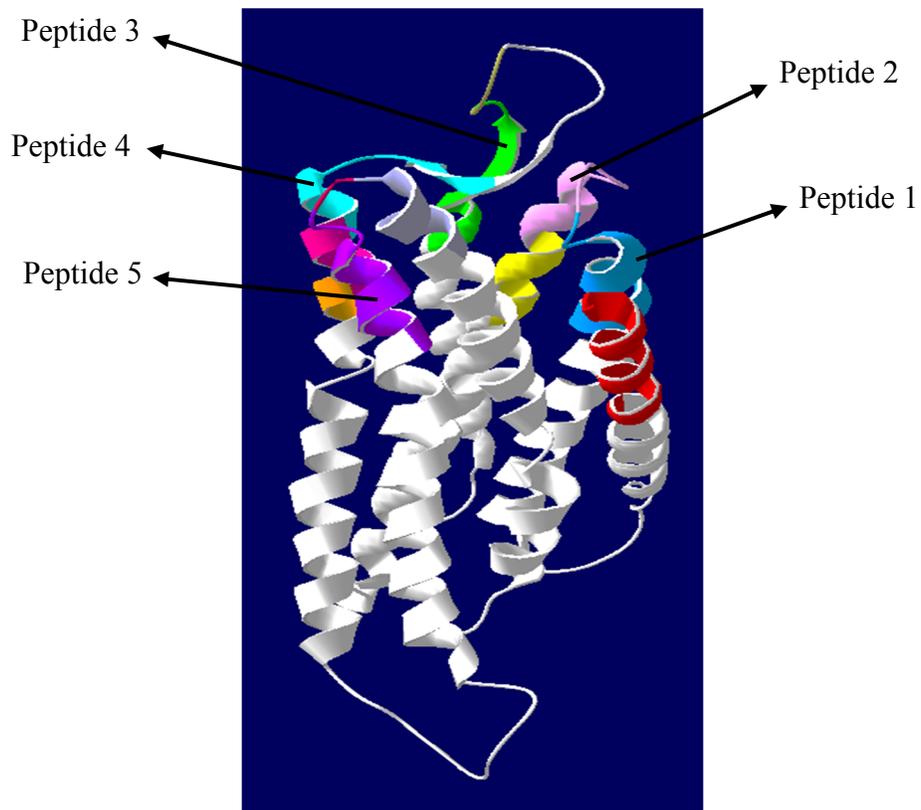


Figure 1.5 | Modélisation du neuromédine U récepteur 2. En couleur, les motifs utilisés pour la conception de 15 peptides antagonistes, dont cinq ont été testés au cours de ce projet.

Hypothèse

La PTB est un syndrome complexe et multifactoriel pour lequel il n'y a pas de solution prophylactique unique. Cette préoccupation de santé est d'ordre mondial et malgré l'amélioration des soins anténataux et néonataux, il manque toujours d'outils diagnostiques et de solutions pour aider les patientes susceptibles d'accoucher prématurément.

Pour le moment, aucun agent pharmacologique inhibant les contractions utérines (tocolytique) ne prolonge suffisamment la grossesse pour améliorer significativement le devenir du nouveau-né. De plus, les tocolytiques induisent de nombreux effets secondaires chez la mère et/ou le fœtus. Naître avant terme (i.e. avant 37 semaines complètes de grossesse) constitue une cause majeure de mortalité et de morbidités néonatales qui ne sont pas ciblées par l'usage de tocolytiques. Dans le contexte clinique actuel, les protéines activatrices de l'utérus constituent des cibles intéressantes pour développer de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la grossesse.

Plus récemment, certains neuropeptides nommés neuromédines se sont vus attribuer de nombreuses fonctions, dont une propriété pro-contractile au niveau de l'utérus. Les neuromédines U et S agissent *via* les neuromédine U récepteurs 1 (NmU-R1) et 2 (NmU-R2), des récepteurs couplés aux protéines G. Leur activation induit une cascade de signalisation intracellulaire menant à une relâche de calcium et à la contraction de muscles lisses. Présentement, aucun antagoniste n'est disponible commercialement. Une meilleure compréhension de leur rôle dans le contexte du travail utérin à terme ou préterme pourrait permettre de trouver une nouvelle cible thérapeutique dans le but de prévenir le travail préterme.

Notre hypothèse est que les neuromédines U et S agissent comme des utérotonines et qu'elles sont impliquées dans l'induction du travail préterme et à terme via le neuromédine U récepteur 2 (NmU-R2). Nous croyons qu'inhiber ce système pro-contractile pourrait réduire les contractions et potentiellement prévenir la PTB ainsi que ses conséquences.

Objectifs

Pour étudier l'implication de NmU et de NmS via le récepteur NmU-R2 dans l'induction du travail utérin à terme et préterme, nous avons établi les objectifs suivants :

- Confirmer la propriété pro-contractile des neuromédines U et S dans l'utérus.
- Corroborer cette fonction des neuromédines par des expériences de relâche de calcium *in vitro* dans des cellules myométriales primaires de souris.
- Confirmer la capacité des neuromédines U et S à induire le travail utérin et la PTB (via NmU-R2) *in vivo*.
- Évaluer l'expression des neuromédines U et S ainsi que du NmU-R2 durant la gestation chez la souris et chez l'humain.
- Évaluer l'importance du NmU-R2 *in vivo* dans un modèle de travail préterme causé par l'infection.
- Étudier la voie de signalisation du NmU-R2 *in vitro*.
- Évaluer la spécificité des effets observés *in vitro* par rapport au NmU-R2 en générant un *knock-down* du récepteur.

Puis, afin de caractériser les cinq peptides antagonistes du NmU-R2, nos objectifs étaient :

- Effectuer des expériences préliminaires de contractions *ex vivo* et de relâche de calcium *in vitro* afin de cibler les deux meilleurs peptides.
- Évaluer l'impact de l'inhibition du NmU-R2 sur sa signalisation intracellulaire.
- Choisir le meilleur candidat pour continuer la caractérisation et le développement d'un potentiel nouveau tocolytique qui préviendrait le travail préterme.

2. Matériel et méthodes

2.1 Approbation éthique

Des approbations éthiques nous ont été accordées de la part du *North West Research Ethics Committee* à Manchester, Royaume-Uni (ref.: 08/H1010/55), pour les échantillons de caduque fournis par Dr Rebecca L. Jones, ainsi que de la part du comité d'éthique de l'hôpital Ste-Justine à Montréal, Canada (ref.: 4058 et 3988), pour les échantillons de placentas et placentas entiers provenant de grossesse à terme (normale) non compliquées. Certaines biopsies de myomètres humains ont été données par des femmes accouchant par césarienne à l'hôpital Royal Alexandra à Edmonton, Alberta, après l'obtention de l'approbation éthique du comité éthique en recherche de l'Université d'Alberta. D'autres ont été fournies par Dr Sam Mesiano, et viennent de femmes accouchant par césarienne à l'hôpital universitaire pour femmes MacDonald de Cleveland, suite à l'approbation du comité d'éthique (ref : 11-04-06). Toutes les participantes ont signé un formulaire de consentement éclairé.

2.2 Animaux

Les souris femelles de souche CD-1 ont été obtenues de Charles River Inc (Saint-Constant, Québec, Canada) à divers temps de gestation (G) précis (variant selon les expériences) afin de les laisser s'acclimater à leur nouvel environnement quatre ou cinq jours avant de débiter les expériences. Elles ont été manipulées en respectant les lignes directrices et le protocole en vigueur du Comité de Protection des Animaux de l'Hôpital Sainte-Justine, et en accord avec le *Guide pour les soins et l'utilisation d'animaux dans les expériences* du

Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Les souris ont bénéficié d'un régime standard ainsi que d'un libre accès à leur nourriture et à leur eau. De plus, elles ont été soumises au cycle de luminosité suivant : 12 h lumière / 12 h noirceur.

2.3 Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés ont été fournis par les compagnies suivantes: Neuromédine U-23 (#NMU72-P; Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada), Neuromédine S (#045-88; Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, Californie, É-U), Prostaglandine F_{2α} (#16010; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, É-U), Ocytocine (# 66-0-52; American Peptide, Sunnyvale, Californie, É-U), lipopolysaccharide (LPS) de Escherichia coli 0111:B4 (L2630; Sigma, Saint-Louis, Missouri, É-U), inhibiteur de phospholipase Cβ ou U73122 (#U6756; Sigma), inhibiteur de calmoduline ou W-7 (#A3281, Sigma), α-actine (#ab5694; Abcam, Toronto, Ontario, Canada) et anticorps commercial de NmU-R2 (#sc-47250; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, É-U).

2.4 Isolation et culture de cellules primaires de muscles lisses de myomètres murins

Les cellules primaires musculaires lisses de myomètres de souris (mSMC) ont été isolées à partir de modifications apportées à la méthode de Shynlova et al. précédemment publiée (Shynlova, Oldenhof, Liu, Langille, & Lye, 2002). Les souris sacrifiées à 10 et 19 jours de gestation (G10 et G19) par dislocation cervicale ont ensuite été aspergées d'éthanol 70%. Puis, les utérus ont été extraits sous une hotte biologique stérile et placés dans le tampon A (Hank's Balanced Salt Solution [HBSS] [Gibco, Grand Island, New York, É-U], pH 7,4, 0,098 g/L sulfate de magnésium, 0,185 g/L chlorure de calcium, 2,25 mmol/L I-HEPES [N-2-

hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid], 2,5 µg/mL d'amphotéricine B [Sigma], 100 U/mL de pénicilline/streptomycine [Gibco]), afin d'enlever le gras et les vaisseaux sanguins des cornes utérines ainsi que les placentas. Ensuite, ces dernières ont été lavées doucement dans le tampon B (tampon A sans chlorure de calcium ni sulfate de magnésium) avant d'être découpées en tranches de 1 mm à l'aide de ciseaux de dissection. Ces bouts de myomètres et le tampon B ont été transférés dans un volume de 10 mL/g de tissu du tampon de digestion (1 mg/mL de collagénase de type 2 [Sigma], 0,15 mg/mL de deoxyribonucléase 1 [Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Allemagne], 0,1 mg/mL d'inhibiteur de trypsine de graine de soja [Sigma], Fetal Bovine Serum (FBS) 10% [Sigma] ou Bovine Growth Serum (BGS) 10% [HyClone, GE Healthcare, Life Sciences, Logan, Utah, É-U], 1 mg/ml d'albumine sérique de bœuf [Sigma], tampon B pour totaliser à 50 mL) avant d'effectuer une série de 4 digestions à 37°C avec agitation (100 révolutions/minute): les deux premières durant 30 minutes (min) et les deux autres durant 1 h. Après chaque digestion, l'homogénat (contenant des fragments de myomètres non digérés) a été filtré à travers un tamis cellulaire de 40 µm (BD Falcon) et centrifugé (200 g, 10 min). Le surnageant a été remis dans le tube contenant les fragments de myomètres restants en vue de la digestion suivante alors que le culot de cellules a été resuspendu dans du DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*) supplémenté (par 100 mL de DMEM [Multicell, Woonsocket, Rhode Island, É-U]: 50 mL de FBS 10% [Sigma], 50 U/ml pénicilline, 50 mg/ml streptomycine) puis mis en culture dans un pétri T75 et incubé à 37°C, 5% CO₂. Afin d'effectuer les deux dernières digestions, un autre tampon de digestion a été préparé tel que précédemment. Les deux premières digestions contenaient principalement des fibroblastes et n'ont donc pas été utilisées pour les expériences *in vitro* ultérieures. Quant aux pétris T75 correspondant aux deux dernières digestions, une technique d'adhésion cellulaire

différentielle a été utilisée afin de récolter seulement les myocytes utérins. Brièvement, après 30 min d'incubation suivant la mise en culture des cellules, les myocytes (adhésion lente) dans le milieu DMEM supplémenté ont été transférés dans un second pétri T75, laissant seulement les fibroblastes (cellules adhérant rapidement) croître dans le premier pétri. Par la suite, les myocytes ont été conservés et cultivés dans le milieu de croissance DMEM supplémenté. La pureté de la culture cellulaire a été analysée par immunohistochimie subséquentement, à l'aide du marqueur α -actine pour les cellules musculaires lisses, et était toujours supérieure à 95%. Les lignées de cellules myométriales primaires ont été utilisées à des passages inférieurs à 3 et incubées dans des conditions normales (37°C, 5% CO₂) pour assurer leur croissance.

2.5 Culture cellulaire

Les cellules primaires de myomètres murins (mSMC) ou les mSMC humaines (lignée cellulaire hTERT) ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté (FBS 10% [Sigma], 50 U/ml pénicilline, 50 mg/ml streptomycine) et gardées dans des conditions normales (37°C, 5% CO₂). Pour chaque expérience *in vitro* (immunobuvardage de type Western et réaction en chaîne par polymérase [PCR]), les cellules myométriales confluentes ont été privées de leur milieu de croissance riche en nutriments (supplémenté) la veille en fin de journée (jusqu'au lendemain) et à nouveau le matin, avant d'être traitées avec des peptides antagonistes contre NmU-R2 (durant 30 min), NmS ou diverses concentrations de NmU (durant 10 min).

Une analyse temporelle ou « *time course* » de l'activation de diverses kinases (Akt, Erk1/2, p38, JNK) et facteur de transcription (c-jun) a été effectuée dans les myocytes stimulés à la NmU, conjointement à des mesures dose-réponse et à une évaluation de l'expression des

récepteurs de la NmU (voir description de la méthode plus loin). Les stimulations suivantes ont été effectuées le matin.

2.5.1 Analyse temporelle (time course)

Les cellules myométriales ont été stimulées avec 2 μL de NmU ou NmS (10^{-6} M) pendant 3, 5, 10, 15, 30 et 60 min.

2.5.2 Dose-réponse

Les cellules de myomètres murins ont été stimulées avec diverses doses de NmU (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) pendant 5 min.

2.5.3 Inhibiteurs de PLC β et de calmoduline

Les myocytes ont d'abord été stimulés avec 10 μL d'inhibiteur de PLC β (U73122) 30 μM ou de calmoduline (W-7) 30 μM pendant 25 min. Ensuite, la moitié des cellules stimulées avec les inhibiteurs ont reçu de la NmU 10^{-6} M pendant 5 min afin de connaître l'effet des inhibiteurs sur l'activation des kinases (Akt et Erk1/2) médiée par la NmU.

Suite à la stimulation, les cellules musculaires lisses primaires de myomètres murins ont été récoltées dans du PBS 1X gardé sur glace et centrifugées (8000 rpm, 5 min, 4°C) afin d'enlever tout débris cellulaire. Après avoir retiré le surnageant, les cellules du culot ont été lysées dans du tampon RIPA (*Radio-Immuno-Precipitation-Assay*) gardé sur glace (50 mg sodium deoxycholate [Sigma], 1 mL Triton 10%, 100 μL Sodium Dodecyl Sulfate ou SDS 10% [#880-550-CL, Wisent, Montréal, Québec, Canada], 1 mL PBS 10X [#311-012-CL, Wisent], enzymes : 100 μL PMSF 100 mM; 400 μL d'inhibiteur de protéases 25X [Roche]; 100 μL de sodium orthovanadate (Na_3VO_4); 20 μL fluorure de sodium (NaF)) pour kinases

auquel du tampon Laemmli 4X Reducing (#BP-110R, Boston BioProducts, Ashland, Massachusetts, É-U) a été ajouté pour tous les échantillons (dilution 1:4), , lesquels ont été conservés à -20°C pour des expériences ultérieures ou utilisés aussi frais que possible pour la migration électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) qui a été effectuée par la suite.

2.6 Contraction utérine *ex vivo* en bains

Des souris (n'ayant reçu aucun traitement durant la gestation) à G10 et G14 ainsi que des souris juste après l'accouchement (G19) ont été anesthésiées à l'isoflurane (2,5%), puis sacrifiées avec du CO₂. Leur myomètre a été prélevé après avoir fait une incision verticale au centre de l'abdomen. Les tissus conjonctifs et adipeux ont été retirés des cornes utérines avant que des bandes longitudinales de myomètres murins (2 à 3 mm de large et 10 mm de long) soient disséquées de l'utérus. Puis, ces bandes ont été installées de façon isométrique dans les bains de tissus avec une tension de départ à 2g. Les bains contenaient 20 mL de tampon Krebs ([en mM]: 118 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂, 0,9 MgSO₄, 1 KH₂PO₄, 11,1 glucose, et 23 NaHCO₃ (pH 7,4)) ainsi que les divers éléments suivants : NmU à des concentrations croissantes (10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M et 10⁻⁶ M), de la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}, 10⁻⁶ M) ou de l'ocytocine (OT, 10⁻⁶ M). Pour les expériences testant les peptides antagonistes contre NmU-R2, des concentrations de 10⁻⁸ M et 10⁻⁷ M ont été utilisées. Le tampon a été équilibré à 37°C avec 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone. La tension isométrique a été mesurée par un capteur de force et enregistrée par le système d'acquisition de données BIOPAC (BIOPAC MP150). Après 1 h d'équilibration, les expériences ont eu lieu comme suit : la tension moyenne des contractions spontanées a été mesurée via un système de polygraphe numérique

(AcqKnowledge), puis la tension moyenne des contractions induites par NmU, NmS, PGF_{2α}, OT ou en présence des peptides antagonistes a été mesurée de la même façon. Au début de chaque expérience, la réponse basale initiale (de référence) correspond à la tension moyenne des contractions myométriales spontanées. Une hausse dans cette tension moyenne (%) est exprimée en pourcentage de $(X/Y) \cdot 100$, où X représente le changement dans la tension moyenne (g) induite par NmU, NmS, PGF_{2α} ou OT et Y indique la réponse basale de référence (g).

2.7 Essai de calcium

Les cellules myométriales primaires (mSMC) à G10 et G19 ont été utilisées. En suivant le protocole du *Fluo-4 NW Calcium assay kit* (Life Technologies, Eugene, Oregon, É-U) pour cellules adhérentes, les cellules myométriales ont été incubées (37°C, 5% CO₂) jusqu'à ce qu'elles soient sous-confluentes (95% de confluence), puis dénombrées par comptage cellulaire à l'aide du bleu de trypan et d'un hématimètre. Les cellules myométriales ont ensuite étéensemencées sur une plaque de 96 puits à fond noir (#3603; Corning) à raison de 40 000 cellules/puits et incubées pour 24 h (37°C, 5% CO₂). Elles ont ensuite été cultivées par privation de sérum (DMEM non supplémenté) la veille de l'expérience jusqu'au lendemain. Le matin de l'expérience, les réactifs (composé C ou tampon de l'essai; composé B : probenecid avec composé C; colorant de solution de chargement 1X: composés A et C avec probenecid) ont été préparés selon les directives du manufacturier (Life Technologies). Ensuite, le DMEM a été retiré des 96 puits contenant les myocytes (G10 ou G19) en culture, puis remplacé par le tampon contenant du probenecid (fourni dans le *Fluo-4 NW Calcium assay kit*), afin d'éliminer toutes sources de fluorescence basale liée à l'activité estérase.

Pendant l'incubation de 30-45 min des mSMC dans le tampon de probenecid, des solutions de 3 mL ont été préparées (tubes Corning) : solutions de NmU de concentrations croissantes (10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M), les contrôles positifs (PGF_{2α} 10^{-5} M ainsi que OT 10^{-7} M ou 10^{-5} M), les peptides antagonistes de NmU-R2 (10^{-5} M) et finalement, de l'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif. Pour tester les peptides antagonistes contre NmU-R2, les mSMC ont été stimulées avec les différents peptides (peptides 1 à 5 : 10^{-5} M, ou des doses croissantes de peptide 5 : 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) ou encore avec l'anticorps commercial contre NmU-R2 (10^{-5} M; #sc-47250, Santa Cruz Biotechnology) 15 min avant la lecture de la microplaque. À noter que ces solutions sont dix fois moins concentrées lorsque la lecture de la plaque est effectuée. Par la suite, à l'aide du lecteur de microplaques MikroWin 2010 Mithras LB 940, les niveaux intracellulaires de calcium en réponse à des stimulations en temps réel avec NmU, NmS, PGF_{2α} ou OT (utilisant les injecteurs de l'appareil) ont été mesurés à raison de 15 mesures en 30 secondes par échantillon. Cinq lectures différentes ont été effectuées par le lecteur afin d'obtenir une mesure moyenne pour établir le niveau basal de fluorescence avant que les injections soient effectuées. Le tampon fourni dans le kit a été utilisé comme contrôle négatif. Les données numériques obtenues (ratio entre la moyenne des lectures après stimulation et la moyenne des lectures basales) ont ensuite été analysées à l'aide de GraphPad Prism version 6.

