

Université de Montréal

**Caractérisation d'un nouveau composé thérapeutique
agissant comme antagoniste allostérique du récepteur de
l'Interleukine-6 en vue de la prévention des naissances
prématurées et permettant de protéger l'intégrité fœtale**

par Elizabeth PRAIRIE

Département de Pharmacologie et physiologie
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 Pharmacologie

Août 2021

© Elizabeth PRAIRIE, 2021

Université De Montréal

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation d'un nouveau composé thérapeutique agissant comme antagoniste allostérique du récepteur de l'Interleukine-6 en vue de la prévention des naissances prématurées et permettant de protéger l'intégrité fœtale

Présenté par

Elizabeth Prairie

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Sylvain Chemtob

Directeur de recherche

Emmanuel Bujold

Membre du jury

Résumé

La naissance prématurée (PTB), soit une naissance se produisant avant la 37^e semaine de grossesse chez l'humain, est encore à ce jour l'une des principales causes de mortalité et de morbidité néonatales. En accord avec les études actuelles, la gravité des issues à la naissance est fortement liée à une perte de la fine régulation physiologique de facteurs inflammatoires durant la grossesse. Notamment, plusieurs données ont identifié qu'une fluctuation à la hausse des taux d'interleukine(IL)-6 dans les tissus gestationnels, liquide amniotique et le sang fœtal augmentait grandement le pronostic de naissance prématurée et de ses comorbidités associées. En plus de créer un environnement inflammatoire défavorable durant la gestation, IL-6 augmente aussi les protéines d'activation utérine (UAP), ayant pour effet de diminuer le temps de gestation. À ce jour, les traitements disponibles consistent principalement à arrêter les contractions à l'aide de tocolytiques. Conséquemment, ils ne s'attaquent pas directement à l'inflammation maternelle en amont sur le développement du fœtus. C'est dans cette optique que notre laboratoire a développé un peptidomimétique, nommé HSJ633 (633), inhibant sélectivement le récepteur d'IL-6 (IL-6R). Brièvement, la liaison d'IL-6 à IL-6R permet l'activation de la protéine accessoire du récepteur, gp130, générant la phosphorylation des protéines STAT3, Akt et de Erk1/2. En se liant de manière allostérique, 633 a l'avantage d'inhiber sélectivement la voie de STAT3, celle-ci affectant principalement la production de protéines de la phase aiguë. Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'IL-6 peut causer des dommages aux tissus fœtaux et que l'inhibition d'IL-6R à l'aide de 633 améliorera les conditions à la naissance tout en maintenant l'intégrité du tissu fœtal.

Durant tout ce travail, nous avons confirmé notre hypothèse en utilisant un modèle d'inflammation anténatal en administrant du lipopolysaccharide (LPS) sur des souris gestantes vers la fin de leur période de gestation. Les résultats ont montré que le LPS raccourcissait le temps de gestation, réduisaient le poids à la naissance et la survie des souriceaux. Nous avons confirmé qu'IL-6 est un acteur important dans l'induction de la PTB et que son inhibition sélective est suffisante pour diminuer les effets délétères de l'inflammation. De plus, nous avons caractérisé l'effet protecteur de 633 en analysant la transcription de gènes et la synthèse de protéines clés dans les tissus maternels et gestationnels. Nous avons poursuivi davantage la

caractérisation en révélant la présence de 633 au niveau du placenta, mais pas dans le fœtus. Ces résultats permettent de clarifier que 633 diminue l'inflammation directement au niveau placentaire et qu'il empêche les dommages subséquents de se répercuter dans le fœtus. En outre, nous avons établi que 633 réduit la morphologie anormale des poumons et des intestins de la progéniture induite par l'inflammation. Ensemble, nos données montrent que 633 a rétabli avec succès les issues à la naissance en augmentant le temps de gestation, la survie à la naissance et en préservant l'intégrité des organes du fœtus dans un modèle de PTB induite par le LPS. Ces découvertes soulignent l'importance d'IL-6 et révèlent l'efficacité pharmacologique *in vivo* d'un nouveau modulateur de l'IL-6R. Le 633 est un nouveau prototype thérapeutique prometteur pour la prévention de la PTB chez l'humain.

Mots-clés : Naissance prématurée, inflammation, prématurité, IL-6, IL-6R, complications de la grossesse.

Abstract

Preterm birth (PTB), which occurs before the 37th week of pregnancy in humans, is still one of the leading causes of neonatal mortality and morbidity. In agreement with current studies, the severity of birth outcomes is strongly associated with the loss of fine physiological regulation of inflammatory factors during pregnancy. Notably, several data have identified that upward fluctuation of interleukin (IL)-6 levels in gestational tissue, amniotic fluid, and fetal blood greatly increase the prognosis of preterm birth and its comorbidities. In addition to creating an adverse inflammatory environment during gestation, IL-6 also increases uterine activating protein (UAP), which results in decreased gestation time. To date, available treatments mainly consist of attempts to stop contractions with tocolytics. Consequently, they do not directly address the upstream maternal inflammation on the development of the fetus. To that end, our laboratory has developed a peptidomimetic, named HSJ633 (633), that selectively inhibits the IL-6 receptor (IL-6R). Briefly, binding of IL-6 to IL-6R allows activation of the receptor accessory protein, gp130, resulting in phosphorylation of STAT3, Akt and Erk1/2. By binding allosterically, 633 has the advantage of selectively inhibiting the STAT3 pathway, the latter mainly affecting the production of acute phase proteins. Thus, we hypothesize that IL-6 can cause fetal tissue damage and that inhibition of IL-6R with 633 will improve birth outcomes while also preserving the integrity of fetal tissue.

Throughout this work, we confirmed our hypothesis using a model of antenatal inflammation by injecting lipopolysaccharide (LPS) into pregnant mice towards the end of their gestation period. The results showed that LPS shortened gestation time and reduced pup weight and survival. We confirmed that IL-6 is an important player in the induction of PTB and that its selective inhibition is sufficient to decrease the deleterious effects of inflammation. In addition, we characterized the protective effect of 633 by investigating gene transcription and key protein synthesis in maternal and gestational tissues. We further characterized the effect by revealing the presence of 633 in the placenta, but not in the fetus. These results clarify that 633 decrease inflammation directly in the placenta and prevents subsequent injury in the fetus. In addition, we found that 633 reduces inflammation-induced abnormal morphology of the lungs and intestines of the offspring.