2.8 Extraction de protéines des biopsies de myomètres humains

Les biopsies de myomètres humains ont été congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C . Par la suite, ces tissus ont été enveloppés dans du papier d'aluminium et broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Puis, 0,1-0,2g de tissus de

myomètres humains ont été lysés dans un tube à fond rond avec une tige de 7 mm contenant un tampon de lyse (0,05% Tris, 0,01% ethylene diamine tetraacetic acid, 0,001% Triton X-100, 0,005% PMSF, and 0,1% inhibiteurs de protéases) et placé sous agitation à haute vitesse (fréquence de 25/seconde) dans un appareil TissueLyser II (Qiagen). Ensuite, les lysats obtenus ont été centrifugés (12 000g, 10 min, 48°C) et les supernageants ont été récupérés en vue des immunobuvardages de type Western qui ont été réalisés un peu plus tard.

2.9 Induction de la naissance préterme

Des souris gestantes ont été préalablement anesthésiées à l'isoflurane (2,5%) avant de recevoir des injections intrapéritonéales (i.p.) de NmU, NmS, PGF_{2α} ou OT deux fois par jour pour deux jours consécutifs (G13–G14, G15–G16 ou G17–G18) et pour un total de quatre injections. Les doses de NmU et NmS ont été choisies à partir d'une étude précédente sur l'induction du travail utérin par la neuromédine B (Zhang et al., 2011). PGF_{2α} et OT (160 µg/kg) ont été utilisés comme contrôles positifs. Toutes les 2 h, les souris ont été observées afin de repérer des signes de travail/accouchement tels qu'un saignement vaginal ou la naissance d'au moins un souriceau.

2.10 Production des lentivirus

Nous avons produit des lentivirus infectieux (LV) en transfectant de façon transitoire un lentivecteur dans des cellules 293FT (Invitrogen) tel que décrit précédemment (Dull et al., 1998). Cinq séquences de divers petits ARN en épingle à cheveux ou *small-hairpin RNA* (shRNA) contre NmU-R2 (voir Tableau 2.1 pour les séquences) ont été utilisés, puis les

expériences subséquentes ont été effectuées avec le shRNA le plus efficace à diminuer l'expression de NmU-R2 (voir l'étude de Nadeau-Vallée et al. pour davantage de détails (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016)). Les souris à G13 ou G15 ont été placées sous anesthésie avec l'isoflurane (2,5%), puis les poils de leur abdomen ont été rasés avant que leur peau ventrale soit désinfectée avec de l'éthanol 70% et la povidone-iodine 7,5% (Atlas Laboratory). Après avoir effectué une courte incision médiane de la paroi abdominale inférieure (1,5 cm) avec des ciseaux chirurgicaux, une injection intra-utérine unique du lentivirus a été soigneusement réalisée dans la corne utérine inférieure droite entre deux membranes fœtales adjacentes sans entrer dans la cavité amniotique. La couche musculaire abdominale a ensuite été suturée et fermée avec des broches de sutures. Le lentivirus a infecté les tissus pendant au moins 72 h. De plus, les seringues contenant le lentivirus ont été codées de sorte que la personne procédant aux injections ignorait la nature des groupes expérimentaux.

Tableau 2.1 Séquences utilisées pour la conception des shRNA contre NmU-R2.

Clone ID	Séquences
TRCN0000026236	TAAGTTGGGTGTTGTGGATGG
TRCN0000026273	TATACACCCATATGGGTTTGG
TRCN0000026279	AACAGGAAGGGATAATTGTGC
TRCN0000026293	TTAGCCCTGATTTAGAGAGC
TRCN0000026323	ATTCACAGTCACTTTGTCTGC

2.11 Modèle de travail préterme induit par le LPS

Les souris gestantes prétraitées avec une injection de lentivirus ou de saline à G13 (infection par le lentivirus pendant 72 h) ont reçu une injection i.p. de 10 µg de LPS ou un volume équivalent de saline à G16. Toutes les 2 h, les souris ont été observées afin de repérer des signes de travail/accouchement tels qu'un saignement vaginal ou la naissance d'au moins un souriceau.

2.12 Extraction de l'ARN et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les fragments de myomètres murins conservés à -80°C ont été décongelés et préservés dans le RiboZol (#N580-CA-200ML, Amresco). L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon les directives du fabricant et a été suivie de la quantification (concentration) des ARN totaux à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Wilmington, Delaware, É-U). La qualité de l'extraction d'ARN totaux a été vérifiée à l'aide du ratio DO_{260}/DO_{280} fourni par le spectrophotomètre. La synthèse d'ADNc (complémentaire) par transcription inverse (reverse-transcription) a nécessité 500 ng d'ARN totaux, le kit iScript™ Reverse Transcription SuperMix (Bio-Rad) ainsi que les thermo-cycleurs *T100™* (Bio-Rad) ou *Veriti 96 Wells Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR ont été élaborées par NCBI Primer Blast (voir Tableau 2.2 pour les séquences). Le SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) a été utilisé pour la quantification de l'expression génique par PCR quantitative (qPCR) à l'aide du thermo-cycleur *Stratagene MXPro3000* (Agilent Technologies). L'ARN ribosomique (ARNr) 18S (#AM1718, Ambion Life Technologies, Santa Clara, Californie, É-U), a été quantifié afin de normaliser les niveaux d'expression

génique spécifiquement mesurés par la méthode de quantification ΔCt . Les courbes de dissociation ont été vérifiées afin de sélectionner les amorces choisies et de s'assurer ainsi de leur spécificité. Les gènes analysés sont ceux de NmU-R1 et NmU-R2 (récepteurs de la neuroméline U), NmU-23 (neuroméline U murine de 23 acides aminés), NmS (neuroméline S), OXTR (récepteur de l'ocytocine), PTGFR (récepteur de la prostaglandine $F_{2\alpha}$).

Tableau 2.2. Séquence des amorces utilisées pour la quantification de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel.

Séquence de l'amorce sens (<i>forward</i>) de souris	Séquence de l'amorce antisens (<i>reverse</i>) de souris
NmU-R1-F : TGACTACCGCACTGCTCTTC	NmU-R1-R : ACAACCAGTGCAAACAGCATC
NmU-R2-F : TACATCCTCCCGATGACCCT	NmU-R2-R : CACGAGGACCAAGACAAACAG
NmU23-F : CACGCTGAGGGACAGCTAAA	NmU23-R : TATTGGCACACCTTTGCAAGC
NmS-F : CCAACCTAAGGAAAACCAGGATG	NmS-R : GATGGACCGGAGCAAACCTCA
PTGFR-F : AGCTGGACTCATCGCAAACA	PTGFR-R : GTGGGCACAAGCCAGAAAAG
OXTR-F : TGTGTCTCCTTTTGGGACAA	OXTR-R : GGCATTCAGAATTGGCTGT

2.13 Transfert de protéines par immunobuvardage de type Western

2.13.1 Récolte d'utérus murins

Les souris ont été préalablement anesthésiées à l'isoflurane (2,5%) avant d'être sacrifiées conformément aux méthodes approuvées par le comité d'éthique affilié au Centre de recherche du CHU Ste-Justine (décapitation). À l'aide de pinces et de ciseaux de dissection stériles, les myomètres murins ont été prélevés à divers jours de gestation (non enceintes; jour 10, 14, 16 ou 18 de la gestation; durant le travail et 24 h *postpartum*). Les myomètres (dépourvus de tissus adipeux et de vaisseaux sanguins) ont été préservés par congélation à -80°C pour un

usage ultérieur. Par la suite, les tissus ont été homogénéisés dans du tampon RIPA et conservés à -20°C jusqu'au transfert de protéines par immunobuvardage de type Western. Dans le cas des souris gestantes ayant accouchées avant d'être sacrifiées, leur progéniture a également été sacrifiée conformément aux méthodes approuvées par le comité d'éthique affilié au Centre de recherche du CHU Ste-Justine (isoflurane 2,5% et décapitation).

2.13.2 Immunobuvardage de type Western

La méthode de Bradford (Bio-Rad) a été utilisée pour quantifier les protéines dans les échantillons de fragments de myomètres homogénéisés ou de cellules primaires de myomètres murins (mSMC) lysées dans le tampon RIPA. Cinquante microgrammes de protéines ont été chargés dans des gels SDS-PAGE à 12% d'acrylamide (Bio-Rad) avant l'électrotransfert des protéines sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride, PIERCE). À la suite du blocage (#11921681001, Roche) des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps, la membrane a été incubée à 4°C toute la nuit, sous agitation avec l'un des anticorps primaires suivants : NmU (#sc-368069; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, É-U), NmS (#PAA828Mu01; Cloud-Clone Corp., Houston, Texas, É-U), NmU-R1 (#sc-47241; Santa Cruz Biotechnology), NmU-R2 (#sc-47250; Santa Cruz Biotechnology), cyclophiline B (#ab16045; Abcam), anti-GAPDH (PA1-987; Pierce Protein Biology, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, É-U) ou β -actine (#sc-47778; Santa Cruz Biotechnology). À noter que les anticorps pour NmU et NmS ne détectent que les propeptides correspondants (Martinez & O'Driscoll, 2015), mais que les profils d'expression protéique ont été confirmés tout au long de l'étude par des profils d'expression génique similaires. Pour étudier le mécanisme d'action du récepteur NmU-R2 et l'activation de kinases, les membranes ont été

incubées à 4°C toute la nuit, sous agitation avec l'un des anticorps primaires suivants : phospho-Akt (#9271; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, É-U), phospho-Erk1/2 (#9101; Cell Signaling Technology), Akt (#9272; Cell Signaling Technology) ou Erk1/2 (#9102; Cell Signaling Technology). D'autres membranes ont été incubées à 4°C toute la nuit, sous agitation avec l'un des anticorps primaires suivants (*résultats non montrés dans ce mémoire mais publiés dans l'étude de Nadeau-Vallée et al, 2016*): phospho-JNK (#9251; Cell Signaling Technology), phospho-c-jun (#9261; Cell Signaling Technology), phospho-p38 (#4511; Cell Signaling Technology), JNK (#9252; Cell Signaling Technology), c-jun (#9165; Cell Signaling Technology), p38 (#9212; Cell Signaling Technology). Après avoir enlevé les anticorps primaires non liés grâce aux lavages (TBS-Tween : 900 mL d'eau distillée, 100 mL TBS 10X [Wisent], 0,5 mL Tween 80 [#9005-65-6, MP Biomedicals, Solon, Ohio, É-U]), les membranes ont été incubées 1 h avec les anticorps secondaires appropriés et conjugués à la peroxydase de raifort (Horseradish Peroxydase ou HRP) fournis par Cell Signaling (anti-lapin HRP #7074 et anti-souris HRP #7076) et par Abcam (anti-chèvre HRP #ab6741). Les signaux de chimioluminescence induits par l'activité HRP ont été détectés en utilisant une solution de peroxyde et luminol (ECL Prime, GE Healthcare, Buckinghamshire, R-U) grâce au système d'imagerie numérique ImageQuant LAS-500 (GE Healthcare). L'analyse densitométrique (semi-quantification) a été réalisée à l'aide du logiciel *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, É-U). Les valeurs ont d'abord été normalisées avec les protéines totales ou les contrôles de chargement (β -actine, GAPDH, or cyclophiline B), puis déterminées en fonction de l'échantillon contrôle (ratio).

2.14 Immunocytochimie

Les cellules ont été mises sur des lamelles déjà recouvertes de poly-D-lysine avant d'être fixées dans du paraformaldéhyde 4%. Suite au blocage, les cellules ont été incubées toute la nuit avec un anticorps primaire ciblant l' α -actine (#ab5694; Abcam) et pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugué avec Alexa Fluor 488 (Sigma). Les noyaux cellulaires ont été colorés avec le 40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:5000; Invitrogen). Un objectif 30X d'un microscope à fluorescence Eclipse E800 (Nikon) a été utilisé pour la capture d'images.

2.15 Analyse statistique

Un test de Student bilatéral ou une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) a été réalisée pour comparer les groupes entre eux. La méthode de Dunnett pour les comparaisons multiples a toutefois été appliquée lorsque les données étaient comparées à un seul contrôle. Le test de Tukey pour les comparaisons multiples a été effectué pour l'analyse des données des essais de contractions *ex vivo* sans les peptides antagonistes de NmU-R2 alors qu'un test de Student unilatéral a été utilisé pour la comparaison des groupes dans les expériences de contractions *ex vivo* avec les peptides antagonistes de NmU-R2. Les données montrées correspondent aux moyennes \pm SEM (marge d'erreur). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats

A) NmU et NmS impliquées dans l'induction du travail à terme (physiologique)

3.1 | NmU et NmS induisent la contraction utérine *ex vivo* de manière dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante chez la souris.

Il a déjà été démontré par Minamino et al. (1985) que la neuroméline U (NmU) est capable d'induire *ex vivo* la contraction utérine chez le rat (Naoto Minamino et al., 1985). Afin de confirmer la capacité de ce neuropeptide à induire la contraction utérine, nous avons d'abord procédé à des essais de contraction *ex vivo* dans des bains pharmacologiques en réponse à des doses croissantes de NmU. Nous avons constaté que NmU a induit la hausse de la tension moyenne de manière dose-dépendante (EC_{50} : 15nM; **Figure 3.1 A**). NmS, un ligand ayant une meilleure affinité pour NmU-R2 que NmU (Mori et al., 2008), induit également la contractilité utérine et ce, de manière comparable à NmU (**Figure 3.1 B**). L'effet pro-contractile est dépendant de NmU-R2 puisque suite à l'administration d'un lentivirus (LV.shRNA-NmU-R2) par injection intra-utérine visant à diminuer l'expression du récepteur, nous avons noté une baisse significative (environ 75%) de la réponse contractile en présence de NmU (**Figure 3.1 C**). Ensuite, nous avons voulu étudier si la réponse contractile myométriale dépendait de l'âge gestationnel auquel l'utérus était prélevé. Pour ce faire, nous avons effectué des essais de contraction *ex vivo* en réponse à des doses croissantes de NmU sur des fragments d'utérus prélevés de souris gestantes à G10, G14 ou G19 (à terme, juste après l'accouchement). $PGF_{2\alpha}$ et OT ($10^{-8}M$) ont été utilisés comme contrôles positifs. Nous avons remarqué que la sensibilité du myomètre murin à la NmU s'accroît considérablement à l'approche du travail utérin menant à l'accouchement (G19), en comparaison avec la réponse

contractile obtenue en utilisant les utérus prélevés plus tôt dans la gestation (G10 et G14) (**Figure 3.1 D**). De plus, l'effet pro-contractile de NmU est similaire à celui induit par $\text{PGF}_{2\alpha}$ à une concentration de 10^{-8}M pour les trois âges gestationnels (G10, G14, G19).

3.2 | NmU et NmS induisent le travail utérin de façon dose-dépendante chez la souris.

In vivo, l'administration de différentes doses de NmU par voie intrapéritonéale (i.p.) deux fois par jour à G17 et G18 chez des souris gestantes a accéléré l'accouchement de manière dose-dépendante (**Figure 3.2 A**). NmU, à la dose la plus élevée (160 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a eu un effet pro-travail utérin raccourcissant la gestation et induisant la naissance préterme qui est équivalent à l'effet observé suite à l'administration de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (un agoniste contractile de l'utérus bien connu), mais moindre que l'effet induit par OT (également une utérotonine connue) (**Figure 3.2 A**). Cependant, l'administration i.p. de NmU ou de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (160 $\mu\text{g}/\text{kg}$) à des temps de gestation inférieurs (G13 à G16) ne suffit pas à induire le travail utérin précédant l'accouchement prématuré (**Tableau 3.1**), ce qui confirme l'effet dépendant de l'âge-gestationnel de NmU. NmS, un ligand avec une affinité supérieure à celle de NmU pour NmU-R2 (Mori et al., 2008), a également réduit la durée de la gestation (environ 12 h), de manière comparable à NmU (**Figure 3.2 B**). Une fois de plus, l'effet pro-travail de NmU est dépendant de NmU-R2, donc spécifique au récepteur, étant donné que le raccourcissement de la gestation n'est pas observé lorsqu'un *knock-down* de NmU-R2 est préalablement effectué chez la souris via l'injection d'un lentivirus (LV.shRNA-NmU-R2) (**Figure 3.2 C**). En effet, l'administration du shRNA-NmU-R2 n'a pas affecté la durée de la gestation à terme.

3.3 | NmU-R2 est essentiel pour l'induction du travail préterme causée par l'infection.

L'inflammation est une composante importante dans la régulation du déclenchement du PTL. Puisque l'infection est aussi connue pour être fermement liée à l'induction de PTB (Romero et al., 1989, 2001) et que des résultats précédents obtenus dans notre laboratoire suggèrent que l'inflammation (en présence ou non d'infection) régule à la hausse l'expression de NmS provenant du placenta et NmU-R2 au sein de l'utérus (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016), nous avons voulu étudier le rôle de NmU-R2 dans un contexte de PTB associée à l'infection. Pour y arriver, nous avons prétraité des souris gestantes avec des injections intra-utérines (une injection par corne utérine) de lentivirus possédant un shRNA contre NmU-R2 (ou shRNA-Scrambled) à G13, puis injecté 10µg de LPS (afin de mimer une infection chez la souris gestante) à G16. Nous avons constaté que la gestation a été prolongée de manière significative (~ 28 h; accouchement à terme) chez les souris ayant reçu le LPS avec le *knock-down* de NmU-R2 (**Figure 3.3**). Ainsi, l'expression de NmU-R2 en quantité suffisante est requise pour l'induction d'un travail préterme suite à une infection.

3.4 | L'expression de NmS (mais pas celle de NmU) augmente à l'approche du travail chez la souris et chez l'humain.

Le placenta est reconnu comme étant un organe-clé dans le déclenchement du travail utérin (McLean et al., 1995). Étant donné la capacité des NmU et NmS à induire le travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression endogène de ces neuropeptides au sein du placenta. Nous avons observé une expression protéique constante de NmU (**Figure 3.4 A**)

alors que l'expression protéique de NmS (**Figure 3.4 B**) était exclusive au travail spontané chez la souris. Des résultats similaires ont été remarqués suite aux expériences utilisant les biopsies prélevées de femmes enceintes à terme sans signes cliniques de travail utérin (TNL) ou encore en travail (TL). En effet, l'expression protéique de NmU était constante (**Figure 3.4 C**) tandis que l'expression protéique de NmS a augmenté de façon significative pendant le travail précédant l'accouchement (**Figure 3.4 D**).

3.5 | L'expression génique et protéique de NmU-R2 dans l'utérus est maximale à l'approche du travail.

Après avoir étudié l'expression des deux neuropeptides d'intérêt dans ce projet, nous avons voulu faire de même avec l'expression du NmU-R2 chez la souris et chez l'humain. En utilisant des utérus murins prélevés à différents temps de la gestation (NP : non enceintes; à G10, G14, G16, G18 : divers jours de gestation; L : durant le travail menant à l'accouchement; PP : *postpartum* 24 h), nous avons vu que l'expression génique (**Figure 3.5 A**) et protéique (**Figure 3.5 B**) augmente graduellement jusqu'à l'atteinte d'une expression maximale pendant le travail pour ensuite diminuer rapidement en *postpartum*. Le profil d'expression du NmU-R2 est similaire aux profils d'expression génique des récepteurs de $PGF_{2\alpha}$ et OT, deux UAPs connues (Bolden, 2014; Cook et al., 2003, 2000; Hirst et al., 2005).

Chez l'humain, les résultats obtenus avec les biopsies d'utérus de femmes enceintes ou non concordent avec les résultats murins observés, et suggèrent une hausse graduelle et assez marquée de l'expression protéique de NmU-R2 chez les femmes enceintes accouchant à terme (TL : durant le travail à terme spontané; n = 5 ou TNL : accouchement à terme sans travail

utérin [e.g. césarienne] ; n = 9) et préterme sans signes cliniques de travail utérin (PTNL; n = 4), comparativement aux femmes non enceintes (NP : n = 4) (**Figure 3.5 C**). Contrairement à NmU-R2, l'expression génique de NmU-R1 dans l'utérus demeure relativement constante durant la gestation et n'augmente pas à l'approche du travail (**Figure 3.5 A**).

B) Mécanisme d'action et voie de signalisation intracellulaire

3.6 | NmU et NmS induisent une relâche intracellulaire de calcium dans les myocytes murins de façon dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante.