Taken together, our data show that 633 successfully restored birth outcomes by increasing gestation time, survival at birth, and preserving fetal organ integrity in an LPS-induced PTB model. These findings underscore the importance of IL-6 and unveil the in vivo pharmacological efficacy of a novel modulator of IL-6R. 633 is a promising new therapeutic prototype for the prevention of PTB in humans.

Keywords : Preterm Birth, Inflammation, Prematurity, IL-6, IL-6R, Pregnancy complications.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	3
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des sigles et abréviations.....	11
Remerciements.....	15
1 Introduction.....	17
1.1 Définition de la PTB.....	17
1.2 Épidémiologie et Statistiques.....	17
1.3 Étiologie de la PTB.....	18
1.4 Le processus inflammatoire.....	20
1.4.1 Mécanisme de l'inflammation.....	21
1.4.1.1 Reconnaissance du stimulus inflammatoire.....	22
1.4.1.2 Activation des voies de signalisation inflammatoire.....	22
1.4.1.3 Relâche de médiateurs inflammatoires et activation leucocytaire.....	22
1.5 Physiologie de l'accouchement.....	23
1.6 Le rôle de l'infection dans le processus inflammatoire durant la PTB.....	24
1.7 Interleukine-6.....	25
1.7.1 Généralités et mécanisme d'action de l'IL-6.....	26
1.7.2 Composition moléculaire.....	26
1.7.3 Mécanisme d'action de l'IL-6R, gp130, sIL-6R et sgp130.....	27
1.7.4 Voies de signalisation canonique induites par l'IL-6.....	28
1.7.5 Rôle physiologique de l'IL-6 dans la défense immunitaire.....	30
1.7.6 Rôle de l'IL-6 dans la physiopathologie des maladies auto-immunes.....	31
1.8 Le rôle d'IL-6 dans la physiopathologie de l'accouchement prématuré et des effets délétères subséquents.....	33
1.8.1 Polymorphismes de l'IL-6 et polymorphismes mononucléotides (SNP) associés à la PTB.....	34

1.8.2	Rôles de l'IL-6 dans la mise en place et le déclenchement de l'accouchement au cours d'un accouchement normal et d'un accouchement prématuré.	35
1.8.3	IL-6, infection intra-utérine, infection intra-amniotique et PTB	37
1.8.4	Implication de l'IL-6 dans le recrutement et l'activation des leucocytes pendant la PTB	38
1.8.4.1	Neutrophiles	39
1.8.4.2	Macrophages	41
1.8.4.3	Lymphocytes.....	43
1.8.5	Le rôle prédominant de IL-6 dans l'induction du FIRS.....	45
1.9	Pistes thérapeutiques pour la PTB	46
1.9.1	Tocolytiques, antibiotiques et AINS.....	46
1.9.2	Progestérone.....	47
1.9.3	Médicaments anti-inflammatoires supprimeurs de cytokines (CSAIDs).....	48
1.9.4	Avantages du blocage de l'IL-6	49
1.9.5	Inhibiteurs de l'IL-6/IL6R.....	49
1.9.5.1	Tocilizumab	49
1.9.5.2	Autres inhibiteurs.....	50
1.9.5.3	La synthèse d'un nouvel antagoniste allostérique nommée HSJ633	51
1.10	Hypothèse	53
1.11	Objectifs.....	53
2	Matériel et méthodes.....	54
2.1	Animaux.....	54
2.2	Produit chimique.....	54
2.3	Modèle de prématurité induit par le LPS.....	54
2.4	Extraction postnatale des tissus en vue d'analyses histologiques.....	55
2.5	Analyses histologiques.....	55
2.6	Immunohistochimie (IHC).....	56
2.7	Extraction d'ARN et PCR quantitative.....	57
2.8	ELISA murins	57
2.9	Analyse statistique	58
3	Résultats.....	59

3.1	633 permet de diminuer la transcription de gènes pro-inflammatoires et de UAP dans les tissus gestationnels	59
3.2	L'administration de 633 permet de diminuer la synthèse de protéine pro-inflammatoire dans les tissus maternels et gestationnels.....	59
3.3	Le marquage IHC permet de localiser 633 au niveau du placenta, mais pas dans le fœtus	60
3.4	633 et TOC permettent de prévenir la naissance prématurée et améliorent les issues à la naissance	61
3.5	L'administration de 633 n'est pas toxique pour la progéniture	61
3.6	La modulation allostérique par 633 permet de protéger le tissu fœtal de l'inflammation induite par LPS	62
3.7	633 permet de diminuer la régulation de gènes UAP et pro-inflammatoires	66
3.9	633 permet de diminuer la synthèse de protéines pro-inflammatoires dans les tissus gestationnels et maternels	68
3.10	La biodistribution de 633 dans le placenta	70
	71
3.12	La biodistribution de 633 dans le fœtus.....	72
3.13	Évaluation périnatale : Les effets délétères de l'inflammation induite par le LPS sont diminués par l'administration anténatale de 633.	74
3.14	L'exposition anténatale au 633 ou TOC n'est pas toxique pour les poumons.....	76
3.15	L'exposition anténatale de 633 n'induit pas d'anomalies morphologiques sur les intestins.	78
3.16	L'exposition anténatale de 633 permet de protéger l'intestin des effets délétères de l'inflammation.....	80
3.18	L'exposition anténatale de 633 permet de protéger le parenchyme pulmonaire des effets délétères de l'inflammation.....	82
4	Discussion.....	83
5	Conclusion	88
6	Directions futures.....	89
6.1	Investiguer davantage le mécanisme d'action de 633 durant la prématurité en utilisant un inhibiteur de STAT3	89

6.2	Biodistribution détaillée de 633 et de TOC	89
6.3	Caractérisation du profil inflammatoire dans les tissus fœtaux suite à l'administration de 633	90
6.4	Vérifier la liaison de 633 au récepteur à la membrane et au récepteur soluble.	90
6.5	Vérifier l'effet de 633 sur l'infiltration leucocytaire dans les tissus gestationnels et dans les tissus fœtaux.....	90
6.6	Investiguer le rôle de STAT3 induit par IL-6 dans la différenciation leucocytaire..	91
7	Publications.....	92
8	Bibliographie.....	93
9	Annexe	123
9.1	Figure supplémentaire.....	123
9.2	Données préliminaires	124

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 FACTEURS DE RISQUE DE LA PTB	20
TABLEAU 2.2 SÉQUENCES <i>FORWARD</i> ET <i>REVERSE</i> DES GÈNES UTILISÉS DANS LES ANALYSES QPCR	57

Liste des figures

FIGURE 1.1 SCHÉMATISATION DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE AIGUË DÉTAILLÉE (20)	21
FIGURE 1.2 STRUCTURES DE L'IL-6	27
FIGURE 1.3 DIAGRAMME ILLUSTRANT LES VOIES DE SIGNALISATION EN AVAL DE L'IL-6	28
FIGURE 1.4 L'IL-6 ACTIVE LA VOIE JAK/STAT ET LA CASCADE MAPK	30
FIGURE 1.5 LE SYSTÈME D'AMPLIFICATION INDUIT PAR IL-6	33
FIGURE 1.6 LES EFFETS DE L'IL-6 SUR LES NEUTROPHILES PENDANT LA PTB	40
FIGURE 1.7 L'IL-6 AUGMENTE LE RECRUTEMENT DES MACROPHAGES LORS DE LA CHORIOAMNIONITE	43
FIGURE 1.8 L'IL-6 EST CAPABLE DE MODULER LA MIGRATION ET LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES PENDANT L'INFECTION	45
FIGURE 1.9 LA LIAISON ALLOSTÉRIQUE DE 633 CAUSE UN CHANGEMENT DE CONFORMATION DE IL-6R	52
FIGURE 3.1 633 PERMET DE DIMINUER LA RÉGULATION DE GÈNES UAP ET PRO-INFLAMMATOIRES	65
FIGURE 3.2. 633 PERMET DE DIMINUER LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LES TISSUS GESTATIONNELS ET MATERNELS	67
FIGURE 3.3 LA BIODISTRIBUTION DE 633 DANS LE PLACENTA	69
FIGURE 3.4 LA BIODISTRIBUTION DE 633 DANS LE FŒTUS	71
FIGURE 3.5 ÉVALUATION PÉRINATALE : LES EFFETS DÉLÉTÈRES DE L'INFLAMMATION INDUITE PAR LE LPS SONT DIMINUÉS PAR L'ADMINISTRATION ANTÉNATALE DE 633	73
FIGURE 3.6 L'EXPOSITION ANTÉNATALE AU 633 OU TOC N'EST PAS TOXIQUE POUR LES POUMONS	75
FIGURE 3.7 L'EXPOSITION ANTÉNATALE DE 633 N'INDUIT PAS D'ANOMALIES MORPHOLOGIQUES SUR LES INTESTINS ...	77
FIGURE 3.8 L'EXPOSITION ANTÉNATALE DE 633 PERMET DE PROTÉGER L'INTESTIN DES EFFETS DÉLÉTÈRES DE L'INFLAMMATION	79
FIGURE 3.9 L'EXPOSITION ANTÉNATALE DE 633 PERMET DE PROTÉGER LE PARENCHYME PULMONAIRE DES EFFETS DÉLÉTÈRES DE L'INFLAMMATION	81
FIGURE 9.1 ÉCHÉANCIER DU MODÈLE DE NAISSANCE PRÉMATURÉE	123
FIGURE 9.2 633 SE LIE SPÉCIFIQUEMENT SUR LE RÉCEPTEUR DE L'IL6 DANS LES CELLULES HEK-IL-6R	124

Liste des sigles et abréviations

aa	Acide aminé
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
APP	Protéines de phase aiguë
AP-1	Protéine activatrice 1
Bcl-x1	B-cell lymphoma-extra large
CAMs	Molécules d'adhésion cellulaire
Casp1	Caspase 1
CCL5/RANTES	Chimiokine ligand 5
CLCF1	Facteur 1 de cytokine analogue à la cardiotrophine
CLRs	Récepteur de lectine de type C
CNTF	Facteur neutrotrophique ciliaire
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRP	Protéine C réactive
CSAIDs	Médicaments anti-inflammatoires supprimeurs de cytokines
CT-1	Cardiotrophine 1
Cx43	Connexin43
DAMPs	Motifs moléculaires associés aux dégâts
DBP	Dysplasie broncho-pulmonaire
DMARD	Médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie
FDA	Food and Drug Administration
fFN	Fibronectine fœtale
FIRS	Syndrome de réponse inflammatoire fœtale
GD	Jour gestationnel
Grb2	Protéine 2 liée aux récepteurs des facteurs de croissance
HMGB1	High-mobility group box
IAI	Infection intra-amniotique
IL-	Interleukine
IL-6R	Récepteur de l'IL-6

i.p	Intrapéritonéal
IRF3	Interféron 3
iTAK1	inhibiteurs de TAK1
IUI	Infection intra-utérine
JAK	Janus Kinase
JAK-STAT	Janus Kinase Signal Transducers and Activators of Transcription
KO	Knockout
LIF	Facteur inhibiteur de la leucémie
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCD	Maladie de Castleman
MCP-1	Protéine-1 chimio attractante des monocytes
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MIAC	Invasion microbienne du liquide amniotique
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
mIL-6R	Récepteur membranaire de l'IL-6
MLCK	Myosine light-chain kinase
MMP	Métalloprotéinases matricielles
NEC	Entérocolite nécrosante
NF- κ B	Facteur nucléaire κ B
NK	Cellules tueuses naturelles
NLRs	Récepteurs à domaine d'oligomérisation des nucléotides
OHPC	17-hydroxyprogestérone caproate
OSM	Oncostatine M
OXR	Récepteur de l'ocytocine
PAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
pc	Poist-coital
PGDh	15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase
PGE2	Prostaglandine E ₂
PR	Récepteur de la progestérone
PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PROM	Rupture prématurée des membranes
PPROM	Rupture prématurée pré-terme des membranes
PT	Post-terme
PTB	Naissance prématurée
PTGFR	Récepteur de PGF2
RLRs	Récepteur de type RIG-1
SAA	Amyloïde A sérique
SDR	Syndrome de détresse respiratoire
sgp130	Récepteur soluble de gp130
sIL-6R	Récepteur soluble de l'IL-6
sPTL	Travail pré terme spontané
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
TCR	Récepteur des cellules T
TLRs	Récepteurs de type Toll
TOC	Tocilizumab
TNF α	Facteur de nécrose tumorale α
UAP	Protéines activatrice de l'utérus
USD	Dollard américain
VB	Vaginose bactérienne
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
633	HSJ633

*«[...] That's the nature of real science. It requires thought.
Sometimes deep thought. But thinking can be rewarding.
You can just skip the rough parts, or you can struggle to understand.»*

- Kip Stephen Thorne

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Sylvain Chemtob, de m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de son laboratoire. Comme bien des stagiaires avant moi, j'ai eu un coup de foudre pour la richesse des projets proposés et la camaraderie qui régnait entre les personnes de ce laboratoire. Je suis grandement reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée à travers ces dernières années, du temps que vous m'avez donné et des opportunités que vous m'avez offertes.