Pour étudier le mécanisme d'action du NmU-R2 *in vitro*, nous avons isolé les cellules musculaires lisses de myomètres murins (mSMC) extraits à G10 ou G19. Les cultures cellulaires utilisées (mSMC) avaient une pureté de > 95% (cellules immunoréactives à l' α -actine) (**Figure 3.6 A**). Une relâche de calcium intracellulaire plus importante a été observée en réponse à la NmU avec les mSMC isolées à G19 par rapport à celles isolées à G10. De plus, la relâche de calcium intracellulaire dans les mSMC à G19 est similaire à ce qui est observé en réponse à PGF_{2 α} ou OT (deux utérotonines connues), quoique l'effet de l'OT soit un peu plus marqué (**Figure 3.6 B**). NmS induit également une relâche intracellulaire de calcium et ce, de manière comparable à NmU (**Figure 3.6 C**). Encore une fois, l'effet pro-contractile de relâche calcique induite par NmU a été abrogé par le *knock-down* du NmU-R2, montrant la spécificité de cet effet (**Figure 3.6 D-E**). Des études précédentes de d'autres RCPGs (e.g. OTR et PTGFR) ont rapporté des durées et des amplitudes des relâches calciques similaires (Ohmichi et al., 1997; Stassen et al., 1988).

3.7 | NmU et NmS activent les kinases Akt et Erk1/2 de façon dose-dépendante et âge-gestationnel dépendante dans les myomètres murins.

Nous avons poursuivi l'étude du mécanisme d'action du récepteur NmU-R2 via la phosphorylation des kinases Akt et Erk1/2, en utilisant des cellules primaires de myomètres murins isolées à G10 (G10 mSMC) ou G19 (G19 mSMC) stimulées avec NmU ou NmS. Les cultures cellulaires utilisées (mSMC) ont une pureté de > 95% (cellules immunoréactives à l' α -actine) (**Figure 3.6 A**). En voulant étudier les voies de signalisation intracellulaires potentielles de NmU-R2, nous avons effectué des immunobuvardages de type Western et nous avons trouvé que NmU n'active pas (via phosphorylation) les kinases associées au stress p38 et JNK ni le facteur de transcription c-jun (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016). Par contre, NmU activent les kinases Akt (**Figure 3.7 A**) et Erk1/2 (**Figure 3.7 E**) de façon transitoire (respectivement jusqu'à 15 et 10 min) et de façon dose-dépendante (Akt : **Figure 3.7 C** et Erk1/2 : **Figure 3.7 G**) dans les G19 mSMC seulement (et pas dans les G10 mSMC). Ainsi, la signalisation associée à NmU-R2 est potentialisée par l'âge gestationnel *in vitro*. NmS peut également activer les kinases Akt (**Figure 3.7 B**) et Erk1/2 (**Figure 3.7 F**) de manière comparable à NmU. L'activation de Akt et Erk1/2 induite par NmU est abrogée par le *knock-down* de NmU-R2 (en administrant le lentivirus LV.shRNA-NmU-R2) dans les G19 mSMC, démontrant la spécificité de cette phosphorylation (**Figure 3.7 D et H**). L'activation d'Akt (**Figure 3.7 I**), mais pas de Erk1/2 (**Figure 3.7 J**), en réponse à NmU a été inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de calmoduline ou de phospholipase C β (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016). L'étude du mécanisme d'action du NmU-R2 nous a permis d'établir une voie de signalisation possible pour ce récepteur, en lien avec la contraction utérine (**Figure 3.7 K**)

(Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016). NmS, une fois lié à NmU-R2, engendre la relâche intracellulaire de calcium en plus de phosphoryler les kinases Akt et Erk1/2; ces effets sont comparables à ceux induits par NmU.

C) Caractérisation de peptides antagonistes de NmU-R2

3.8 | Peptide 5 inhibe les contractions utérines murines *ex vivo* effectuées à terme en réponse à NmU.

Étant donné l'activité utérotonique du système composé des ligands NmU, NmS et du récepteur NmU-R2 observée dans les résultats précédents, nous avons voulu tester des petits peptides antagonistes contre NmU-R2 créés dans notre laboratoire (peptides 1 à 5). Puisque NmU et NmS ont des effets pro-contractiles similaires, nous avons choisi de continuer avec NmU seulement. Nous avons d'abord fait des expériences préliminaires de contractions *ex vivo*, en utilisant des utérus prélevés à terme (G19) juste après l'accouchement qui ont été stimulés avec les différents peptides antagonistes pendant 30 min avant la stimulation avec NmU (10^{-8} M puis 10^{-7} M) (**Figure 3.8 A**). À la lumière de ces résultats, nous avons choisi de poursuivre la caractérisation seulement avec les deux meilleurs peptides dans les expériences préliminaires, soient les peptides 3 (**Figure 3.8 B**) et 5 (**Figure 3.8 C**). Nous avons également testé un peptide scrambled (**Figure 3.8 D**). Nous avons constaté que le peptide 3 et le scrambled ne réduisaient pas significativement la contraction utérine dans les bains pharmacologiques. Par contre, le peptide 5 a montré une inhibition de la réponse contractile induite par NmU d'environ 40%.

3.9 | Peptides 4 et 5 inhibent la relâche intracellulaire de calcium en réponse à NmU dans les cellules myométriales de souris.

Nous avons voulu savoir si les peptides antagonistes contre NmU-R2 avaient la capacité de réduire la relâche intracellulaire de calcium, lequel est important pour la contraction utérine. Des essais de calcium *in vitro* avec les cinq peptides antagonistes contre NmU-R2 ont donc été réalisés à l'aide de cellules myométriales primaires de souris (mSMC) isolées à partir d'utérus extraits à terme (G19), juste après l'accouchement. Nous avons observé une inhibition significative de la relâche calcique en réponse à NmU dans les mSMC avec le peptide 4 (environ 40%), le peptide 5 (environ 50%) et l'anticorps commercial contre NmU-R2 (environ 30%) (**Figure 3.9 A-B**). Puisque le peptide 5 semble inhiber de façon constante la contraction *ex vivo* et la relâche de calcium *in vitro*, nous avons choisi de poursuivre les expériences uniquement avec ce peptide. À l'aide des résultats obtenus avec plusieurs concentrations de peptide 5 lors des essais de calcium, une courbe dose-réponse a été réalisée ($IC_{50} = 23,46nM$) (**Figure 3.9 C**). Nous avons noté que le peptide 5 réduit la relâche intracellulaire de calcium *in vitro* induite par NmU de façon dose-dépendante (inhibition entre 50 et 60%) (**Figure 3.9 D**).

3.10 | Le peptide 5 module de façon sélective la voie de signalisation de NmU-R2 dans les cellules myométriales primaires de souris.

Enfin, nous avons testé l'impact du peptide 5 sur la signalisation intracellulaire du NmU-R2. Les immunobuvardages de type Western, effectués avec des lysats de cellules

myométriales primaires de souris (mSMC) qui ont été isolées à terme (G19) juste après l'accouchement et stimulées 30 min avec les différentes concentrations de peptide 5 avant d'être stimulées avec NmU (10^{-7} M) pendant 10 min, ont montré que les concentrations les plus élevées de peptide 5 (10^{-9} M à 10^{-6} M) tendent à inhiber la phosphorylation de Akt (**Figure 3.10 A**) d'au moins 50%, mais aucune concentration de peptide 5 ne semble inhiber celle de Erk1/2 (**Figure 3.10 B**). Le peptide 5 a donc un effet sélectif sur la voie de signalisation de NmU-R2 en inhibant l'activation d'Akt sans affecter celle de Erk1/2.

Figures et tableaux

A) NmU et NmS impliquées dans l'induction du travail à terme (physiologique)

Figure 3.1 | NmU et NmS induisent la contraction utérine *ex vivo* de manière dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante chez la souris.

A) Tracé de la contraction *ex vivo* (et courbe dose-réponse correspondante) de fragments de myomètres murins prélevés à terme (G19), qui est induite en réponse à des doses croissantes de NmU. B) Essais de contraction *ex vivo* avec des utérus prélevés à G19 en réponse à NmU ou NmS (10^{-8} M). ANOVA unidirectionnelle, n = 4-5 souris/groupe, n.s. : non significatif. C) Des souris gestantes ont été traitées avec un lentivirus (LV.shNmU-R2 ou LV.shScrambled) à G15, puis leur utérus ont été extraits à terme (G19) afin de réaliser les essais de contraction *ex vivo* en réponse à NmU ou OT. Pour chaque segment utérin, la réponse contractile en présence de NmU a été normalisée avec la réponse contractile en présence d'OT (afin de contrôler la variabilité interindividuelle). ANOVA unidirectionnelle, n = 4-5 souris/groupe, * $p < 0,05$ D) Essais de contraction *ex vivo* en réponse à des doses croissantes de NmU effectués sur des fragments d'utérus prélevés de souris gestantes à G10, G14 ou G19 (à terme, juste après l'accouchement). $\text{PGF}_{2\alpha}$ et OT (10^{-8} M) ont été utilisés comme contrôles positifs. n = 4-5 souris/groupe et au moins 3 expériences. n.s. : non significatif, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ *versus* (vs) G10. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (*standard error of the mean*). L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

Figure 3.1

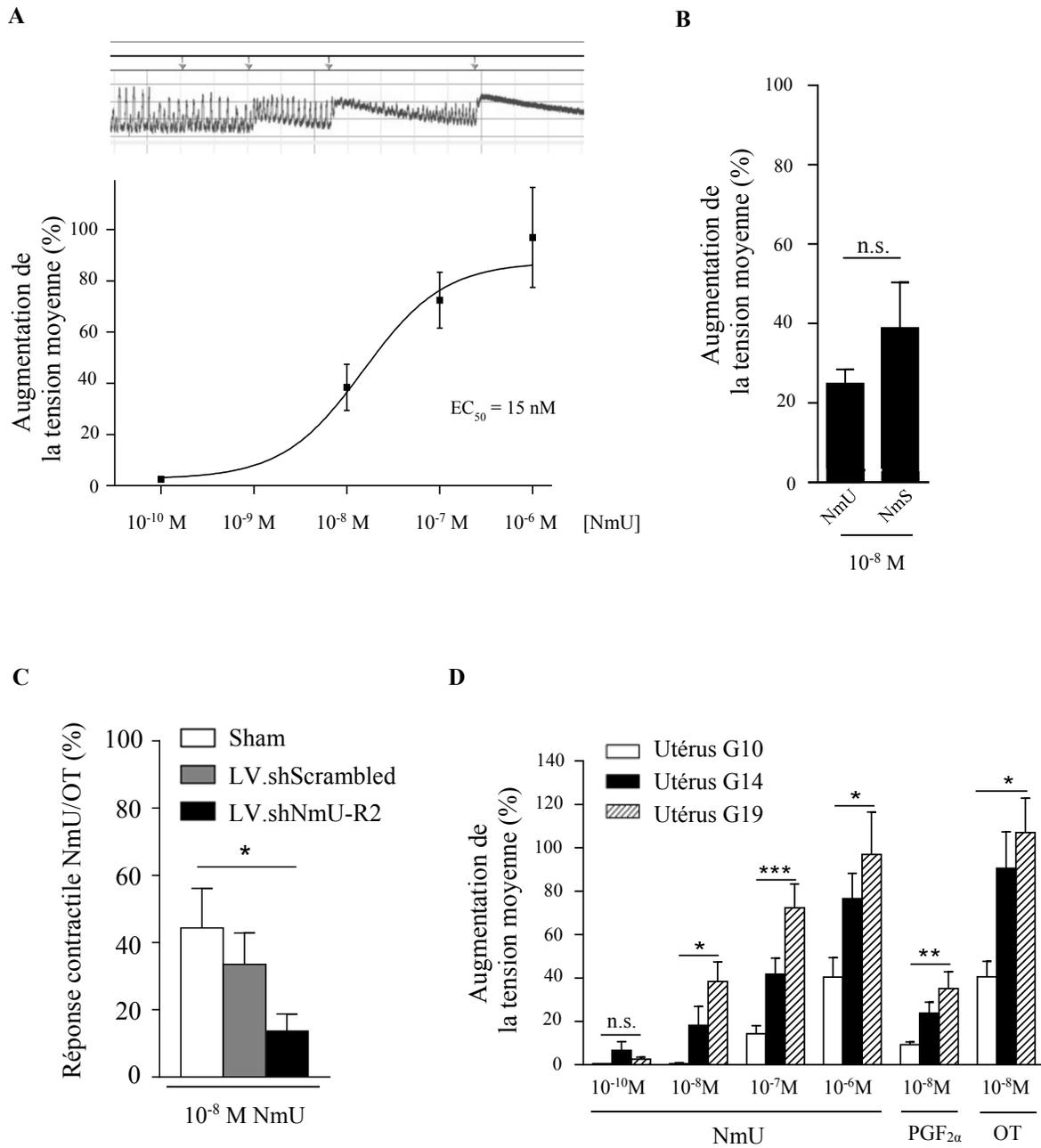
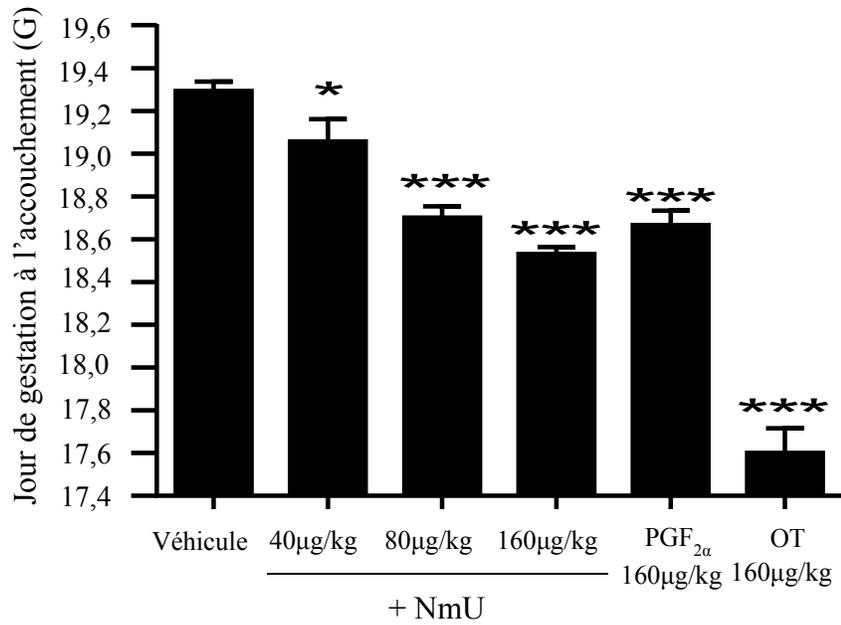


Figure 3.2 | NmU et NmS induisent le travail utérin de façon dose-dépendante chez la souris.

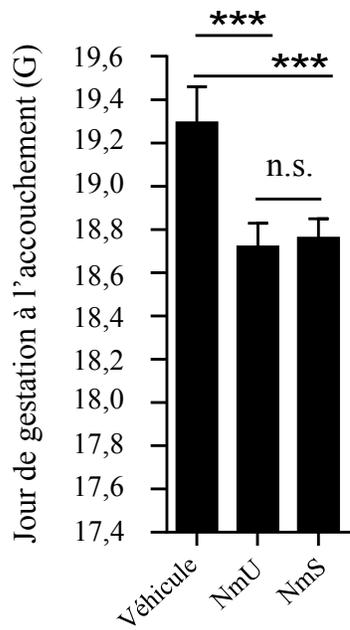
A) Des souris gestantes ont reçu des doses croissantes de NmU (injectée de manière intrapéritonéale [i.p.]) deux fois par jour à G17 et G18. Les souris contrôles se sont vues administrées un volume équivalent de saline. $\text{PGF}_{2\alpha}$ et OT ont été utilisés comme contrôles positifs (dose de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$). $n = 3-15$ souris/groupe * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs véhicule. B) Des souris gestantes ont reçu 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NmU ou NmS administrée par voie i.p. deux fois par jour à G17 et G18. $n = 5-15$ souris/groupe, n.s. : non significatif, *** $p < 0,001$ vs véhicule. C) Des souris gestantes ont été traitées avec un lentivirus (LV.shNmU-R2 ou LV.shScrambled) à G15, puis traitées avec 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NmU deux fois par jour à G17 et G18. $n = 3-15$ souris/groupe, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs NmU ou NmU + LV.shScrambled. Les souris contrôles traitées avec le véhicule ont été mises ensemble et présentées dans chaque graphique de la figure. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples, en comparant aux groupes contrôles.

Figure 3.2

A



B



C

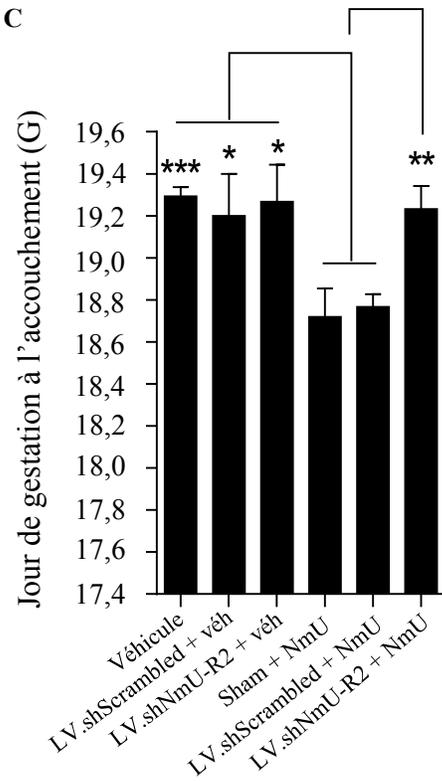


Tableau 3.1 | L'efficacité de NmU et de PGF_{2α} à induire le travail utérin chez la souris dépend de l'âge gestationnel.

Des souris gestantes ont reçu des doses (160 µg/kg) de NmU ou PGF_{2α} (injectée de manière intrapéritonéale [i.p.]) deux fois par jour, soit à G13-G14, à G15-G16 ou à G17-G18. PGF_{2α} a été utilisée comme contrôle positif. n = 3-9 souris/groupe. ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples, en comparant au véhicule. Valeurs accentuées en gras : p<0,05.

Substance injectée (dose par injection)	Jour de gestation lors d'injections (nombre de souris)	Jour de gestation à l'accouchement ± écart-type (à terme = 19,2)
NmU (160 µg/kg)	G13-14 (n = 4)	19,3 ± 0,34
	G15-16 (n = 4)	19,4 ± 0,19
	G17-18 (n = 9)	18,5 ± 0,10
PGF _{2α} (160 µg/kg)	G13-14 (n = 3)	19,4 ± 0,20
	G15-16 (n = 3)	19,3 ± 0,12
	G17-18 (n = 3)	18,7 ± 0,12

Valeurs en gras : p<0,05.

Figure 3.3 | NmU-R2 est essentiel pour l'induction du travail préterme causée par l'infection chez la souris.

Des souris gestantes ont été traitées avec des injections intra-utérines de véhicule (sham) ou de lentivirus (LV.shNmU-R2 ou LV.shScrambled) à G13 (une injection par corne utérine), puis traitées avec une injection unique i.p. de 10µg de LPS ou d'un volume équivalent de saline à G16. Le moment de la naissance a été rigoureusement notée. n = 3-11 souris/groupe, *p<0,05. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples, en comparant aux groupes contrôles.

Figure 3.3

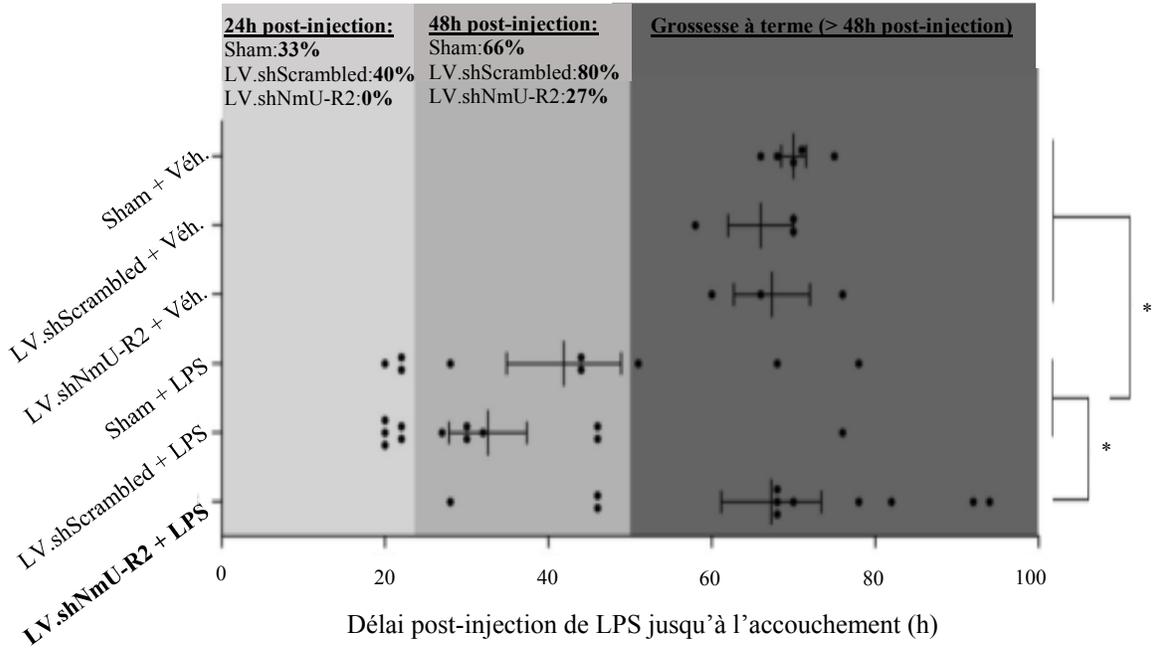


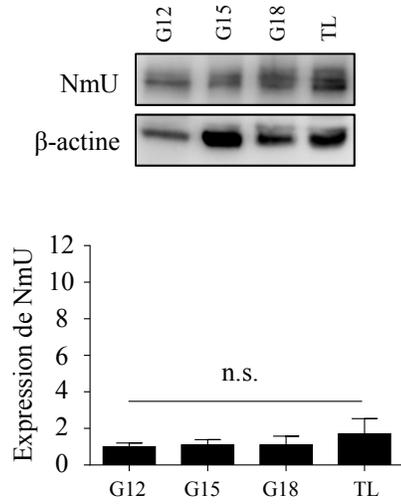
Figure 3.4 | L'expression de NmS (mais pas celle de NmU) augmente à l'approche du travail chez la souris et chez l'humain.