Au labo, on se crée une petite famille, on discute de nos journées, on partage nos réussites, mais encore plus importants, on s'échange nos difficultés et embûches qu'il nous arrive en cours de projets. Malgré la différence dans nos recherches, on se comprend durant notre parcours et cela fait une énorme différence. Merci à : Alexandra, Noémie, Prabhas, Amarilys, Nadège, Marie-Hélène, Frédérique, Renée, Laurence, Tiffany, Mohammad, Mathieu, Thomas, et bien d'autres. Les discussions au *bench*, les dîners, les terrasses improvisées en après-midi et les pique-niques au parc auraient été totalement différents sans vous tous. Christiane, merci d'avoir joué tous les rôles possibles pour nous : une mentore, une maman, une confidente et une amie. On te le dit souvent, mais on ne te le dit pas assez en même temps, une chance que nous t'avons au labo! Merci à France, une collègue qui est rapidement devenue une amie chère à mon cœur. Merci d'avoir été présente tous les jours au labo, tu étais mon petit (mais en réalité très grand) rayon de soleil. Sarah-Ève, ma *fofolle* désorganisée/organisée préférée. On a commencé ensemble ce long périple de recherche et de médecine en riant. Les mots me manquent pour exprimer à quel point je me trouve chanceuse de t'avoir rencontré. Maintenant, j'ai hâte de t'envoyer mes futures consultations. *Kanpai* à nous! Virginie, ma cousine d'amour, merci d'avoir été à seulement quelque étage plus haut. Depuis la maternelle qu'on espère se retrouver encore ensemble à l'école, c'est finalement aux études supérieures que nous avons finalement réussi! Je suis si fière de toi, tu as été un modèle de motivation et de persévérance dans ma recherche, une chance que je t'ai eu à travers mon parcours.

Sarah et Alex, mes deux personnes à moi, merci de m'avoir plus que soutenu dans toutes les démarches que j'ai pu entreprendre. Merci d'avoir écouté patiemment et avec (sensiblement) la même attention mes présentations pour un minimum de 100 fois si ce n'est pas plus. Je

pourrais maintenant dire que vous connaissez probablement mon projet aussi bien que je le connais ! Je vous aime de tout mon cœur.

1 Introduction

Malgré l'avancement de la technologie médicale et des soins périnataux, la naissance prématurée est encore aujourd'hui classée selon l'Organisation mondiale de la santé comme la principale cause de mortalité et de morbidité chez les enfants de moins de 5 ans (1). Intrinsèquement, la PTB suit sensiblement les mêmes processus physiologiques qu'une naissance à terme, mais différera de par sa provenance, son degré d'atteinte ainsi que de la temporalité à laquelle cet événement surviendra. Les travaux de recherches sur la PTB sont encore aujourd'hui d'une grande nécessité. Une compréhension plus approfondie de ces processus physiologiques et l'avancement des recherches épidémiologiques sur la PTB permettront la mise au point de thérapies efficaces permettant de soulager ce grave manque clinique.

1.1 Définition de la PTB

Par définition, la PTB chez l'humain se définit comme une naissance se produisant avant la 37^e semaine de grossesse et débute à la première semaine d'aménorrhée. En outre, une période de gestation normale aura une durée de 37 à 41 semaines. Il est possible de grader la PTB selon 3 stades : tardive ou moyenne (34 à 36 semaines), grande (28 à 32 semaines) et extrême (moins de 28 semaines) (1). Une naissance se produisant entre la 22^e et la 25^e semaine représente une zone incertaine puisque les pronostics de mortalités et de morbidités sont précaires et bien souvent non compatibles avec la vie (2).

1.2 Épidémiologie et Statistiques

La PTB est une donnée significative au niveau sociétairé puisqu'elle est l'un des meilleurs indicateurs de la santé d'une population (3). La PTB et ses complications directes comptent à elles seules pour 75% des causes de mortalités à la naissance. Suivant une relation linéaire grandissante, il se produit encore plus de 15 millions de naissances prématurées à l'échelle internationale (4). En 2010, il a été rapporté que les naissances prématurées représentaient environ 11,1% des naissances à travers le monde (4). En décomposant ce

pourcentage, il est possible d'obtenir un taux de PTB avoisinant 5% pour les pays plus développés et jusqu'à 18% pour certains pays plus démunis d'Afrique (5). Il est important de souligner que ces estimations demeurent grossières. En effet, certaines nuances mondiales quant à la définition exacte de la prématurité, des méthodes d'analyses et de l'étendue des collectes de données dans chaque pays peuvent influencer ces analyses (6). Néanmoins, en 2013 au Canada, il était possible de dénombrer 29 716 naissances prématurées, totalisant 7,8% des naissances totales (7). Encore en 2017, il se produisait sensiblement le même taux de PTB (8).

La PTB est tout autant éprouvante émotionnellement pour l'individu et sa famille qui doivent maintenant considérer ces changements supplémentaires, qu'elle est aussi un fardeau sociétal économique considérable. Puisque l'enfant prématuré est à risque de plusieurs complications chroniques et/ou aiguës, sa prise en charge se doit d'être multifactorielle et dotée d'un suivi plus étroit que pour un nouveau-né à terme (9). En ce sens, malgré le fait que cette condition affecte moins d'une naissance sur dix, la moitié des coûts reliés aux naissances y sont associés (10). Par ailleurs, dans cette rigoureuse étude, l'on estimait les coûts associés à un enfant prématuré à 51 600 dollars américains (USD) pour un total de 26,2 milliards de dollars aux États-Unis (11). À titre comparatif, l'étude associe les dépenses liées à un enfant à terme à 3 325 USD.

1.3 Étiologie de la PTB

Plus souvent qu'autrement, il est impossible d'identifier directement un seul élément causal de la PTB. Il s'agit bien souvent de l'assemblage d'un regroupement de facteurs de risques (voir **Tableau 1**) que du résultat d'un événement unique, permettant alors de classifier la PTB comme un syndrome. Malgré qu'ils ne garantissent pas un événement certain subséquent, l'identification des facteurs de risques connus permet un meilleur suivi clinique. Les différentes étiologies de la PTB peuvent être catégorisées selon : cliniquement indiquée (25%), idiopathique (50%) ou dû à une rupture prématurée des membranes (25%; PPRM) (12). Toutefois, une classification phénotypique beaucoup plus exhaustive a été proposée afin de mieux cibler les causes et facteurs de risques de la PTB d'après un degré d'évidences cliniques possibles, modérés ou forts (13). Celle-ci permet ainsi de stratifier les types de PTB

spontanée selon 9 phénotypes distincts : infection/inflammation, hémorragie déciduale, stress maternel, insuffisance cervicale (aussi appelée incompetence du col de l'utérus), distanciation utérine, dysfonction placentaire, rupture prématurée des membranes, comorbidités maternelles et histoire familiale.

L'étiologie de la naissance prématurée est complexe, mais l'hérédité génétique est l'un des nombreux facteurs de risque qui y contribuent de manière significative. En effet, un certain nombre d'études démontrent que les femmes qui ont eu un accouchement prématuré dans le passé sont plus susceptibles d'accoucher prématurément lors des grossesses subséquentes (1,14–19). De plus, des études portant sur des familles et/ou utilisant des comparaisons entre jumeaux et sœurs ont également démontré une prédisposition génétique à la PTB (17–19). Les naissances multiples sont une composante importante dans la prévalence de la PTB. En effet, 55,6% de ces naissances résulteront en un accouchement précoce, comparé à 6,4% pour une naissance unique (7). En outre, il se produit toujours plus de naissances prématurées de garçon que de filles pour un total de 8,3% et de 7,3% respectivement (7). Outre ces facteurs de risques, il demeure que le haut degré de pourcentage retrouvé dans certaines populations est en majeure partie dû au manque d'accès à des services d'obstétriques et à des soins néonataux. Ainsi, 90% des nourrissons nés avant 28^e semaines de gestation survivent dans les pays plus développés économiquement. En comparaison, seulement 10% des nouveau-nés naissant dans les pays à plus faible économie survivent (5). En dépit de ces différentes classifications et de facteurs de risques, il est important de comprendre que l'inflammation est ultimement le point convergent de toutes ces étiologies.

Tableau 1.1 Facteurs de risque de la PTB¹

Caractéristiques maternelles	Facteurs sociaux économiques	Autres
Âge maternel (< 19 et > 40) Perturbation hormonale Anomalies utérines Réduction de la longueur du col de l'utérus Saignements vaginaux Grossesse multiple Prédisposition génétique Excision cervicale antérieure Avortement antérieur Accouchement prématuré antérieur Antécédents familiaux de la mère Ethnie afro-américaine	Faible revenu familial Faible niveau d'éducation Malnutrition Pays en voie de développement Manque d'accès aux soins prénataux	Stress La violence domestique Consommation de drogues Infection Conditions inflammatoires Dépression Tabagisme Consommation d'alcool Diabète Faible indice de masse corporelle

1.4 Le processus inflammatoire

L'inflammation est un processus biologique essentiel et important médié par le système immunitaire. Lorsque l'organisme subit une agression, qu'elle soit stérile ou infectieuse, il doit mettre en branle une série d'événements afin d'y remédier et d'amorcer un processus de guérison dans le but retourner à son état d'homéostasie initiale. Lorsqu'enclencher, les 5 signes cardinaux possibles de retrouver au niveau local sont : chaleur, œdème, rougeur, douleur et altération de la fonction cellulaire et/ou tissulaire.

L'inflammation est subdivisée en 2 types: aiguë (secondes/minutes/jours après l'agression) et chronique (durant des semaines/mois/années). Il est important de comprendre que dans le premier cas, elle est habituellement utile et permet à l'organisme de retrouver un état similaire au moment précédant l'événement perturbateur. Ce faisant, les réponses cellulaires et moléculaires effectuent les changements rapidement et efficacement afin de minimiser les dommages et amorcent un processus de guérison. Dans certains cas, il est toutefois possible que l'inflammation aiguë devienne incontrôlable et nocive pour la survie. Au contraire, parfois émergente de l'inflammation aiguë ou encore créée *de novo* et se propageant à bas bruit,

¹ À partir de (13,28–30)

l'inflammation chronique sera toujours pathologique. Durant une inflammation prolongée, les médiateurs immunologiques activent un cycle de destruction et de remodelage simultané dans une tentative de retrouver la fonction initiale tissulaire. Cela engendrera la formation d'un tissu fibrosé et cicatriciel qui ne permettra pas de retrouver la fonction initiale équivalente.

1.4.1 Mécanisme de l'inflammation

Malgré les possibles étiologies possibles précipitant un état inflammatoire, le mécanisme d'action reste toujours le même. Les étapes suivantes se produisent de manière ordonnée : 1) reconnaissance du stimulus par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR); 2) activation de voie de signalisation inflammatoire; 3) relâche de médiateurs cellulaires; 4) activation et recrutement subséquent leucocytaire (20). Une fois l'événement perturbateur contrôlé, il se produira une dernière étape promouvant la réparation tissulaire.