L'expression de NmS dans le placenta est plus élevée à l'approche du travail et à terme chez la souris et chez l'humain. A-B) Immunoblots effectués avec des placentas murins prélevés à divers jours de gestation (G12, G15, G18, TL : travail spontané à terme) et stimulés avec NmU (A) ou NmS (B). Les histogrammes sous les immunoblots montrent les analyses densitométriques des bandes protéiques normalisées avec β -actine et présentées en augmentation relative d'expression par rapport au groupe contrôle (G12). n = 4-5 souris/groupe, n.s. : non significatif, ***p<0,001 vs G12. C-D) Immunoblots effectués avec des biopsies de placentas humains prélevées de femmes enceintes accouchant à terme avec travail utérin (TL; *term labor*; n = 6) ou non (TNL; *term non labor*; n = 6) qui ont été stimulés avec NmU (C) ou NmS (D). Les histogrammes sous les immunoblots montrent les analyses densitométriques des bandes protéiques normalisées avec β -actine et présentées en augmentation relative d'expression par rapport au groupe contrôle (TNL). n= 6, n.s. : non significatif, *p<0,05 vs TNL. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

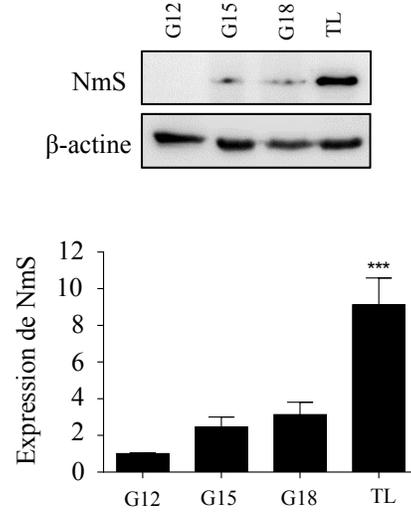
Figure 3.4

Placentas murins

A

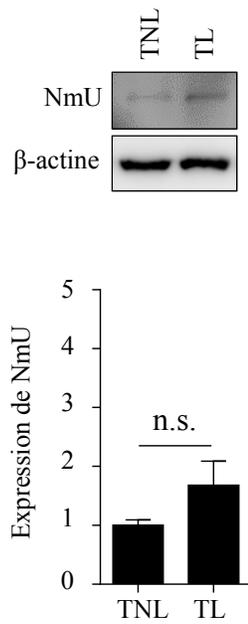


B



Placentas humains

C



D

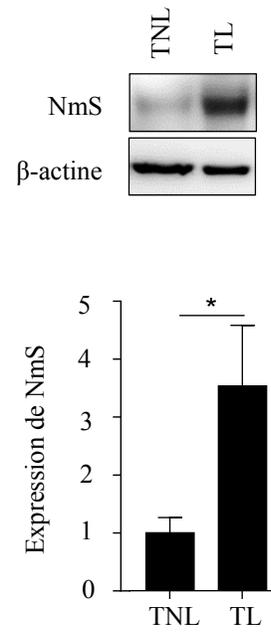
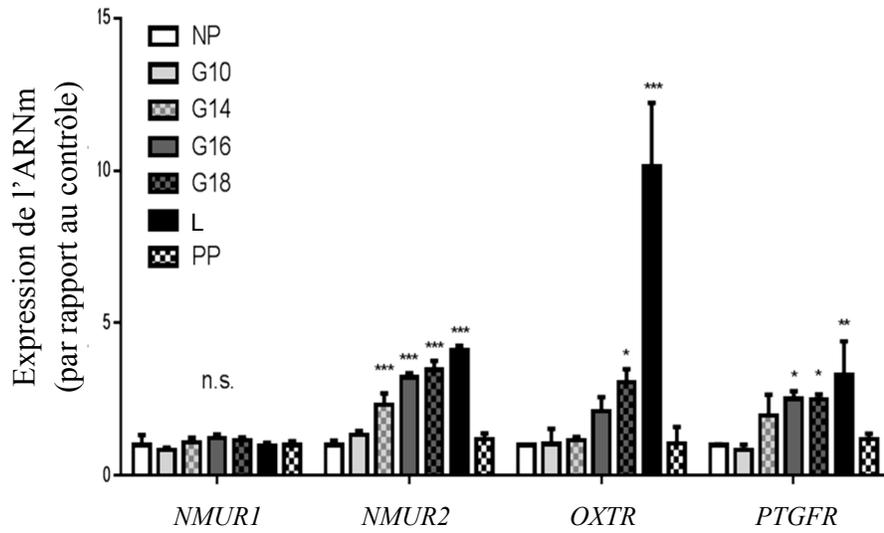


Figure 3.5 | L'expression génique et protéique de NmU-R2 dans l'utérus est maximale à l'approche du travail.

A) L'expression génique de NmU-R1 est demeurée constante au cours de la grossesse (utérus prélevés de souris NP : non enceintes; à G10, G14, G16, G18 : divers jours de gestation; L : durant le travail menant à l'accouchement; PP : *postpartum* 24 h) tandis que l'expression génique de NmU-R2 augmente graduellement durant la gestation pour atteindre une expression maximale à l'accouchement (L), puis diminue drastiquement en *postpartum* 24 h (PP). Les récepteurs de la prostaglandine F_{2α} (PTGFR) et de l'ocytocine (OXTR) ont été utilisés comme contrôles positifs. n= 5 expériences. n.s. : non significatif, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs NP. B) Immunoblot réalisé avec des utérus murins prélevés à divers jours de gestation (NP : non enceintes; à G10, G14, G16, G18 : divers jours de gestation; TL : durant le travail à terme spontané; PP : *postpartum* 24 h). L'histogramme sous l'immunoblot montre l'analyse densitométrique des bandes protéiques normalisées avec β-actine et présentées en augmentation relative d'expression par rapport au groupe contrôle (NP). n = 4-5 souris/groupe, ***p<0,001 vs NP. C) Immunoblot réalisé avec des biopsies de tissus myométriaux humains prélevés de femmes non enceintes (hystérectomie; NP, n= 4), d'une femme accouchant de façon prématurée ne montrant pas de signes cliniques de travail utérin (PTNL; *preterm non labor* ; n = 4) et de femmes enceintes accouchant à terme sans montrer de signes cliniques de travail utérin (TNL, n = 9). L'histogramme sous l'immunoblot montre l'analyse densitométrique des bandes protéiques normalisées avec β-actine et présentées en augmentation relative d'expression par rapport au groupe contrôle (NP). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs NP. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

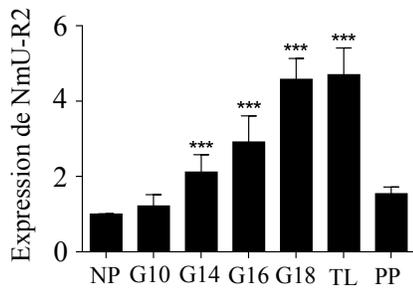
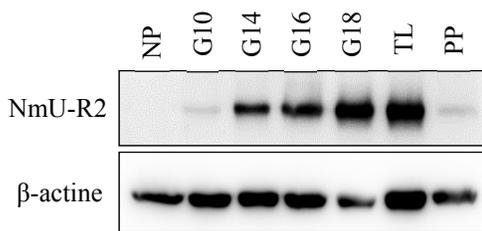
Figure 3.5

A



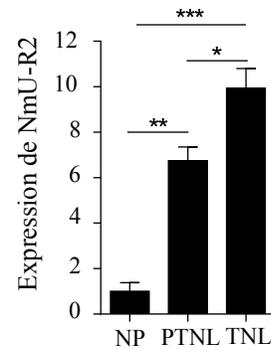
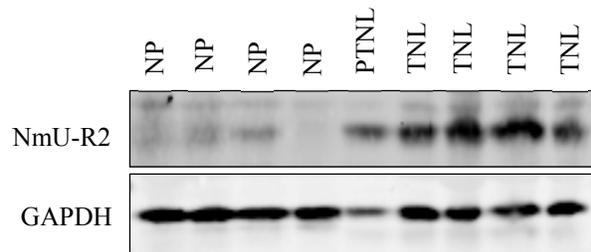
B

Utérus murins



C

Utérus humains



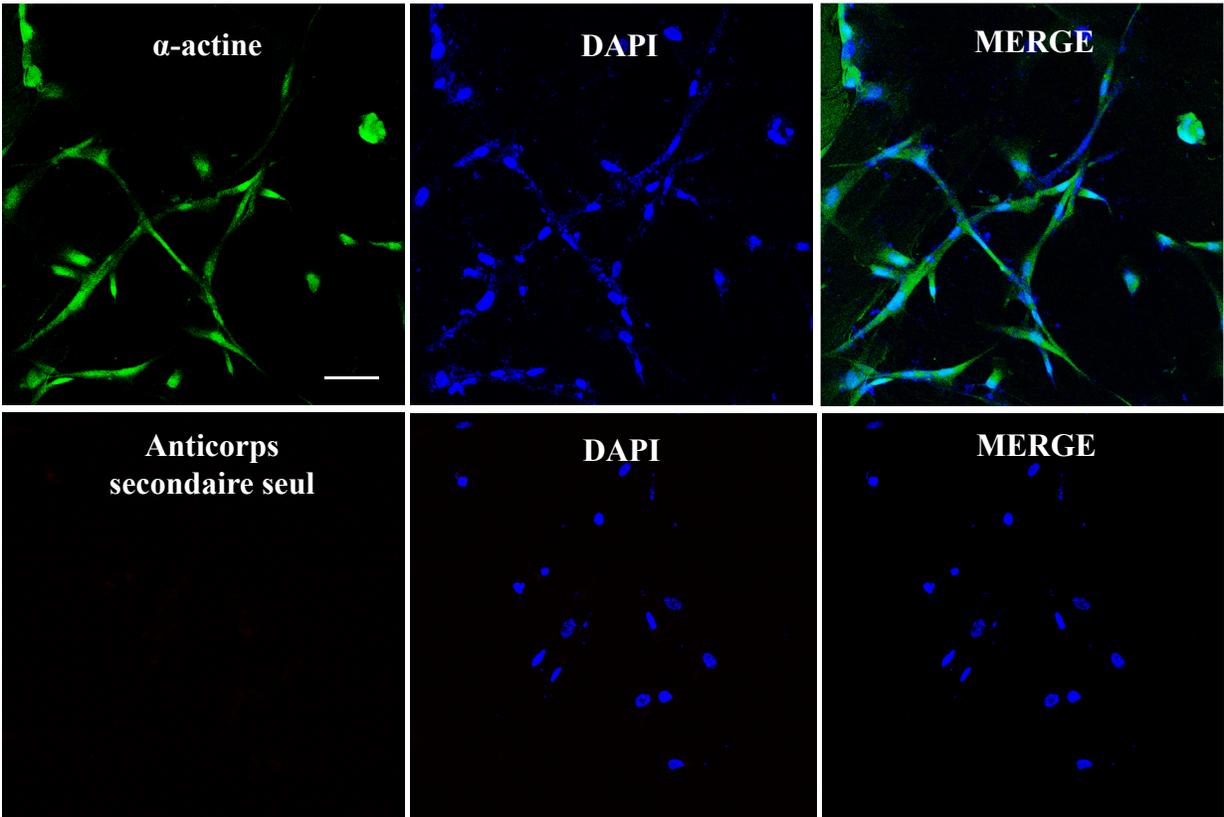
B) Mécanisme d'action et voie de signalisation intracellulaire

Figure 3.6 | NmU et NmS induisent une relâche intracellulaire de calcium dans les myocytes murins de façon dose-dépendante et âge gestationnel-dépendante.

A) La pureté des cellules mSMC isolées était > 95% (cellules immunoractives à l' α -actine). B) Essais de calcium effectués avec des cellules musculaires lisses de myomètres murins (mSMC) isolées de souris gestantes à G10 ou G19. $\text{PGF}_{2\alpha}$ et OT ont été utilisés comme contrôles positifs (10^{-5}M). n = 12-45 dans chaque groupe. *** $p < 0,001$ vs véhicule. C) Essais de calcium effectués avec des mSMC isolées de souris gestantes à G19 et traitées avec NmU ou NmS (10^{-5}M). n = 6-45 dans chaque groupe. n.s. = non significatif. D) La mobilisation calcique en réponse à NmU présentée lorsque normalisée avec la réponse calcique induite par OT. n = 6-12, *** $p < 0,001$ vs contrôle. E) Essais de calcium effectués avec des mSMC isolées de souris gestantes à G19 et prétraitées avec un lentivirus (LV.shNmU-R2 ou LV.shScrambled) pendant 72 h avant la stimulation avec NmU ou OT (10^{-7}M). n = 6-12, *** $p < 0,001$ vs véhicule. À noter que les solutions (NmU, NmS, $\text{PGF}_{2\alpha}$ et OT) sont dix fois moins concentrées lorsque la lecture de la plaque est effectuée. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

Figure 3.6

A



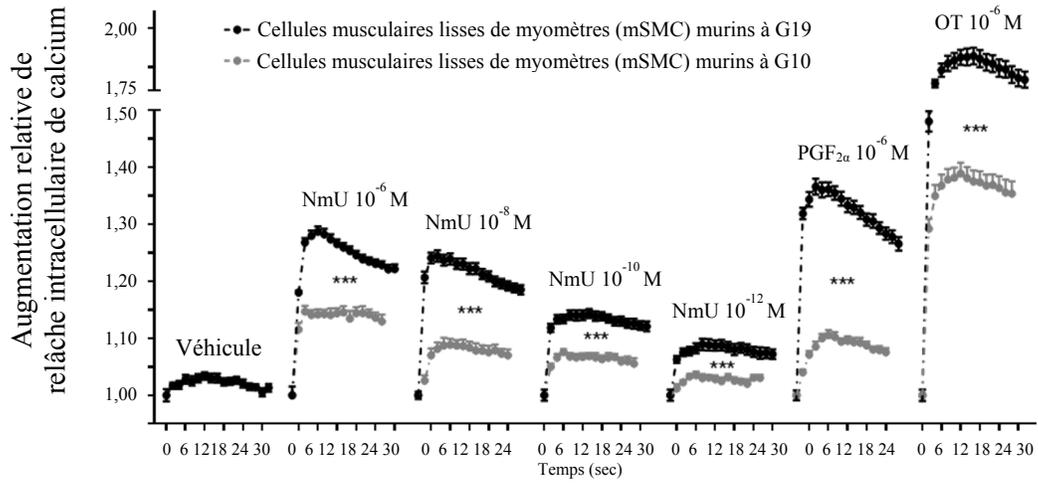
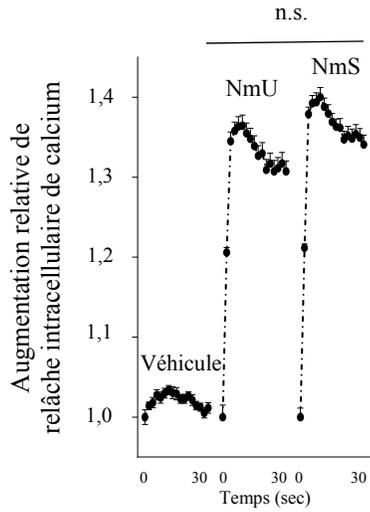
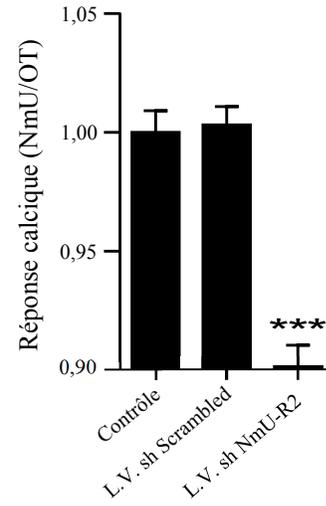
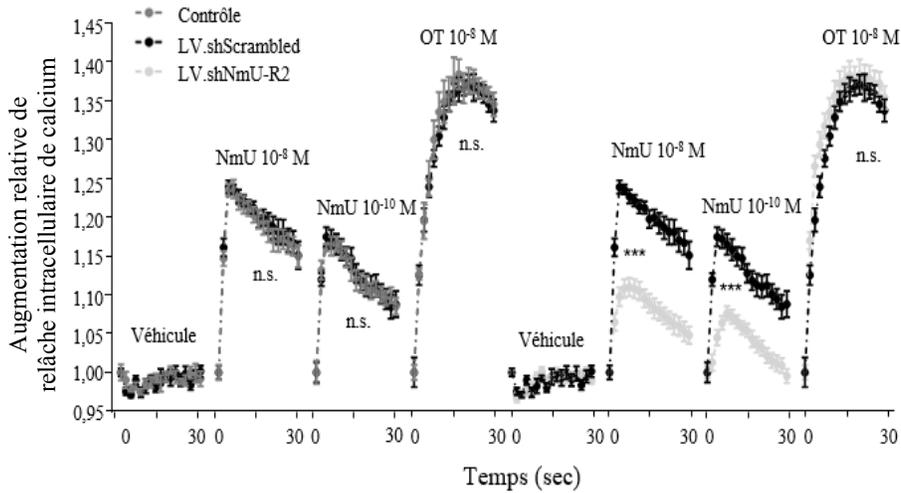
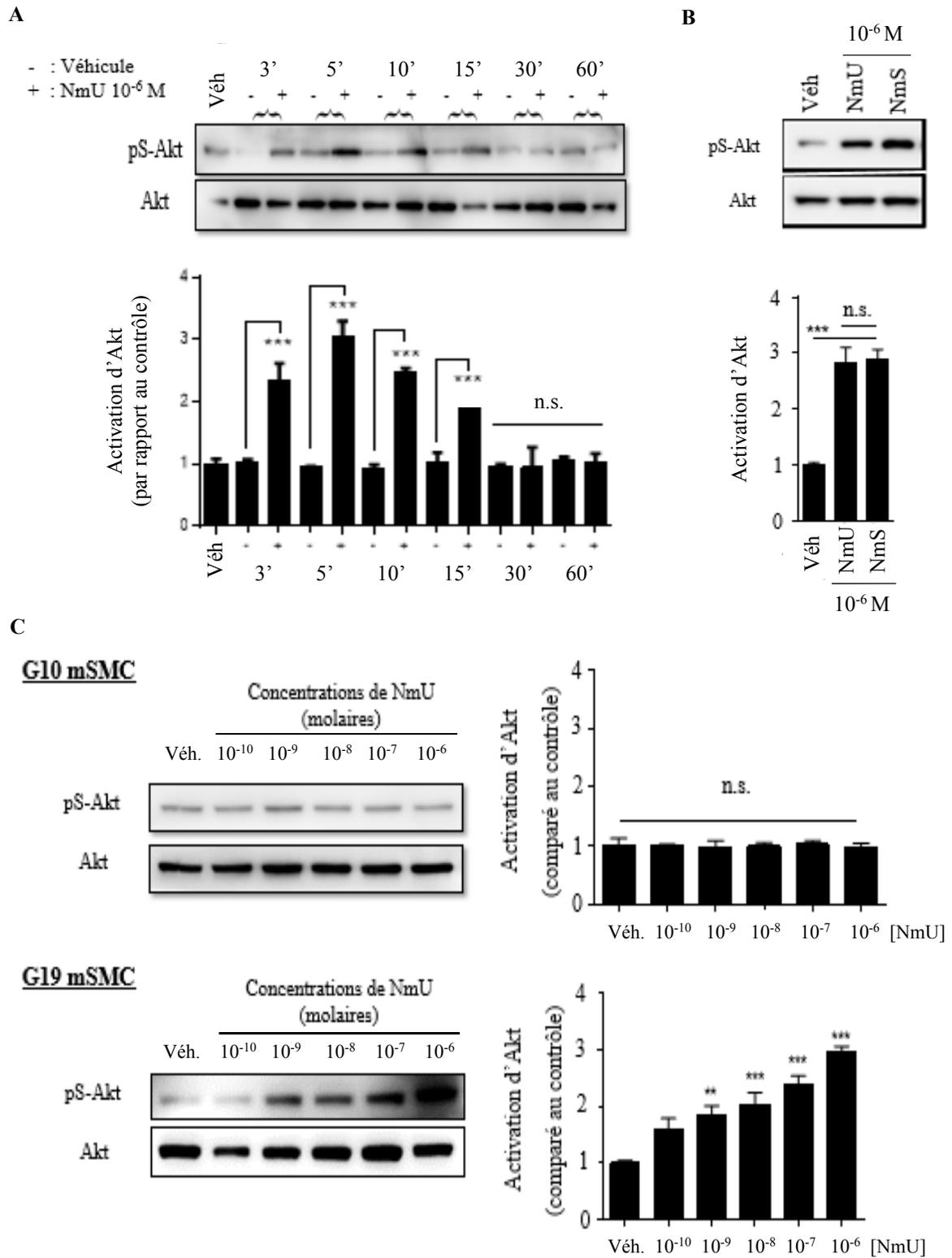
B**C****D****E**

Figure 3.7 | NmU et NmS activent les kinases Akt et Erk1/2 de façon dose-dépendante et âge-gestationnel dépendante dans les myomètres murins.