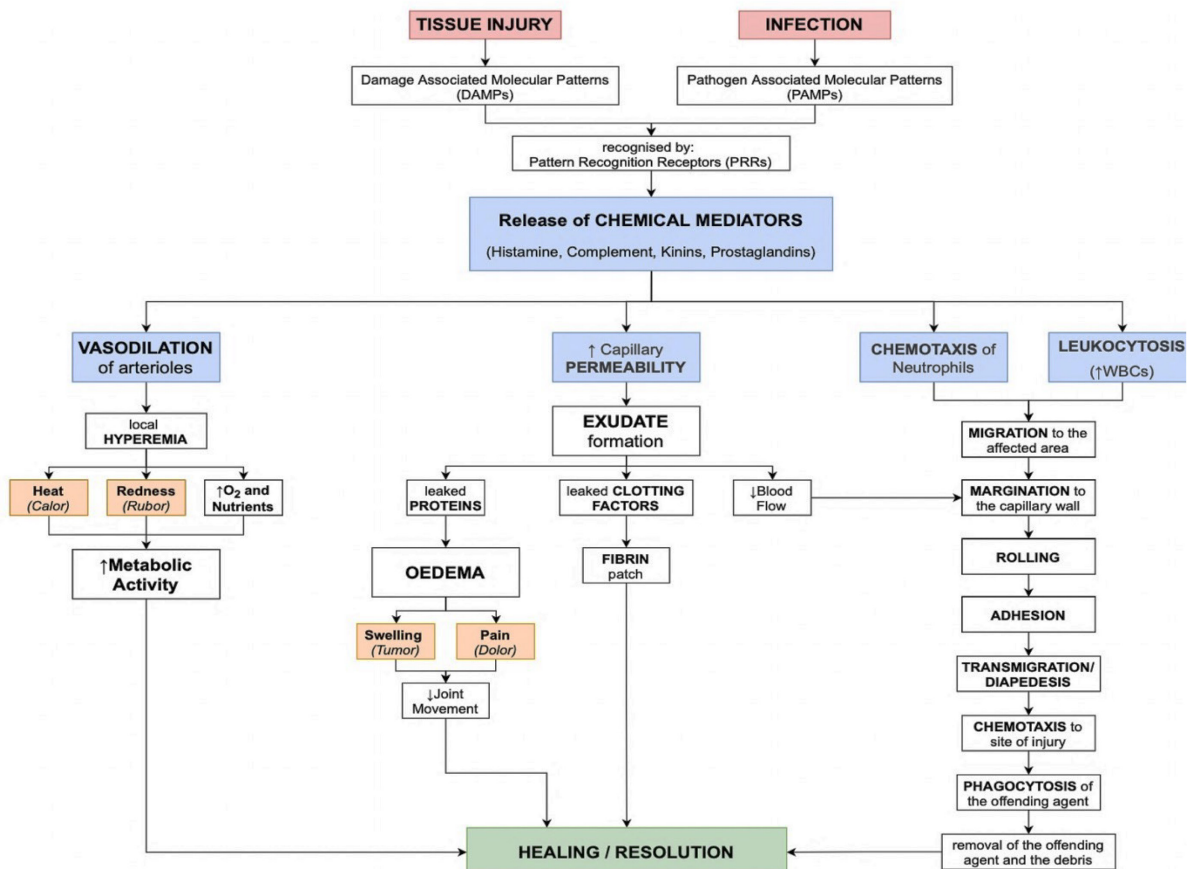


Figure 1.1 Schématisation du processus inflammatoire aiguë détaillée (20)

1.4.1.1 Reconnaissance du stimulus inflammatoire

Comme mentionné, la reconnaissance des stimuli se fait par l'activation de PRR dans les cellules immunitaires et non immunitaires. Afin de répondre à un large éventail de stimuli, les mammifères se sont dotés de divers types de récepteurs immunitaires. Brièvement, les PRR sont divisés en 3 catégories afin de répondre à un dommage provenant autant de l'extérieur que de l'intérieur de la cellule. Il s'agit des PRR situés à la membrane, au niveau du cytoplasme ou encore soluble. Finalement, il existe 4 majeures sous-divisions des PRR, les récepteurs de type Toll (TLRs), les récepteurs à domaine d'oligomérisation des nucléotides (NLRs), les récepteurs de type RIG-1 (RLRs) et les récepteurs de lectine de type C (CLRs) (21).

1.4.1.2 Activation des voies de signalisation inflammatoire

Essentiellement, ces récepteurs permettent de reconnaître 2 types de molécules : les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Les PAMPs sont des signatures moléculaires distinguables de l'hôte tandis que les DAMPs représentent des molécules associées à des dommages endogènes et permettant d'activer une cascade leucocytaire non infectieuse (22,23). En outre, l'activation constitutive des récepteurs liant les DAMPs est retrouvée dans la plupart des maladies inflammatoires chroniques (23).

Une fois activées, les PRRs vont générer une cascade intracellulaire et permettre la translocation nucléaire de facteurs de transcription clé dans la propagation inflammatoire tels que : la protéine activatrice 1 (AP-1) et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) ou le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF3) (22,24). La régulation de ces facteurs de transcription pro-inflammatoire est finement contrôlée afin de produire une réponse initiale rapide et efficace, et sera régulée négativement afin de retrouver un équilibre sécuritaire.

1.4.1.3 Relâche de médiateurs inflammatoires et activation leucocytaire

Une fois activées par ces facteurs de transcription, les cellules vont sécréter une série extensive de cytokines, lesquelles sont des protéines sécrétées majoritairement par les leucocytes de manière non constitutive et permettant la régulation de cellules cibles. La voie de

NF- κ B activera la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires majeures telles que : interleukine (IL)-1 β , facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), IL-6, IL-8 et chimiokine ligand 5 (CCL5; aussi connu sous le nom RANTES)(22). Par ailleurs, l'utilisation de ces dernières protéines comme marqueurs biologiques dans le diagnostic et pronostic de maladies inflammatoires aiguës et chroniques est des outils efficaces de par leur faible coût et des techniques de prélèvement moins invasives (25). Une fois sécrétées, ces cytokines vont se lier à leurs récepteurs respectifs et activer les voies de *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *Janus Kinase Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK-STAT) et de NF- κ B (24). Les cellules cibles vont relâcher dans leur environnement immédiat des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) et des produits de l'acide arachidonique afin d'augmenter la vasodilatation et la perméabilité vasculaire et ainsi faciliter la leucocytose et la diapédèse subséquente (26). Cette dernière étape, nommée inflammation histologique, se définit comme l'infiltration tissulaire de neutrophile, de macrophages et de lymphocytes et est une étape cruciale lors du diagnostic d'une pathologie (26).

1.5 Physiologie de l'accouchement

Il est maintenant établi dans la littérature que l'inflammation semble être un acteur important dans le processus de la grossesse. Elle sert à la préparation et à l'implantation de l'embryon ainsi qu'aux événements menant au déclenchement et à la délivrance du nouveau-né. Entre ces deux stades, il se produit un état de tolérance immunitaire où il est possible de voir un équilibre étroitement régulé entre les voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (27). Plusieurs étapes cruciales sont enclenchées menant à l'issue de l'accouchement. Afin de poursuivre vers l'expulsion du fœtus, il se produit de manière coordonnée une dilatation et un effacement du col de l'utérus, aussi appelés maturation cervicale, une activation du tissu gestationnel (membranes fœtales et déciduales aussi appelées membranes chorioamnionitiques) convergeant vers une régularisation et une augmentation graduelle de la puissance des contractions (28). Durant ce processus, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , IL-6 et TNF α , et de UAP telles que : la cyclooxygénase-2 (COX-2), la prostaglandine E₂ (PGE₂), le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur de l'ocytocine (OXR) augmentent drastiquement dans le microenvironnement (28).

Ainsi, grâce à ces processus inflammatoires, il est possible de diviser le processus de la grossesse en 4 phases clés (13,28–30). Il est important de comprendre que le processus exact de la grossesse et de diverses étiologies ne sont pas encore totalement élucidés et que ces étapes imposent ainsi une certaine objectivité quant à leur exactitude:

- Phase 0 : La phase initiale est un état dit de quiescence immunitaire. Les facteurs pro-inflammatoires sont en équilibre avec ceux anti-inflammatoires afin de promouvoir le développement fœtal. À ce stade, les contractions utérines et la production de UAP sont inhibées.
- Phase 1 ou phase dite d'activation : cette première phase de changement inflammatoire important permet une activation du processus de l'accouchement.
- Phase 2 : cette phase se traduit par une stimulation intense inflammatoire et d'événements biologiques conduisant vers l'accouchement. Durant cette phase critique, les médiateurs pro-inflammatoires et UAP sont sécrétés massivement afin de promouvoir la maturation cervicale, la contractilité utérine et afin de permettre l'activation des membranes déciduales et fœtales.
- Phase 3 : cette dernière phase implique la séparation placentaire et la contraction de l'utérus sous l'effet de l'ocytocine afin de soutenir l'expulsion du placenta et d'empêcher une perte sanguine trop importante due aux sinus veineux utérins maintenant exposés.

1.6 Le rôle de l'infection dans le processus inflammatoire durant la PTB

La cavité amniotique est un environnement normalement stérile. Bien que la PTB ait une étiologie complexe, l'infection intra-utérine (IUI), qui entraîne le plus souvent une chorioamnionite, est une cause importante de PTB précoce. Pour provoquer une infection, de nombreuses routes peuvent être empruntées par les pathogènes. Plusieurs voies de translocation semblent être associées avec la prématurité, mais la voie ascendante originaire du tractus urogénital constitue la voie d'entrée la plus probable pour les infections intra-utérines. En plus de cette dernière, une association a été faite avec certaines bactéries qui proviendraient d'une translocation hématogène, de la cavité péritonéale en passant par les trompes de Fallope et de la voie parodontales et buccales (31,32). Enfin, le plus souvent, cette infection utilisera les voies

génitales inférieures permettant d'atteindre les membranes et le placenta et va promouvoir la pullulation bactérienne dans la cavité intra-amniotique (infection intra-amniotique [IAI]) (33). Le liquide amniotique infecté constitue alors un point d'accès par lequel l'infection bactérienne peut atteindre le fœtus. Les bactéries les plus fréquemment détectées dans la cavité amniotique sont : *Ureaplasma urealyticum* (38 %), *Mycoplasma hominis* (19 %) et *Streptococcus agalactiae* (19 %) et le plus souvent, deux souches bactériennes ou plus sont détectées (57 %)(34). Cette colonisation bactérienne du liquide amniotique sécrète des PAMPs qui sont ensuite reconnus par le système immunitaire inné de la mère et du fœtus. Comme mentionné, au travers des TLRs, les PAMPs vont activer les voies de signalisation NF- κ B, AP-1 et STAT, entraînant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF α et IL-6 (35). Ainsi, lors d'une infection (virale/bactérienne; systémique/intra-utérine), l'activation des TLRs exprimés à l'interface mère-fœtus sur les cellules trophoblastiques ainsi que sur les cellules immunitaires utérines enclenchent une cascade émergeant en la production de facteurs pro-inflammatoires (36).

Plus précisément, de nombreuses études ont démontré l'expression de TLR-2 et TLR-4 dans les tissus gestationnels. Alors que l'activation du TLR-2 est plutôt associée à la génération d'une réponse apoptotique, l'activation du TLR-4 est principalement liée au déclenchement de la cascade de signalisation résultant en la génération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8)(37). En effet, le TLR-4 régule la réponse immunitaire innée pendant la grossesse, ce qui affectera directement la durée de la gestation. Ce récepteur est principalement exprimé dans le placenta humain et, une fois activé, la cascade de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-8 qu'il déclenche se manifestera par une augmentation des niveaux de prostaglandines, majoritairement par PGE et PGF, celles-ci responsables des contractions précoces à l'origine de la PTB (28).

1.7 Interleukine-6

IL-6 fait partie des cytokines les plus sécrétées lors de la parturition. C'est une cytokine multifonctionnelle pendant la grossesse qui s'est révélée être un modulateur influant tout au long de la gestation. En effet, son implication est indissociable durant la physiologie normale et

pathologique de l'accouchement. D'ailleurs, outre que dans la PTB, IL-6 est aussi grandement impliquée dans plusieurs désordres gestationnels (38).

1.7.1 Généralités et mécanisme d'action de l'IL-6

IL-6 est caractérisée par sa redondance et sa pléiotropie fonctionnelle. Cette cytokine est produite par une grande variété de cellules telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules endothéliales, les cellules myométriales, les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules mésangiales, les adipocytes et certaines cellules tumorales (39). Une variété de rôles inductibles par IL-6 se retrouve dans les nombreux noms donnés avant l'adoption de ce dernier : «Macrophage granulocyte inducing factor 2», «Cytotoxic T-cell differentiation factor», «B-cell stimulatory factor 2», «Myeloma/plasmacytoma growth factor», «Hepatocyte stimulating factor». IL-6 est impliquée dans la régulation immunitaire et inflammatoire durant l'hématopoïèse, le métabolisme osseux et le développement embryonnaire et fœtal des systèmes cardiovasculaire et neuronal (40). Son importance pathologique et clinique fait de IL-6 une cible thérapeutique dotée d'un énorme potentiel; en effet, la dualité des rôles pro et anti-inflammatoires de IL-6 est d'un grand intérêt fondamental et clinique (41–44).

1.7.2 Composition moléculaire

IL-6 est une cytokine de 21 à 29 kDa, composée de 212 acides aminés (aa) dont une séquence signal hydrophobe de 28 aa dans la partie N-terminale, cette dernière n'étant pas nécessaire à son fonctionnement optimal (39,45,46). En outre, IL-6 contient 4 résidus de cystéine et il est constaté que la partie C-terminale de la protéine est cruciale à sa fonction (46,47). Le gène de IL-6, composé de 4 introns et de 5 exons, est situé en position 7p21-p14 chez l'humain (45,48). IL-6 appartient à la superfamille de IL-6 et est N-glycosylée, comme les autres membres de la superfamille : IL-11, IL-27, oncostatine M (OSM), facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), facteur neutrotrophique ciliaire (CNTF), cardiotrophine 1 (CT-1), facteur 1 de cytokine analogue à la cardiotrophine (CLCF1), IL-35 et IL-39 (49).