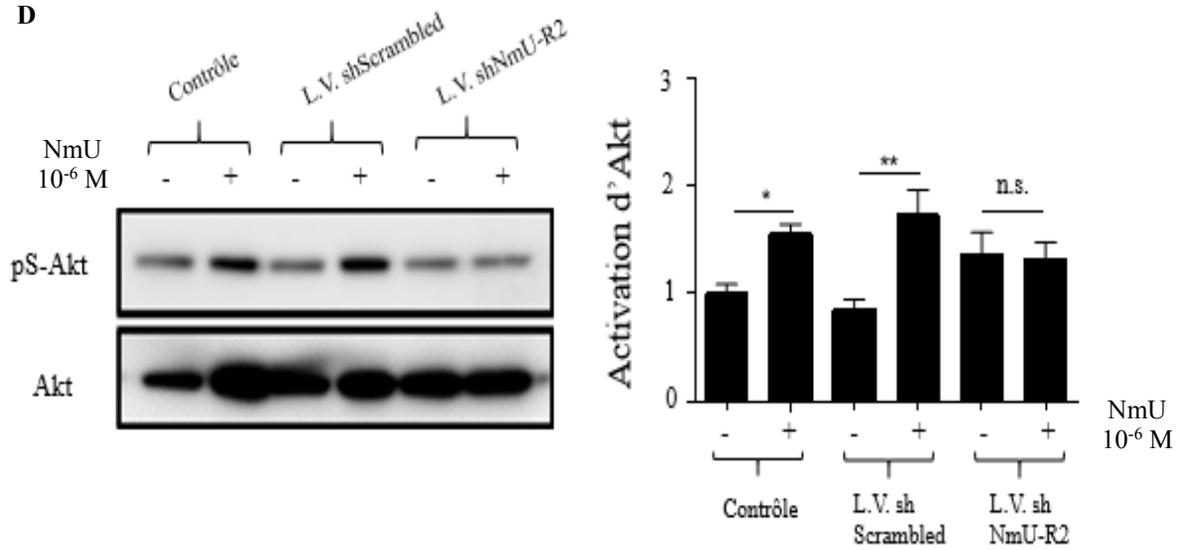
Les expériences ont été réalisées à l'aide de lysats de cellules musculaires lisses de myomètres murins (mSMC) isolées à partir d'utérus extraits à la moitié de la gestation (G10) ou à terme (G19), juste après l'accouchement. La pureté des cellules mSMC isolées était >95. NmU (A et E) (ANOVA unidirectionnelle, n = 4-5 expériences, n.s. : non significatif, ***p<0,001) et NmS (B et F) (ANOVA unidirectionnelle, n = 4-5 expériences, n.s. : non significatif, **p<0,01, ***p<0,001) ont induit l'activation d'Akt (A-B) pendant 15 min et de Erk1/2 (E-F) pendant 10 min. NmU et NmS ont activé Akt (C) et Erk1/2 (G) de manière dose-dépendante dans les mSMC prélevées à G19, mais pas dans les mSMC prélevées à G10. Les échantillons ont été normalisés avec les totaux respectifs. ANOVA unidirectionnelle, n = 4 expériences. *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001 vs véhicule. Cette activation d'Akt (D) et Erk1/2 (H) a été abrogée lorsqu'un *knock-down* du récepteur NmU-R2 est effectué au préalable : les mSMC ont été prétraitées avec LV.shNmU-R2 ou LV.shSrambled pendant 72 h avant la stimulation avec NmU (10⁻⁶M) durant 10 min. ANOVA unidirectionnelle, n = 4-5 expériences, n.s. : non significatif, *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001 vs véhicule. L'activation d'Akt en réponse à NmU est dépendante de PLCβ et de calmoduline puisqu'en stimulant des mSMC pendant 30 min avec des inhibiteurs commerciaux de PLCβ et de calmoduline (30μM chacun) avant la stimulation avec NmU (10⁻⁶M) pendant 10 min, Akt n'était pas phosphorylée (I). Ces inhibiteurs n'ont pas affecté l'activation de Erk1/2 (J). n = 3 expériences. n.s.= non significatif; **p<0,005; ***p<0,001 vs véhicule. En somme, la voie de signalisation hypothétique de NmU-R2, adaptée de celle du récepteur FP (Ohmichi et al., 1997), est présentée (K). Les astérisques (*) indiquent les étapes de la signalisation intracellulaire qui ont

été étudiées. PLC, phospholipase C; IP₃, inositol triphosphate; MLCK, kinase des chaînes légères de la myosine. n = 3 expériences. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

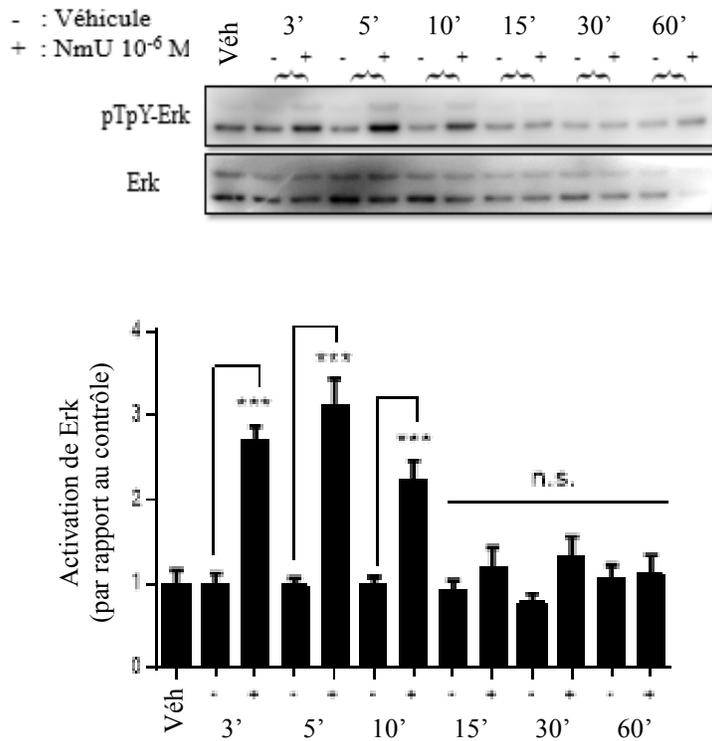
Figure 3.7



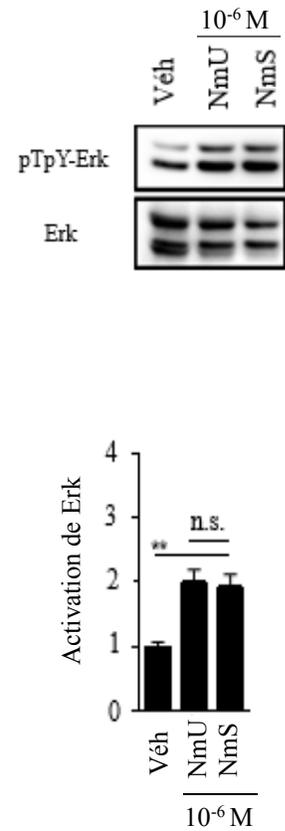
D



E

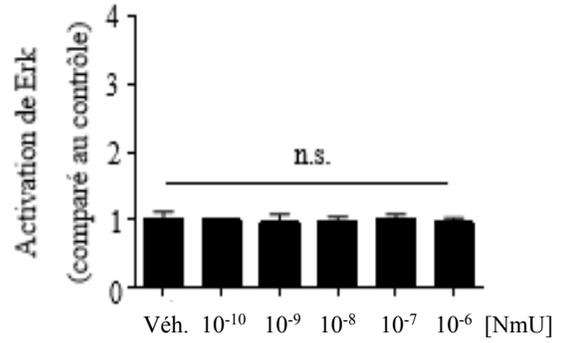
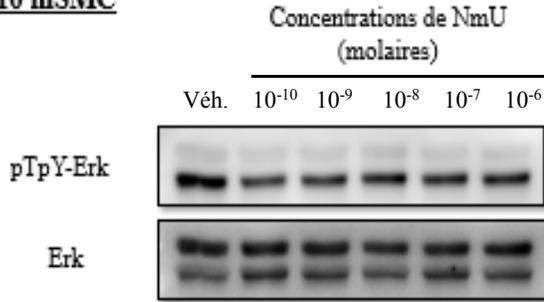


F

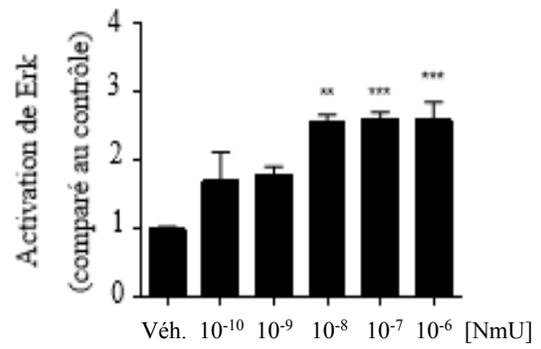
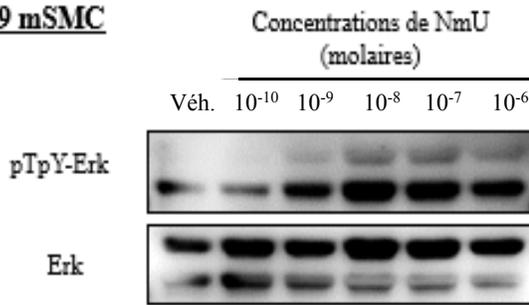


G

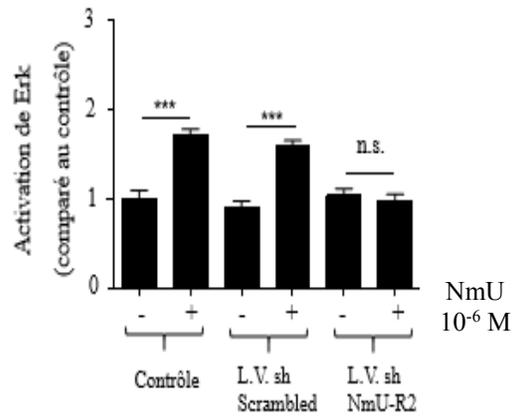
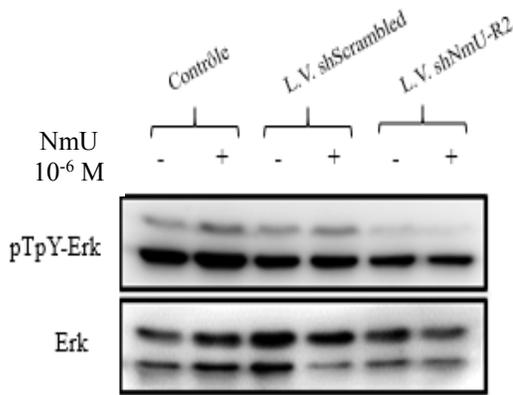
G10 mSMC

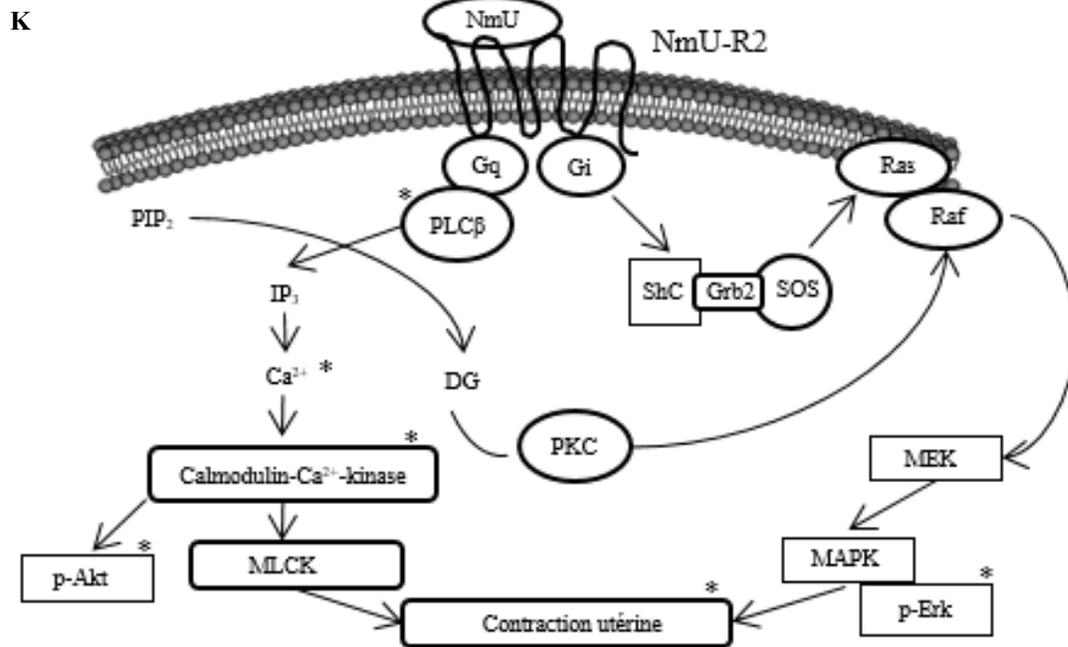
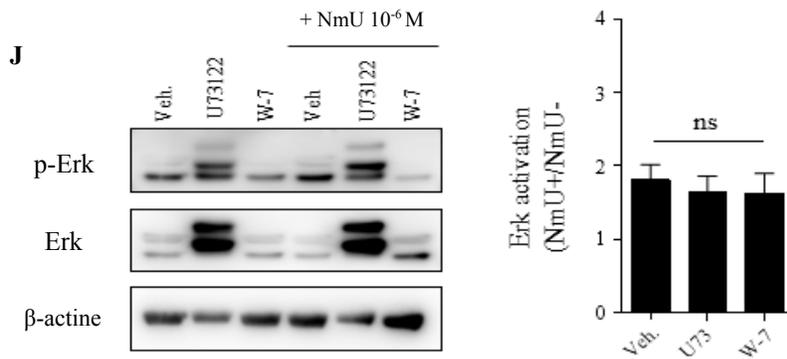
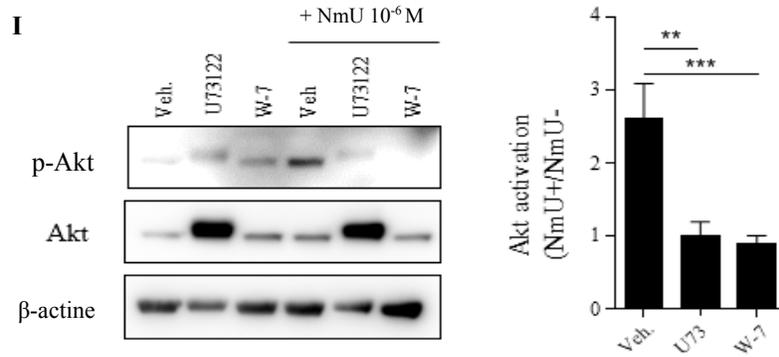


G19 mSMC



H





C) Caractérisation de peptides antagonistes de NmU-R2

Figure 3.8 | Peptide 5 inhibe les contractions utérines murines *ex vivo* effectuées à terme en réponse à NmU.

A) Les essais de contractions *ex vivo* ont été réalisées avec des utérus prélevés à terme (G19) juste après l'accouchement, et qui ont été stimulés avec différents peptides antagonistes (peptides 1 à 5) pendant 30 min avant la stimulation avec NmU (10^{-8} M, puis 10^{-7} M). n = 1-2 utérus. Nous avons répété l'expérience avec les deux meilleurs peptides dans les expériences préliminaires: peptide 3, 10^{-6} M (B) et peptide 5, 10^{-6} M (C). Nous avons également testé un peptide scrambled, 10^{-6} M (D). n = 4-7 expériences. n.s. : non significatif, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs véhicule. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'un T-test non apparié.

Figure 3.8

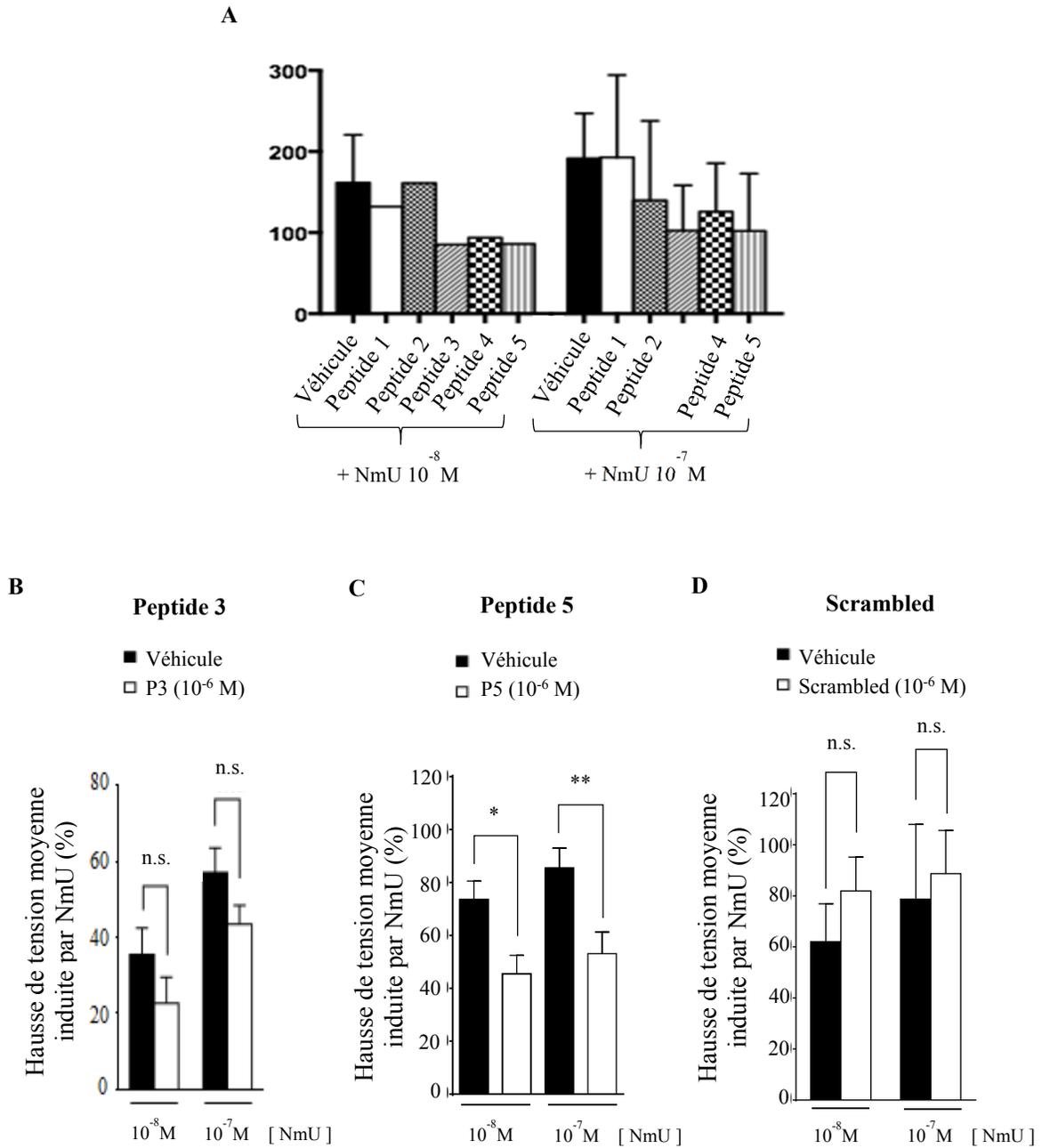
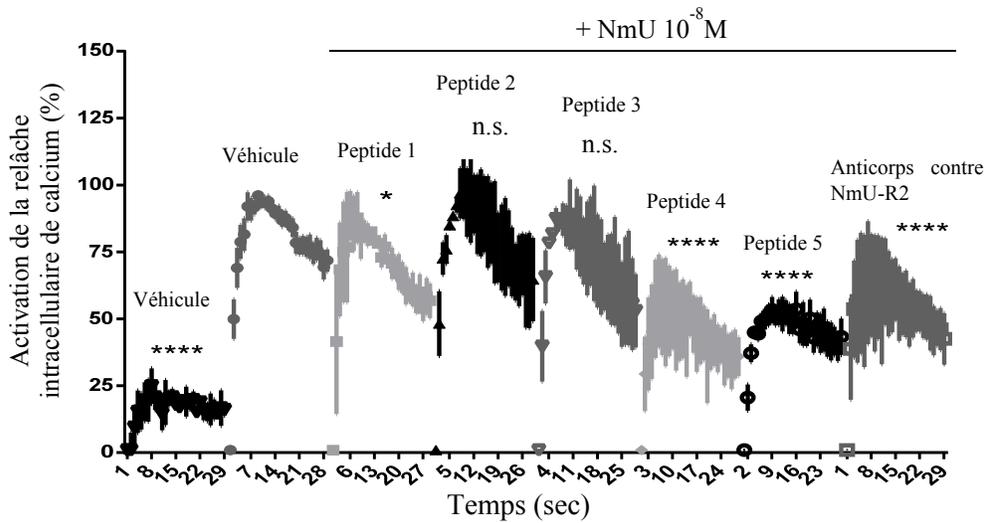


Figure 3.9 | Peptides 4 et 5 inhibent la relâche intracellulaire de calcium en réponse à NmU dans les cellules myométriales de souris.

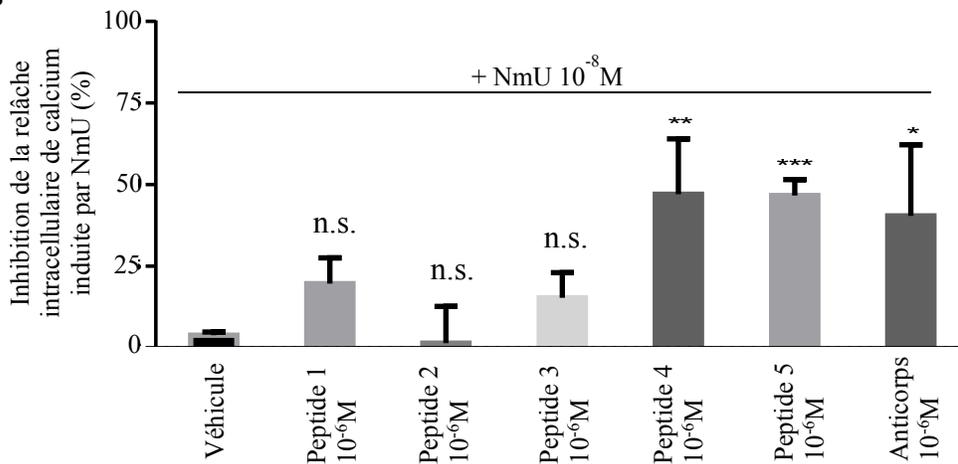
Des essais de calcium *in vitro* avec les cinq peptides antagonistes contre NmU-R2 ont été réalisés à l'aide de cellules myométriales primaires de souris (mSMC) isolées à partir d'utérus extraits à terme (G19), juste après l'accouchement. Ces cellules ont été stimulées 30 min avec les peptides (10^{-5} M) avant la stimulation avec NmU (10^{-7} M) et la mesure de relâche calcique intracellulaire. À noter que les solutions (NmU, NmS, peptides antagonistes, $\text{PGF}_{2\alpha}$ et OT) sont dix fois moins concentrées lorsque la lecture de la plaque est effectuée. A) Essais de calcium en réponse à NmU avec les divers peptides (1 à 5 (10^{-5} M)) ou l'anticorps commercial (10^{-5} M) contre NmU-R2. B) Présentation du résultat des essais de calcium (en A) sous forme de pourcentage d'inhibition de la relâche intracellulaire de calcium induite par NmU en présence des divers peptides. n=3-8 expériences individuelles. C-D) Le peptide 5 réduit la relâche intracellulaire de calcium *in vitro* induite par NmU de façon dose-dépendante. La courbe dose-réponse a été produite à partir des résultats d'essais de calcium en utilisant plusieurs concentrations du peptide 5. n=5-11 dans chaque groupe. n.s. : non significatif; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Les valeurs sont présentées en tant que moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

Figure 3.9

A



B



C

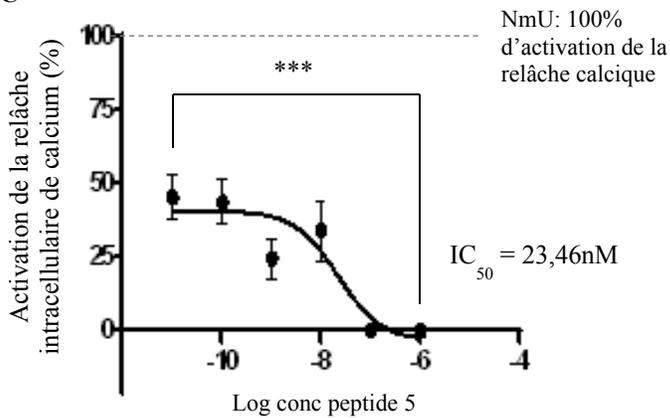
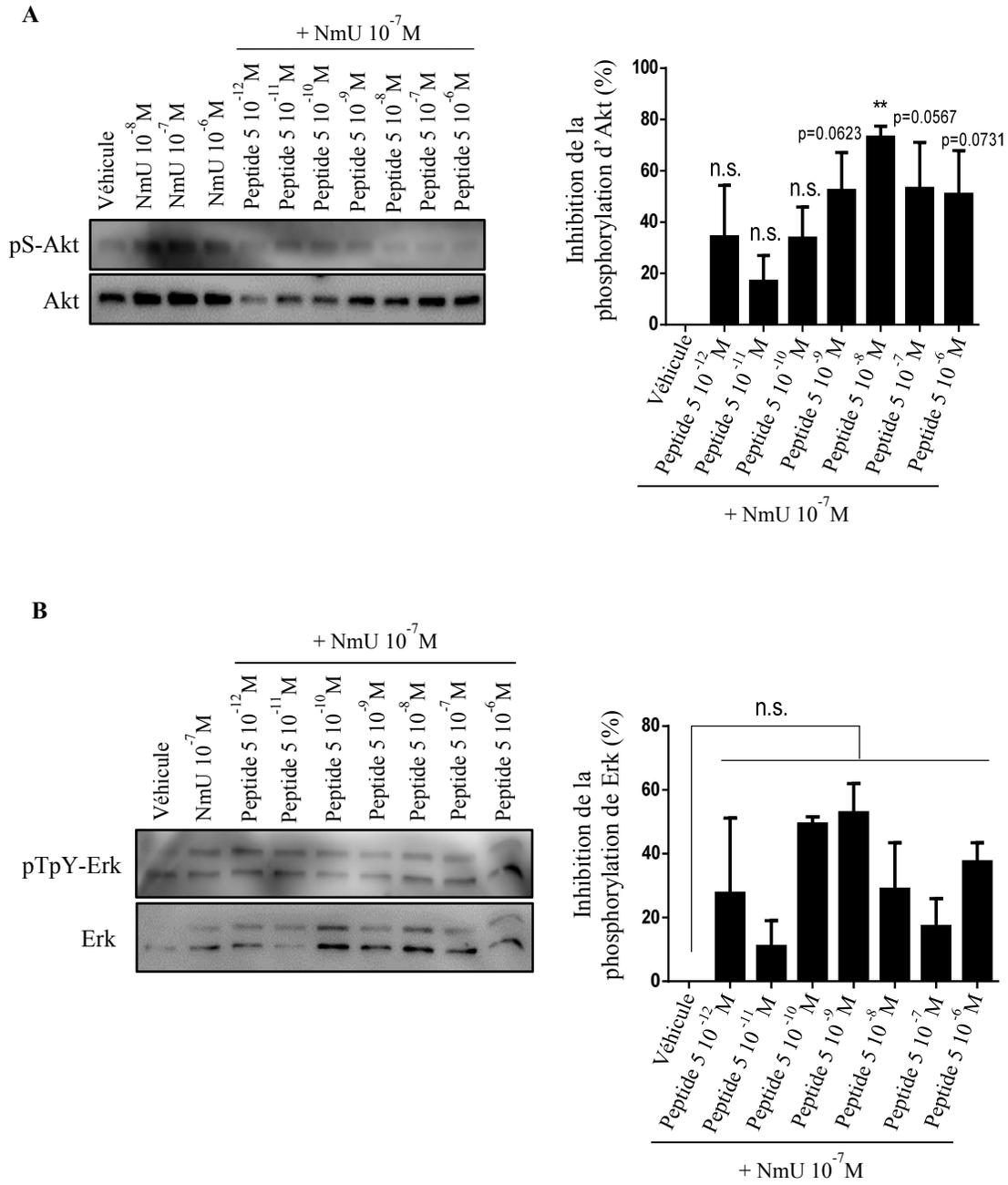


Figure 3.10 | Le peptide 5 module de façon sélective la voie de signalisation de NmU-R2 dans les cellules myométriales primaires de souris.

Les immunoblots, effectués avec des lysats de cellules myométriales primaires de souris (mSMC) qui ont été isolées à terme (G19) juste après l'accouchement, représentent la phosphorylation de Akt (A) et Erk1/2 (B). Ces cellules ont été stimulées 30 min avec les différentes concentrations de peptide 5 avant d'être stimulées avec NmU (10^{-7} M) pendant 10 min. Sur la droite, les histogrammes représentent l'analyse densitométrique des bandes protéiques normalisées avec Akt total (A) ou Erk1/2 total (B) et présentées en pourcentage d'inhibition de la phosphorylation par rapport au groupe contrôle (NmU 10^{-7} M). n.s. : non significatif; ** $p < 0,01$; $n = 4$ expériences. Les valeurs sont présentées en tant que moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett pour comparaisons multiples.

Figure 3.10



4. Discussion

La naissance prématurée (PTB) touche 15 millions d'enfants dans le monde et sa pathophysiologie n'est pas encore complètement comprise. Au cours de ce projet, nous avons élucidé le rôle des neuromédines U (NmU) et S (NmS) ainsi que du récepteur NmU-R2 dans l'induction du travail préterme (PTL) et à terme (TL). Nous avons démontré l'importance du NmU-R2 comme nouvelle cible potentielle dans la prévention de la PTB. Nous avons montré que les neuropeptides NmU et NmS étaient capables d'induire la contraction utérine et la relâche de calcium intracellulaire menant au raccourcissement de la durée de la gestation et ce, lorsqu'administrés en fin de gestation chez la souris. Nous avons aussi démontré que l'expression de NmS dans le placenta et NmU-R2 dans l'utérus était élevée à l'approche du travail, tant chez la souris que chez l'humain. D'ailleurs, il est reconnu que la souris est un bon modèle animal pour étudier divers aspects de la grossesse chez l'humain (Elovitz & Mrinalini, 2004; Migale et al., 2016). Nous avons également caractérisé *ex vivo* et *in vitro* cinq petits peptides antagonistes de NmU-R2 et identifié le meilleur candidat pour la poursuite de la caractérisation de ces molécules.

4.1 NmU et NmS induisent la contraction utérine *ex vivo*, le travail utérin *in vivo* et l'activation d'Akt et Erk1/2 ainsi que la relâche calcique *in vitro*, via NmU-R2.

Il a déjà été démontré par le groupe de Minamino et al., que NmU pouvait induire la contraction utérine (Minamino et al., 1985) et par le groupe de Prendergast et al., que l'induction de la contractilité utérine en réponse à NmU était indépendante du récepteur NmU-

R1 (Prendergast et al., 2006). Nous avons confirmé que le récepteur NmU-R2 avait un rôle important dans l'induction du travail utérin et de la contraction utérine.

L'étude du mécanisme d'action de NmU-R2 a démontré une activation des kinases Akt et Erk1/2 ainsi qu'une relâche intracellulaire de calcium dans les myocytes murins dépendantes de l'âge gestationnel, des doses de NmU utilisées et de l'expression du récepteur. L'activation des protéines Gαq/11 mène à l'activation de la phospholipase C, médiant la production d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) ainsi que la mobilisation du calcium situé dans le réticulum endoplasmique. Cependant, le mécanisme exact impliqué dans l'activation des kinases Akt et Erk1/2 par NmU ou NmS demeure inconnu. La voie de signalisation du NmU-R2 (**Figure 3.7 K**) est similaire à celles des récepteurs de la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}; récepteur : FP) et de l'ocytocine (OT; récepteur : OXTR), impliquant l'activation de la cascade des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases (Goupil et al., 2010; Ohmichi et al., 1997). En effet, la PGF_{2α} est connue pour notamment activer les voies de PI3K (dans laquelle se retrouve Akt) et Erk1/2 (Chen Xu et al., 2015). Par conséquent, nos résultats suggèrent que NmU-R2 constitue une nouvelle UAP, à l'instar du FP et de OXTR, agissant *via* la voie de signalisation Gq/11 (contraction due à la relâche calcique), Erk1/2 et Akt.

4.2 NmU-R2 est une cible valide pour prévenir la PTB.

Le travail utérin, processus qui précède l'accouchement, a lieu lorsque l'utérus quiescent devient activé. Durant cette activation, les UAPs sont davantage exprimées. NmU-R2 constitue probablement une nouvelle UAP puisque : 1) Son expression augmente dans

l'utérus humain et murin à terme et à l'approche du travail dans un modèle murin de travail préterme induit par l'inflammation *via* l'administration de l'utérotrrophine interleukine-1 β (résultats non inclus dans ce mémoire; voir l'article de Nadeau-Vallée et al. (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016)); 2) Ses ligands, NmU et NmS, provoque la relâche de calcium intracellulaire *in vitro* dans les myocytes murins, la contraction myométriale *ex vivo* et l'induction du travail utérin *in vivo* (effets pro-contractiles et pro-travail dose-dépendants et âge gestationnel-dépendants); 3) Les immunobuvardages de type Western ainsi que les PCR quantitatives réalisées montrent que l'expression du NmU-R2 augmente durant la gestation, atteint son maximum durant le travail utérin et diminue drastiquement en *postpartum*; 4) Ce récepteur contribue au déclenchement du travail utérin. Nos résultats montrent que l'expression de NmS est aussi augmentée à terme et à l'approche du travail dans le placenta de la souris et de l'humain, contribuant à l'activité utéro-contractile de NmU-R2.

Tout comme le récepteur de l'ocytocine (OT; récepteur : OXTR) dont l'expression augmente en fin de gestation et diminue drastiquement en *postpartum* (Yulia & Johnson, 2014), NmU-R2 est aussi une protéine associée au travail utérin qui est retrouvée au sein du système nerveux central (Ishiguro, Takeda, Fang, & Olson, 2014). De plus, le travail préterme induit par le LPS (de bactérie Gram négative) a été contré en effectuant un *knock-down* de NmU-R2 dans l'utérus. Ainsi, nos résultats suggèrent que NmU-R2 est un acteur important dans l'induction du PTL en contexte d'infection, tandis qu'il n'est pas requis pour le TL (les souris *knock-down* pour NmU-R2 ont accouché à terme). Il est probable que plusieurs mécanismes soient redondants afin d'assurer les contractions utérines menant à l'accouchement lorsque la grossesse est à terme. En effet, d'autres modèles murins ont montré une durée de gestation normale (donc un accouchement à terme) lorsque d'autres protéines

telles que IL-1R1, TNF α , OT, COX-1 ont été ciblées par un *knock-down* (Kimura et al., 1999). Jusqu'à présent, aucun tocolytique ne parvient à améliorer la santé néonatale des prématurés et à prévenir de manière significative les morbidités. Il est malheureusement trop tôt pour conclure quelque information que ce soit quant à l'impact d'un antagoniste de NmU-R2 sur le devenir fœtal. Dans l'article de Nadeau-Vallée et al. publié récemment, il a été montré avec un modèle murin de PTB induite par le LPS que prolonger la gestation *via* un *knock-down* du NmU-R2 améliore la survie néonatale (Nadeau-Vallee et al., 2016). Dans ce contexte, il serait intéressant de continuer à étudier les antagonistes de NmU-R2, plus particulièrement en lien avec les conséquences sur les nouveau-nés. Les UAPs sont des cibles potentielles très intéressantes dans le contexte de la PTB et pour toutes les raisons citées précédemment, NmU-R2 constitue une cible potentielle dans la prévention du PTL et de la PTB.

4.3 Les tocolytiques comme moyen de prévention de la PTB.

Face à la PTB, les cliniciens ont un défi de taille. D'abord, aucun agent pharmacologique existant ne peut prolonger la grossesse au-delà de 48 h de manière efficace en améliorant en même temps la santé du nouveau-né (Gotsch et al., 2009). Peu d'outils diagnostiques fiables sont disponibles et peu de thérapies préventives sont développées, ce qui complique l'identification des patientes à risque de PTB. De plus, en raison de la composante multifactorielle de ce syndrome, il n'y a pas de solution unique applicable à tous les types de PTB. Pour l'instant, les tocolytiques constituent la principale thérapie pour aider à retarder l'accouchement chez les femmes en travail, mais ils induisent de nombreux effets secondaires, ont une efficacité limitée et sont utilisés pour d'autres indications que celles pour lesquelles ils ont été approuvés (e.g. indométhacine, nifédipine) (Olson, Christiaens, Gracie, Yamamoto, &

Mitchell, 2008). L'atosiban, un antagoniste du récepteur de l'OT, est le seul composé à avoir été approuvé pour réduire les contractions au cours des 30 dernières années. Toutefois, malgré une efficacité comparable aux β -mimétiques, une thérapie de maintenance possible et une meilleure tolérance, la Food and Drug Administration n'a pas approuvé son usage aux États-Unis, limitant l'accès à ce tocolytique à l'Europe (Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group, 2001). Seules les femmes ayant un court col utérin ou un historique de PTL reçoivent l'hydroxyprogestérone (car elle n'est pas efficace dans les autres cas) (Saccone et al., 2015). Le développement d'autres tocolytiques est justifié dans le présent contexte clinique où peu de molécules semblent suffisamment efficaces. Les UAPs sont des cibles potentielles très intéressantes dans le contexte de la PTB étant donné qu'elles sont induites avant le travail utérin et que leurs fonctions jouent un rôle critique afin que le travail se produise de façon adéquate.

4.4 Conception de peptides

L'unique antagoniste de NmU-R2, développé par AstraZeneca, n'était pas disponible pour usage commercial et le développement a été cessé (Liu et al., 2009). Notre laboratoire a déjà conçu de petits peptides se liant ailleurs qu'au site orthostérique et bloquant des récepteurs tels que l'IL-1R (Nadeau-Vallee et al., 2015; C Quiniou et al., 2008), le FP (Goupil et al., 2010; Hirst et al., 2005; Peri et al., 2002), le EP4 (récepteur pour prostaglandine E2) (Leduc et al., 2013) et le PAFR (récepteur du PAF) (Beauchamp et al., 2002). Par conséquent, l'expertise nécessaire à la conception de peptides antagonistes contre NmU-R2 était présente au laboratoire.

Les cinq peptides antagonistes contre NmU-R2 ont été conçus, sachant que d'autres études ont montré qu'en se basant sur la structure protéique, il est possible de créer de petits peptides modulant la signalisation du récepteur de façon sélective (McDonnell et al., 1996). Notre laboratoire a analysé les motifs flexibles des boucles extracellulaires du récepteur humain de NmU-R2, puis créé une série de 15 petits D-peptides (ayant une séquence d'acides aminés différentes) imitant certaines sections de cette structure protéique. La configuration D des peptides procure une meilleure stabilité et n'affecte pas l'activité peptidique (Chalifour et al., 2003).

4.5 Les antagonistes de RCPGs comme option thérapeutique.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), possédant sept passages transmembranaires, ont été beaucoup étudiés dans les dernières années. Ils représentent la classe de cibles au sein du génome humain ayant le plus de succès dans le développement de médicaments, avec de 30 à 50% des médicaments sur le marché qui agissent via les RCPGs. Ces derniers sont des candidats de choix comme cibles thérapeutiques en raison de leur influence dans la régulation d'une variété de processus physiologiques et pathophysiologiques (Fang, Kenakin, & Liu, 2015). En effet, les RCPGs interagissent avec de nombreuses molécules (e.g. neurotransmetteurs, hormones, autres protéines de signalisation telles que les protéines G ou les β -arrestines) et sont capables d'adopter une conformation spécifique, dite tertiaire, après qu'un ligand se soit lié. Ainsi, l'affinité du RCPG lié par un ligand (endogène ou non) va changer pour les autres molécules qui peuvent interagir au site orthostérique ou ailleurs (Terry Kenakin, 2007a). Ceci permet aux RCPGs d'avoir des propriétés allostérique et fait de cette classe de récepteurs des candidats de choix dans le développement de nouveaux médicaments (Gao & Jacobson, 2013; Terry Kenakin, 2007a).

Dans ce projet, la conception d'antagonistes du NmU-R2 vise à réduire les contractions suffisamment pour prolonger la grossesse et prévenir la PTB ainsi que ses conséquences. À notre connaissance, nous démontrons pour la première fois les effets induits par l'antagonisme du NmU-R2 dans le contexte du PTL et de la PTB. Les effets induits par le peptide 5 suggèrent qu'il est le meilleur candidat pour la poursuite de la caractérisation, menant potentiellement à une autre possibilité de tocolyse pour les cliniciens d'ici plusieurs années.

a) Le peptide 5 inhibent les contractions *ex vivo* et la relâche de calcium *in vitro*.

Parmi les cinq peptides testés, le peptide 5 est celui qui possède les meilleures propriétés antagonistes contre NmU-R2 et constitue le meilleur candidat pour développer un potentiel nouveau tocolytique. En effet, dans les expériences de contraction *ex vivo* et de relâche calcique *in vitro*, il a démontré une inhibition significative de 40-50% comparativement à la réponse induite par NmU. Cette inhibition est légèrement moins élevée que celle observée dans l'étude de Hirst et al avec le THG113.31 (antagoniste du FP) (Hirst et al., 2005). Afin d'augmenter le pourcentage d'inhibition des effets pro-contractiles induits par NmU, l'optimisation du peptide 5 pourrait mener à la synthèse de dérivés plus efficaces.

Les expériences de relâche calcique *in vitro* ont démontré que le peptide 5 réduit la relâche intracellulaire de calcium de manière dose-dépendante. Toutefois, nous n'atteignons pas 100% de stimulation avec la concentration de peptide 5 à 10^{-11} M. Il est possible qu'une partie de la relâche calcique implique le NmU-R1 (aussi exprimé dans l'utérus (Nadeau-Vallee, Boudreault, et al., 2016) et assurant notamment la contraction des muscles lisses du tractus gastro-intestinal (Kaczmarek et al., 2006; Prendergast et al., 2006)), sans avoir

d'impact sur le PTL. C'est pourquoi des expériences visant à déterminer la spécificité du peptide 5 seraient intéressantes à réaliser. De plus, répéter l'expérience de relâche calcique dans les myocytes murins avec des doses plus faibles (10^{-12}M , 10^{-13}M) et plus élevées (10^{-5}M , 10^{-4}M) permettrait de savoir si un ou plusieurs plateaux sont atteints dans la courbe dose-réponse.

Une étude précédente rapporte que NmU-R2 est rapidement désensibilisé et qu'il s'internalise par un mécanisme impliquant les β -arrestines et la clathrine. De plus, la liaison de NmU à NmU-R2 est paradoxale, dans le sens où elle est qualifiée de pseudo-irréversible *in vitro* (aucune relâche de calcium n'est observée à la suite de traitements répétés à la NmU) mais de réversible dans des tissus intacts (des bandes de muscles lisses du côlon ont montré des contractions répétées) (Alhosaini, 2011).

b) Le peptide 5 module la signalisation de NmU-R2 et montre une caractéristique de l'allostérisme.

Nos résultats montrent que le peptide 5 tend à inhiber de façon dose-dépendante l'activation d'Akt médiée par NmU, mais n'affecte pas l'activation de Erk1/2. Ainsi, la modulation de la signalisation du NmU-R2 semble montrer une sélectivité fonctionnelle, en inhibant Akt (qui est associé à l'apoptose de la cellule et à la relâche calcique), mais en n'altérant pas l'activation de la cascade des MAP kinases (associée à des processus physiologiques qui assurent la prolifération cellulaire). La sélectivité fonctionnelle est une propriété pharmacologique souvent observée avec les inhibiteurs agissant sur des sites allostériques, c'est à-dire autre que le site de liaison naturel (orthostérique) du récepteur, dans

laquelle certaines voies de signalisation couplées au récepteur sont préservées ou même augmentées conséquemment à un changement de conformation du complexe récepteur-inhibiteur. La sélectivité fonctionnelle, telle que celle observée avec nos peptides anti-NmU-R2 (i.e. la voie Erk1/2 est préservée alors que celle d'Akt est modulée), a aussi été répertoriée avec des antagonistes du FP (Bourguet et al., 2011). Des études de liaison sont prévues afin de déterminer si le peptide 5 se lie au site orthostérique de NmU-R2 ou non.

5. Conclusion

Dans ce travail, nous avons décrit le rôle du système pro-contractile et pro-travail formé par NmU, NmS et NmU-R2 dans le déclenchement du PTL chez l'humain et la souris. NmU et NmS induisent la contraction utérine *ex vivo*, le travail utérin *in vivo* et la relâche intracellulaire de calcium *in vitro*. De plus, NmU-R2, NmU et NmS sont exprimées dans les tissus gestationnels murins et humains, et l'âge gestationnel de même que l'infection potentialisent l'expression de NmU-R2 et NmS. Globalement, nos résultats suggèrent que NmU-R2 joue un rôle dans la contraction utérine, dans l'induction du travail préterme associé à l'infection et signale *via* Erk1/2, Akt et la relâche calcique dans les myocytes myométriaux dans l'utérus à terme. De plus, le peptide 5 a de meilleures propriétés antagonistes contre NmU-R2 et constitue le meilleur candidat pour développer un potentiel agent tocolytique contre NmU-R2 et prévenir le travail préterme.

En somme, notre étude apporte un nouvel élément dans la compréhension de la pathophysiologie de la PTB, plus précisément dans les mécanismes physiologiques du travail utérin à terme et préterme. De plus, elle ouvre la porte au développement de nouvelles thérapies ciblant d'autres acteurs dans la cascade menant au PTL ainsi qu'à l'identification de nouveaux biomarqueurs pour faciliter l'identification des patientes à risque de PTB.

Jusqu'à maintenant, il demeure incertain que la combinaison de tocolytiques soit efficace à prolonger la gestation et/ou à améliorer la santé du nouveau-né. Cependant, d'autres études incluant les bloqueurs de canaux calciques ou l'atosiban (inhibant le récepteur de l'ocytocine) seraient les bienvenues. Par ailleurs, l'usage de divers tocolytiques (incluant ceux en développement; e.g. anti-FP, anti-OXTR, anti-NmU-R2) à divers moments de la gestation

(selon l'expression des récepteurs respectifs) pourrait peut-être s'avérer plus efficace à prévenir la PTB. Ainsi, nous suggérons que NmU-R2 soit une cible valide dans le développement de nouveaux tocolytiques et que le peptide 5 a du potentiel en tant que possible allostérique inhibant les contractions utérines menant à la PTB.

6. Directions futures

Ce projet met en lumière l'implication d'un système pro-contractile peu connu jusqu'à présent, composé des neuromédines U et S et du récepteur NmU-R2, dans l'induction du travail utérin à terme et préterme. Nous avons étudié la capacité de ce système à induire la contraction utérine et le travail préterme de même que le mécanisme d'action et nous avons débuté la caractérisation de peptides modulateurs du NmU-R2.

Il reste plusieurs expériences à effectuer avant de pouvoir utiliser un antagoniste du NmU-R2 dans des études cliniques et peut-être retrouver cette molécule sur le marché. La caractérisation des antagonistes de NmU-R2 peut se poursuivre en effectuant notamment :

- Des essais de liaison avec le peptide candidat et des cellules HEK (*human embryonic kidney*) exprimant ou non NmU-R2.
- L'évaluation de l'efficacité du peptide candidat à prévenir la PTB *in vivo* chez la souris CD-1 gestante, selon un modèle préétabli dans notre laboratoire (Goupil et al., 2010).
- L'évaluation de la spécificité du peptide candidat à l'aide de modèle murin *knock-out* pour NmU-R2.
- L'évaluation de la distribution du peptide candidat, une fois administré *in vivo* chez la souris CD-1 gestante, en marquant le peptide avec une protéine fluorescente et en utilisant des colorants cytoplasmiques et membranaires (Progatzky et al., 2013) pour repérer sa localisation tissulaire lors d'expériences *ex vivo* (e.g. savoir si la molécule se rend au cerveau ou au placenta).

- L'évaluation du développement néonatal des souriceaux (e.g. histologie, poids à la naissance, poids d'organes adultes, etc), suite à l'administration du peptide candidat, selon un modèle préétabli dans notre laboratoire (Nadeau-Vallée et al., 2017).
- L'optimisation du peptide candidat pour améliorer son efficacité d'action.
 - Alanine scan : évaluer quels acides aminés sont importants pour l'activité peptidique en changeant un à un les acides aminés de la séquence pour une alanine (acide aminé neutre de taille moyenne).
 - Troncation du peptide : tronquer le peptide pour trouver la plus petite séquence d'acides aminés possible tout en conservant la fonction.
 - Substitution dans la séquence du peptide :
 - *Conservatrice* : Modifier un acide aminé de la séquence pour un acide aminé de la même famille, ce qui change la structure peptidique sans modifier la fonction.
 - *Non conservatrice* : Modifier un acide aminé de la séquence pour un acide aminé d'une autre famille, ce qui influence la structure et la fonction du peptide (e.g. en enlevant une charge négative ou en introduisant une charge positive).
 - Modifications chimiques : introduire des changements dans la chaîne latérale d'un ou plusieurs acides aminés afin d'améliorer l'efficacité, d'influencer l'activité et l'affinité du peptide.

7. Publications

Articles de journaux révisés par les pairs

- **Boudreault A** et Beaudoin A. Pseudo-Operational Study on the Efficiency of Various Fingermark Development Techniques During the Aging Process, Journal of Forensic Identification. 2017 Janv-Mar; 67(1): 85-117.

- *Implication: Participation au design expérimental. Contribution expérimentale. Analyse de données. Participation à l'écriture du manuscrit et ses corrections.*

- Nadeau-Vallée M, Chin PY, Belarbi L, Brien ME, Pundir S, Berryer M, Beaudry-Richard A, Madaan A, Sharkey D, Lupien-Meilleur A, Hou X, Quiniou C, Beaulac A, Boufaied I, **Boudreault A**, Carbonaro A, Joyal JS, Lubell WD, Olson DM, Robertson SA, Girard S, Chemtob S. Antenatal Suppression of Interleukin-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. J Immunol. 2017 Mar 1;198(5):2047-2062.

- *Implication: Contribution expérimentale pour les corrections de l'article.*

- Nadeau-Vallée M, **Boudreault A**, Leimert K, Hou X, Obari D, Madaan A, Rouget R, Zhu T, Belarbi L, Brien ME, Beaudry-Richard A, Olson DM, Girard S et Chemtob S. Uterotonic neuromedin U receptor 2 and its ligands are upregulated by inflammation in mice and humans, and elicit preterm birth. Biol Reprod. 2016 Sep;95(3):72.

- *Implication: Participation au design expérimental. Contribution expérimentale. Analyse de données. Participation à l'écriture du manuscrit et ses corrections.*

- Nadeau-Vallée M, Quiniou C, Palacios J, Hou X, Sanchez M, Madaan A, Leimert K, Erfani A, **Boudreault A**, Duhamel F, Rivera JC, Noueihed B, Lubell W, Ni X, Robertson S, Olson D, Girard S et Chemtob S. Novel Non-competitive Interleukin-1 Receptor Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-induced Preterm Birth. J Immunol. 2015 Oct 1;195(7):3402-15.

- *Implication: Contribution expérimentale. Participation à l'écriture du manuscrit et ses corrections.*

- Nadeau-Vallée M, Palacios J, **Boudreault A** et Chemtob S. New insights to prevent preterm labor. Medicine Sciences (Paris) 2015; 31(4): 374-376.

- *Implication: Participation à l'écriture du manuscrit et ses corrections.*

8. Bibliographie

- Adams Waldorf, K. M., Singh, N., Mohan, A. R., Young, R. C., Ngo, L., Das, A., ... Johnson, M. R. (2015). Uterine overdistention induces preterm labor mediated by inflammation: observations in pregnant women and nonhuman primates. *Am J Obstet Gynecol*, 213(6), 830.e1-830.e19. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.028>
- Alhosaini, K. a. M. (2011). *Signalling, Desensitization and Resensitization of Neuromedin U Receptors*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2381/10166>
- Anderson, J. G., Baer, R. J., Partridge, J. C., Kuppermann, M., Franck, L. S., Rand, L., ... Rogers, E. E. (2016). Survival and Major Morbidity of Extremely Preterm Infants: A Population-Based Study. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-4434>
- Antonucci, R., Zaffanello, M., Puxeddu, E., Porcella, A., Cuzzolin, L., Piloni, M. D., & Fanos, V. (2012). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. *Curr Drug Metab*, 13(4), 474–490.
- Arenas-Hernandez, M., Romero, R., St Louis, D., Hassan, S. S., Kaye, E. B., & Gomez-Lopez, N. (2015). An imbalance between innate and adaptive immune cells at the maternal-fetal interface occurs prior to endotoxin-induced preterm birth. *Cell Mol Immunol*. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.22>
- Bain, E., Heatley, E., Hsu, K., & Crowther, C. A. (2013). Relaxin for preventing preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, 8, Cd010073. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010073.pub2>
- Barradas, D. T., Wasserman, M. P., Daniel-Robinson, L., Bruce, M. A., Isselmann DiSantis, K., Navarro, F. H., ... Goodness, B. M. (2016). Hospital Utilization and Costs Among Preterm Infants by Payer: Nationwide Inpatient Sample, 2009. *Maternal and Child Health Journal*, 20(4), 808–818. <https://doi.org/10.1007/s10995-015-1911-y>
- Beauchamp, M. H., Marrache, A. M., Hou, X., Gobeil, F., Bernier, S. G., Lachapelle, P., ... Chemtob, S. (2002). Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(10), 3327–3337.
- Behrman, R. E., & Butler, A. S. (2007). Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. In R. E. Behrman & A. S. Butler (Eds.), *National Academy of Sciences* (First edit). Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.

<https://doi.org/10.17226/11622>

- Bennett, P. (2012). Preterm Labour. In D. K. Edmonds (Ed.), *Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology* (8e ed., pp. 338–355). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Bernal, A. L., & Norwitz, E. R. (2012). The Normal Mechanisms of Labour. In D. K. Edmonds (Ed.), *Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology* (pp. 247–268). Oxford UK: Wiley-Blackwell.
- Bhandari, A., Carroll, C., & Bhandari, V. (2016). BPD Following Preterm Birth: A Model for Chronic Lung Disease and a Substrate for ARDS in Childhood. *Front Pediatr*, 4, 60. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00060>
- Blackburn, S. (2013). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*. (S. Elsevier, Ed.) (4th Editio).
- Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A.-B., ... Lawn, J. (2013). Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1742-4755-10-S1-S2>
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., ... Lawn, J. E. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*, 379(9832), 2162–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60820-4)
- Bolden, J. R. (2014). Acute and chronic tocolysis. *Clin Obstet Gynecol*, 57(3), 568–578. <https://doi.org/10.1097/grf.0000000000000053>
- Bottcher, B., Laterza, R. M., Wildt, L., Seufert, R. J., Buhling, K. J., Singer, C. F., ... Smith, R. P. (2014). A first-in-human study of PDC31 (prostaglandin F2alpha receptor inhibitor) in primary dysmenorrhea. *Hum Reprod*, 29(11), 2465–2473. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu205>
- Bourguet, C. B., Goupil, E., Tassy, D., Hou, X., Thouin, E., Polyak, F., ... Lubell, W. D. (2011). Targeting the Prostaglandin F2 α Receptor for Preventing Preterm Labor with Azapeptide Tocolytics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(17), 6085–6097. <https://doi.org/10.1021/jm200608k>
- Brighton, P. J., Szekeres, P. G., & Willars, G. B. (2004). Neuromedin U and its receptors:

- structure, function, and physiological roles. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 231–248. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.3>
- Brighton, P. J., Szekeres, P. G., Wise, A., & Willars, G. B. (2004). Signaling and ligand binding by recombinant neuromedin U receptors: evidence for dual coupling to Galphaq/11 and Galphai and an irreversible ligand-receptor interaction. *Mol Pharmacol*, 66(6), 1544–1556. <https://doi.org/10.1124/mol.104.002337>
- Brighton, P. J., Wise, A., Dass, N. B., & Willars, G. B. (2008). Paradoxical behavior of neuromedin U in isolated smooth muscle cells and intact tissue. *J Pharmacol Exp Ther*, 325(1), 154–164. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132803>
- Budhiraja, S., & Chugh, A. (2009). Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential. *Fundam Clin Pharmacol*, 23(2), 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00667.x>
- Canadian Institute for Health Information. (2006). *Giving Birth in Canada: The Costs*. Canadian Institute for Health Information. <https://doi.org/10.1086/423574>
- Cappelletti, M., Della Bella, S., Ferrazzi, E., Mavilio, D., & Divanovic, S. (2016). Inflammation and preterm birth. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), 67–78. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0615-272RR>
- Catov, J. M., Scifres, C. M., Caritis, S. N., Bertolet, M., Larkin, J., & Parks, W. T. (2017). Neonatal outcomes following preterm birth classified according to placental features. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 411.e1-411.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.12.022>
- Chalifour, R. J., McLaughlin, R. W., Lavoie, L., Morissette, C., Tremblay, N., Boul??, M., ... Gervais, F. (2003). Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the ??-amyloid peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 34874–34881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212694200>
- Challis, J. R., Patel, F. A., & Pomini, F. (1999). Prostaglandin dehydrogenase and the initiation of labor. *J Perinat Med*, 27(1), 26–34. <https://doi.org/10.1515/jpm.1999.003>
- Chisholm, K. M., Heerema-Mckenney, A., Tian, L., Rajani, A. K., Saria, S., Koller, D., & Penn, A. A. (2016). Correlation of preterm infant illness severity with placental histology. *Placenta*, 39, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.012>
- Chmaj-Wierzchowska, K., Olejniczak, T., Tuzel, J., Niepsuj-Binias, J., Kaczorowska, I.,

- Samara, H., ... Szymanowski, K. (2016). Threatened preterm labour - analysis of the cytokine profile and progesterone treatment efficiency. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1–4. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1186638>
- Christiaens, I., Zaragoza, D. B., Guilbert, L., Robertson, S. A., Mitchell, B. F., & Olson, D. M. (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *Journal of Reproductive Immunology*, 79(1), 50–57. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2008.04.002>
- Cook, J. L., Shallow, M. C., Zaragoza, D. B., Anderson, K. I., & Olson, D. M. (2003). Mouse Placental Prostaglandins Are Associated with Uterine Activation and the Timing of Birth. *Biol Reprod*, 68(2), 579–587. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008789>
- Cook, J. L., Zaragoza, D. B., Sung, D. H., & Olson, D. M. (2000). Expression of Myometrial Activation and Stimulation Genes in a Mouse Model of Preterm Labor: Myometrial Activation, Stimulation, and Preterm Labor. *Endocrinology*, 141(5), 1718–1728. <https://doi.org/doi:10.1210/endo.141.5.7474>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, 72(11), 8463–71. <https://doi.org/98440501>
- Ehlert, F. J. (2005). Analysis of allosterism in functional assays. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 315(2), 740–754. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.090886>
- Ehlert Frederick J. (1988). Energetics of conformational changes in receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 9(11), 393–394.
- Elovitz, M. A., & Mrinalini, C. (2004). Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab*, 15(10), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.10.009>
- Esplin, M. (2016). The Importance of Clinical Phenotype in Understanding and Preventing Spontaneous Preterm Birth. *Am J Perinatol*, 33(3), 236–244.
- Fang, Y., Kenakin, T., & Liu, C. (2015). Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. *Frontiers in Pharmacology*, 6(JAN), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00295>
- Flenady, V., Wojcieszek, A. M., Papatsonis, D. N., Stock, O. M., Murray, L., Jardine, L. A., & Carbonne, B. (2014). Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour and birth. *Cochrane Database Syst Rev*, (6), Cd002255. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002255.pub2>

- Fuchs, A. R., Fields, M. J., Freidman, S., Shemesh, M., & Ivell, R. (1995). Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha and E2 release. *Adv Exp Med Biol*, 395, 405–420.
- Fukue, Y., Sato, T., Teranishi, H., Hanada, R., Takahashi, T., Nakashima, Y., & Kojima, M. (2006). Regulation of gonadotropin secretion and puberty onset by neuromedin U. *FEBS Lett*, 580(14), 3485–3488. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.025>
- Gao, Z. G., & Jacobson, K. A. (2013). Allosteric modulation and functional selectivity of G protein-coupled receptors. *Drug Discovery Today: Technologies*, 10(2), e237–e243. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.004>
- Germain, A. M., Smith, J., Casey, M. L., & MacDonald, P. C. (1994). Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonin degradation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(2), 463–470. <https://doi.org/doi:10.1210/jcem.78.2.8106636>
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81(2), 629–683.
- Glass, H. C., Costarino, A. T., Stayer, S. A., Brett, C. M., Cladis, F., & Davis, P. J. (2015). Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*, 120(6), 1337–1351. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000000705>
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 371(9606), 75–84. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60074-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60074-4)
- Gomez-Lopez, N., Laresgoiti-Servitje, E., Olson, D. M., Estrada-Gutierrez, G., & Vadillo-Ortega, F. (2010). The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review. *Biol Reprod*, 82(5), 809–814. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080432>
- Gomez-Lopez, N., Vega-Sanchez, R., Castillo-Castrejon, M., Romero, R., Cubeiro-Arreola, K., & Vadillo-Ortega, F. (2013). Evidence for a role for the adaptive immune response in human term parturition. *Am J Reprod Immunol*, 69(3), 212–230. <https://doi.org/10.1111/aji.12074>
- Gonzalez, J. M., Dong, Z., Romero, R., & Girardi, G. (2011). Cervical remodeling/ripening at

- term and preterm delivery: the same mechanism initiated by different mediators and different effector cells. *PLoS One*, 6(11), e26877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026877>
- Goodwin, T. M. (1999). A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol*, 180(1 Pt 3), S208-13.
- Gotsch, F., Gotsch, F., Romero, R., Erez, O., Vaisbuch, E., Kusanovic, J. P., ... Yeo, L. (2009). The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 22 Suppl 2, 5–23. <https://doi.org/10.1080/14767050902860690>
- Gotsch, F., Romero, R., Kusanovic, J. P., Mazaki-Tovi, S., Pineles, B. L., Erez, O., ... Hassan, S. S. (2007). The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol*, 50(3), 652–683. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31811ebef6>
- Goupil, E., Tassy, D., Bourguet, C., Quiniou, C., Wisheart, V., Petrin, D., ... Laporte, S. A. (2010). A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J Biol Chem*, 285(33), 25624–25636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115196>
- Gracie, S. K., Lyon, A. W., Kehler, H. L., Pennell, C. E., Dolan, S. M., McNeil, D. A., ... Tough, S. C. (2010). All Our Babies Cohort Study: recruitment of a cohort to predict women at risk of preterm birth through the examination of gene expression profiles and the environment. *BMC Pregnancy Childbirth*, 10, 87. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-10-87>
- Grammatopoulos, D. K., & Hillhouse, E. W. (1999). Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet*, 354(9189), 1546–1549. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)03418-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)03418-2)
- Guinn, D. A., Goldenberg, R. L., Hauth, J. C., Andrews, W. W., Thom, E., & Romero, R. (1995). Risk factors for the development of preterm premature rupture of the membranes after arrest of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, 173(4), 1310–1315.
- Gulmezoglu, A. M., Lawrie, T. A., Hezelgrave, N., Oladapo, O. T., Souza, J. P., Gielen, M., ... Hofmeyr, G. J. (2016). Interventions to Reduce Maternal and Newborn Morbidity and Mortality. In R. E. Black, R. Laxminarayan, M. Temmerman, & N. Walker (Eds.), *Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities, Third*

- Edition (Volume 2)* (p. 71sur419 à 90sur 419 (82-86) / 91 à sur 419). Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank(c) 2016 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. https://doi.org/10.1596/978-1-4648-0348-2_ch7
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., Semerci, N., Basar, M., Buchwalder, L. F., Buhimschi, C. S., ... Lockwood, C. J. (2015). Mechanisms of chorioamnionitis-associated preterm birth: interleukin-1beta inhibits progesterone receptor expression in decidual cells. *J Pathol*, 237(4), 423–434. <https://doi.org/10.1002/path.4589>
- Haas, D. M., Benjamin, T., Sawyer, R., & Quinney, S. K. (2014). Short-term tocolytics for preterm delivery - current perspectives. *Int J Womens Health*, 6, 343–349. <https://doi.org/10.2147/ijwh.s44048>
- Hamilton, S. A., & Tower, C. L. (2010). Management of preterm labour. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 20(8), 235–240. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ogrm.2010.04.007>
- Haram, K., Mortensen, J. H., & Morrison, J. C. (2015). Tocolysis for acute preterm labor: does anything work. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 28(4), 371–378. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.918095>
- Hehir, M. P., Glavey, S. V, & Morrison, J. J. (2008). Uterorelaxant effect of ghrelin on human myometrial contractility. *Am J Obstet Gynecol*, 198(3), 323.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.09.040>
- Hirst, J. J., Parkington, H. C., Young, I. R., Palliser, H. K., Peri, K. G., & Olson, D. M. (2005). Delay of preterm birth in sheep by THG113.31, a prostaglandin F2alpha receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol*, 193(1), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.11.009>
- Hong, J. S., Romero, R., Lee, D. C., Than, N. G., Yeo, L., Chaemsaitong, P., ... Kim, Y. M. (2016). Umbilical cord prostaglandins in term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29(4), 523–531. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1011120>
- Iacovidou, N., Varsami, M., & Syggellou, A. (2010). Neonatal outcome of preterm delivery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1205, 130–134. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05657.x>
- Iams, J. D., Romero, R., Culhane, J. F., & Goldenberg, R. L. (2008). Primary, secondary, and

- tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet*, 371(9607), 164–175. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60108-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60108-7)
- Illanes, S. E., Perez-Sepulveda, A., Rice, G. E., & Mitchell, M. D. (2014). Preterm labour: association between labour physiology, tocolysis and prevention. *Expert Opin Investig Drugs*, 23(6), 759–771. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.905541>
- Ishiguro, T., Takeda, J., Fang, X., & Olson, D. (2014). Interleukin (IL)-1 receptor I and IL-1 receptor accessory protein increase at delivery in rat uterus. *Reprod Sci*, 21, 238A.
- Jacquemyn, Y., Zecic, A., Van Laere, D., & Roelens, K. (2015). The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection. *Arch Gynecol Obstet*, 291(5), 969–975. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3581-1>
- Jenkin, G., & Young, I. R. (2004). Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 567–581. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.010>
- Johnston, K. M., Gooch, K., Korol, E., Vo, P., Eyawo, O., Bradt, P., & Levy, A. (2014). The economic burden of prematurity in Canada. *BMC Pediatrics*, 14(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-14-93>
- Kaczmarek, P., Malendowicz, L. K., Pruszyńska-Oszmalek, E., Wojciechowicz, T., Szczepankiewicz, D., Szkudelski, T., & Nowak, K. W. (2006). Neuromedin U receptor 1 expression in the rat endocrine pancreas and evidence suggesting neuromedin U suppressive effect on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Int J Mol Med*, 18(5), 951–955. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016626>
- Keelan, J. A., Blumenstein, M., Helliwell, R. J. A., Sato, T. A., Marvin, K. W., & Mitchell, M. D. (2003). Cytokines, Prostaglandins and Parturition—A Review. *Placenta*, 24, Supple(0), S33–S46. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1053/plac.2002.0948>
- Kenakin, T. (2005). New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(11), 919–927. <https://doi.org/10.1038/nrd1875>
- Kenakin, T. (2007a). Allosteric theory: taking therapeutic advantage of the malleable nature of GPCRs. *Current Neuropharmacology*, 5(3), 149–56. <https://doi.org/10.2174/157015907781695973>
- Kenakin, T. (2007b). Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good

- (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.009>
- Kenakin, T. (2010). G protein coupled receptors as allosteric proteins and the role of allosteric modulators. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 30(5), 313–321. <https://doi.org/10.3109/10799893.2010.503964>
- Kenakin, T. P. (2010). Ligand detection in the allosteric world. *Journal of Biomolecular Screening: The Official Journal of the Society for Biomolecular Screening*, 15(2), 119–130. <https://doi.org/10.1177/1087057109357789>
- Kimura, T., Ogita, K., Kusui, C., Ohashi, K., Azuma, C., & Murata, Y. (1999). What knockout mice can tell us about parturition. *Rev Reprod*, 4(2), 73–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357094>
- Klam, S. L., & Leduc, L. (2004). Management options for preterm labour in Canada. *J Obstet Gynaecol Can*, 26(4), 339–345.
- Kojima, M., Haruno, R., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Hanada, R., ... Kangawa, K. (2000). Purification and Identification of Neuromedin U as an Endogenous Ligand for an Orphan Receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun*, 276(2), 435–438. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3502>
- Kota, S. K., Gayatri, K., Jammula, S., Kota, S. K., Krishna, S. V. S., Meher, L. K., & Modi, K. D. (2013). Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab*, 17(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.09.012>
- Lappas, M. (2014). Caspase-1 activation is increased with human labour in foetal membranes and myometrium and mediates infection-induced interleukin-1beta secretion. *Am J Reprod Immunol*, 71(2), 189–201. <https://doi.org/10.1111/aji.12174>
- Leduc, M., Hou, X., Hamel, D., Sanchez, M., Quiniou, C., Honore, J. C., ... Chemtob, S. (2013). Restoration of renal function by a novel prostaglandin EP4 receptor-derived peptide in models of acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304(1), R10-22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00138.2012>
- Lin, T.-Y., Wu, F.-J., Lee, W.-Y., Hsiao, C.-L., & Luo, C.-W. (2013). Ovarian regulation of neuromedin U and its local actions in the ovary, mediated through neuromedin U receptor 2 (Vol. 304). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00548.2012>
- Liu, J. J., Payza, K., Huang, J., Liu, R., Chen, T., Coupal, M., ... Bostwick, J. R. (2009).

- Discovery and pharmacological characterization of a small-molecule antagonist at neuromedin U receptor NMUR2. *J Pharmacol Exp Ther*, 330(1), 268–275. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.152967>
- MacIntyre, D. a., Sykes, L., Teoh, T. G., & Bennett, P. R. (2012). Prevention of preterm labour via the modulation of inflammatory pathways. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(1), 17–20. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.666114>
- Makino, S., Zaragoza, D. B., Mitchell, B. F., Robertson, S., & Olson, D. M. (2007). Prostaglandin F2alpha and its receptor as activators of human decidua. *Semin Reprod Med*, 25(1), 60–68. <https://doi.org/10.1055/s-2006-956776>
- Martinez, V. G., & O'Driscoll, L. (2015). Neuromedin U: A Multifunctional Neuropeptide with Pleiotropic Roles. *Clin Chem*, 61(3), 471–482. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.231753>
- McDonnell, J., Beavil, A., Mackay, G., Jameson, B., Korngold, A., Gould, H., ... B. (1996). Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(5), 419–426.
- McLean, M., Bisits, A., Davies, J., Woods, R., Lowry, P., & Smith, R. (1995a). A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med*, 1(5), 460–463.
- McLean, M., Bisits, A., Davies, J., Woods, R., Lowry, P., & Smith, R. (1995b). A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med*, 1(5), 460–463.
- Migale, R., MacIntyre, D. A., Cacciatore, S., Lee, Y. S., Hagberg, H., Herbert, B. R., ... Bennett, P. R. (2016). Modeling hormonal and inflammatory contributions to preterm and term labor using uterine temporal transcriptomics. *BMC Medicine*, 14(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0632-4>
- Minamino, N., Kangawa, K., & Matsuo, H. (1985). Neuromedin U-8 and U-25: Novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 130(3), 1078–1085. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)91726-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(85)91726-7)
- Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., & Matsuo, H. (1985). Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides*, 6 Suppl 3, 245–248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3841690>
- Mitchell, J. D., Maguire, J. J., & Davenport, A. P. (2009). Emerging pharmacology and

- physiology of neuromedin U and the structurally related peptide neuromedin S. *Br J Pharmacol*, 158(1), 87–103. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00252.x>
- Mori, K., Miyazato, M., & Kangawa, K. (2008). Neuromedin S: Discovery and Functions. In O. Civelli & Q.-Y. Zhou (Eds.), *Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides* (Vol. 46, pp. 201–212). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/400_2007_054
- Nadeau-Vallee, M., Boudreault, A., Leimert, K., Hou, X., Obari, D., Madaan, A., ... Chemtob, S. (2016). Uterotonic Neuromedin U Receptor 2 and Its Ligands Are Upregulated by Inflammation in Mice and Humans, and Elicit Preterm Birth. *Biology of Reproduction*, 95(August), 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140905>
- Nadeau-Vallée, M., Chin, P.-Y., Belarbi, L., Brien, M.-È., Pundir, S., Berryer, M. H., ... Chemtob, S. (2017). Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. *The Journal of Immunology*, 1601600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601600>
- Nadeau-Vallee, M., Obari, D., Quiniou, C., Lubell, W. D., Olson, D. M., Girard, S., & Chemtob, S. (2016). A critical role of interleukin-1 in preterm labor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 28, 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.001>
- Nadeau-Vallee, M., Quiniou, C., Palacios, J., Hou, X., Erfani, A., Madaan, A., ... Chemtob, S. (2015). Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth. *J Immunol*, 195(7), 3402–3415. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500758>
- Nanetti, L., Raffaelli, F., Giulietti, A., Sforza, G., Raffaele Giannubilo, S., Ciavattini, A., ... Vignini, A. (2015). Oxytocin, its antagonist Atosiban, and preterm labor: a role for placental nitric oxide. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 28(5), 611–616. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.927859>
- Nelson, D. B., McIntire, D. D., McDonald, J., Gard, J., Turrichi, P., & Leveno, K. J. (n.d.). 17-alpha Hydroxyprogesterone Caproate did not reduce the rate of recurrent preterm birth in a prospective cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Ohmichi, M., Koike, K., Kimura, A., Masuhara, K., Ikegami, H., Ikebuchi, Y., ... Murata, Y. (1997). Role of mitogen-activated protein kinase pathway in prostaglandin F2alpha-induced rat puerperal uterine contraction. *Endocrinology*, 138(8), 3103–3111.

<https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5305>

- Olson, D. M., Christiaens, I., Gracie, S., Yamamoto, Y., & Mitchell, B. F. (2008). Emerging tocolytics: challenges in designing and testing drugs to delay preterm delivery and prolong pregnancy. *Expert Opin Emerg Drugs*, *13*(4), 695–707. <https://doi.org/10.1517/14728210802568764>
- Peri, K. G., Quiniou, C., Hou, X., Abran, D., Varma, D. R., Lubell, W. D., & Chemtob, S. (2002). THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol*, *26*(6), 389–397.
- Prendergast, C. E., Morton, M. F., Figueroa, K. W., Wu, X., & Shankley, N. P. (2006). Species-dependent smooth muscle contraction to Neuromedin U and determination of the receptor subtypes mediating contraction using NMU1 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, *147*(8), 886–896. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706677>
- Progzatzky, F., Dallman, M. J., & Lo Celso, C. (2013). From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*, *3*(3), 20130001. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0001>
- Public Health Agency of Canada. (2013). *Perinatal health indicators for Canada 2013: a report of the Canadian Perinatal Surveillance System*. Retrieved from <http://www.phac-aspc.gc.ca/rhs-ssg/phi-isp-2013-eng.php>
- Quiniou, C. (2011). *Développement de modulateurs allostériques peptidiques inhibiteurs de l'activité des récepteurs de l'interleukine 1 et de la vasopressine*.
- Quiniou, C., Sapieha, P., Lahaie, I., Hou, X., Brault, S., Beauchamp, M., ... Chemtob, S. (2008). Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol*, *180*(10), 6977–6987.
- Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F., & Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*, *28*, 321–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101311>
- Romero, R., Brody, D. T., Oyarzun, E., Mazor, M., Wu, Y. K., Hobbins, J. C., & Durum, S. K. (1989). Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol*, *160*(5 Pt 1), 1117–1123.
- Romero, R., Espinoza, J., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Hassan, S., Erez, O., ... Mazor, M. (2006). The preterm parturition syndrome. *Bjog*, *113* Suppl, 17–42.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x>

- Romero, R., Gomez, R., Chaiworapongsa, T., Conoscenti, G., Kim, J. C., & Kim, Y. M. (2001). The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*, *15 Suppl 2*, 41–56.
- Romero, R., Xu, Y., Plazyo, O., Chaemsaitong, P., Chaiworapongsa, T., Unkel, R., ... Gomez-Lopez, N. (2016). A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at Term. *Am J Reprod Immunol*. <https://doi.org/10.1111/aji.12440>
- Saccone, G., Suhag, A., & Berghella, V. (2015). 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate for maintenance tocolysis: a systematic review and metaanalysis of randomized trials. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*(1), 16–22.
- Sharma, A. A., Jen, R., Kan, B., Sharma, A., Marchant, E., Tang, A., ... Lavoie, P. M. (2015). Impaired NLRP3 inflammasome activity during fetal development regulates IL-1beta production in human monocytes. *Eur J Immunol*, *45*(1), 238–249. <https://doi.org/10.1002/eji.201444707>
- Shynlova, O. P., Oldenhof, A. D., Liu, M., Langille, L., & Lye, S. J. (2002). Regulation of c-fos expression by static stretch in rat myometrial smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol*, *186*(6), 1358–1365. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1067/mob.2002.122415>
- Simmons, L. E., Rubens, C. E., Darmstadt, G. L., & Gravett, M. G. (2010). Preventing Preterm Birth and Neonatal Mortality: Exploring the Epidemiology, Causes, and Interventions. *Semin Perinatol*, *34*(6), 408–415. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2010.09.005>
- Stassen, F. L., Heckman, G., Schmidt, D., Papadopoulos, M. T., Nambi, P., Sarau, H., ... Kinter, L. (1988). Oxytocin induces a transient increase in cytosolic free [Ca²⁺] in renal tubular epithelial cells: evidence for oxytocin receptors on LLC-PK1 cells. *Mol Pharmacol*, *33*(2), 218–224. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2828915
- Wahid, H. H., Dorian, C. L., Chin, P. Y., Hutchinson, M. R., Rice, K. C., Olson, D. M., ... Robertson, S. A. (2015). Toll-Like Receptor 4 Is an Essential Upstream Regulator of On-Time Parturition and Perinatal Viability in Mice. *Endocrinology*, *156*(10), 3828–3841. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1089>

- Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. (2001). Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. *BJOG*, *108*(2), 133–142.
- Xu, C., Liu, W., You, X., Leimert, K., Popowycz, K., Fang, X., ... Ni, X. (2015). PGF2alpha modulates the output of chemokines and pro-inflammatory cytokines in myometrial cells from term pregnant women through divergent signaling pathways. *Mol Hum Reprod*, *21*(7), 603–614. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav018>
- Xu, C., You, X., Liu, W., Sun, Q., Ding, X., Huang, Y., & Ni, X. (2015). Prostaglandin F2a regulates the expression of uterine activation proteins via multiple signalling pathways. *Reproduction*, *149*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0479>
- Yallampalli, C., & Garfield, R. E. (1994). Uterine contractile responses to endothelin-1 and endothelin receptors are elevated during labor. *Biol Reprod*, *51*(4), 640–645.
- Yulia, A., & Johnson, M. (2014). Myometrial oxytocin receptor expression and intracellular pathways. *Minerva Ginecol*, *66*(3), 267–80.
- Zhang, W. S., Xie, Q. S., Wu, X. H., & Liang, Q. H. (2011). Neuromedin B and Its Receptor Induce Labor Onset and Are Associated with the RELA (NFKB P65)/IL6 Pathway in Pregnant Mice. *Biol Reprod*, *84*, 113–117. <https://doi.org/10.1095>