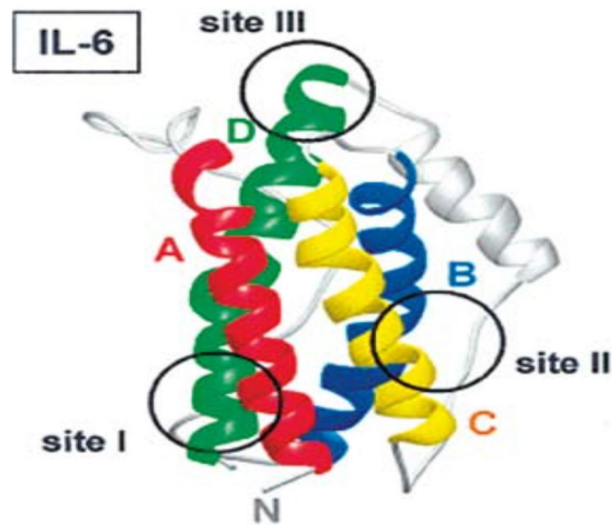


Figure 1.2 Structures de l'IL-6

Les quatre hélices A, B, C et D sont mises en évidence par des couleurs différentes. Les sites de fixation des récepteurs I, II et III de l'IL-6 sont indiqués par des cercles (50).

1.7.3 Mécanisme d'action de l'IL-6R, gp130, sIL-6R et sgp130

Afin de générer une réponse biologique, IL-6 doit se lier à son récepteur cible. Le récepteur est formé par la sous-unité de liaison IL-6R et de la protéine gp130 qui servira de sous-unité de signalisation intracellulaire. Par ailleurs, IL-6R a été identifié sous deux formes, le récepteur membranaire (mIL-6R) et le récepteur soluble (sIL-6R)(39,47,51).

Il existe également une forme soluble de gp130 (sgp130) qui agit comme un inhibiteur naturel de la transduction du signal de IL-6 en se liant au complexe IL-6/sIL-6R (40). sIL-6R et sgp130 sont générés par la traduction d'un ARNm suivant un épissage alternatif ou dû à un clivage par une métalloprotéinase. sIL-6R est le produit de l'action de *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM), une métalloendopeptidase (40). L'ADAM10 est responsable du clivage naturel et plutôt lent (environ 24 heures) tandis que l'ADAM17, inductible par de nombreuses cytokines et molécules pro-inflammatoires, est responsable du clivage rapide en situation de stress (52). Pour sgp130, la voie de l'épissage alternatif est favorisée (48).

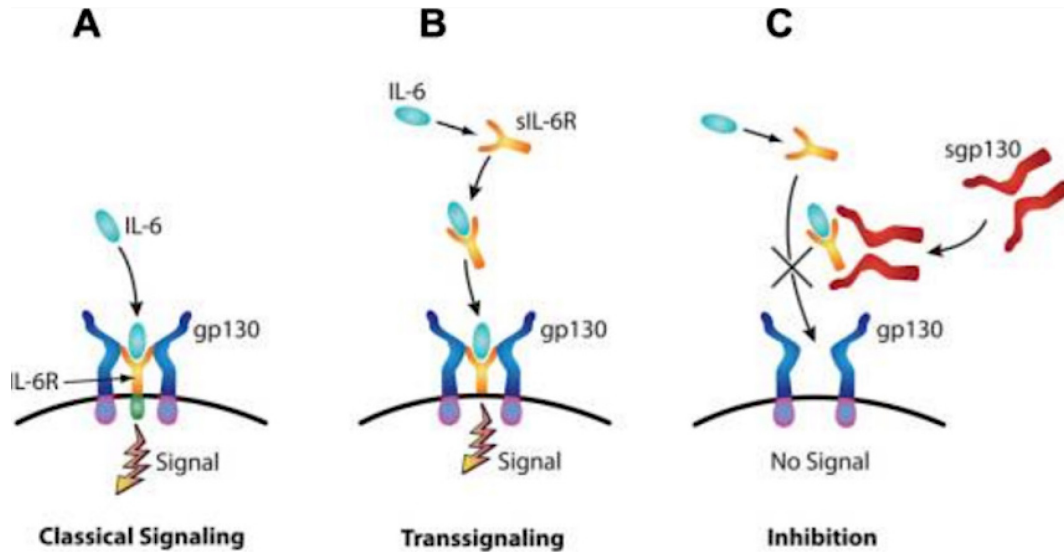


Figure 1.3 Diagramme illustrant les voies de signalisation en aval de l'IL-6

Dans la voie classique, la liaison de IL-6 à son récepteur transmembranaire IL-6R induit une dimérisation de la sous-unité gp130 (A) du récepteur de transduction du signal. Dans la trans-signalisation, IL-6 se lie à une forme soluble de IL-6R (sIL-6R). Le complexe IL-6/sIL-6R permet l'activation des cellules exprimant uniquement la gp130 (B). Une forme soluble de gp130 (sgp130) bloque sélectivement la trans-signalisation (C)(53).

1.7.4 Voies de signalisation canonique induites par l'IL-6

La voie de signalisation classique est initiée lorsque IL-6 se lie à IL-6R. Ceci déclenche l'association du complexe de IL-6/IL-6R à la protéine gp130. L'association de la gp130 avec IL-6/IL-6R favorise la dimérisation de gp130 et formera un complexe hétérohexamérique nécessitant 2 IL-6, 2 IL-6R et 2 gp130 (54). Ainsi, la voie de signalisation classique repose essentiellement sur la présence de IL-6R à la surface membranaire et est possible sur un nombre limité de types cellulaires tels que les hépatocytes, les mégacaryocytes, les neutrophiles, les macrophages, les leucocytes et les trophoblastes.

Lorsque le complexe IL-6/mIL-6R/gp130 est formé, l'homodimérisation de la gp130 permet l'activation des protéines janus kinase (JAK). Les résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de la gp130 seront phosphorylés par JAK, ce qui conduira à l'activation de trois voies de signalisation principales: SHP2/ERK, JAK/STAT et PI3K/Akt. La phosphorylation des résidus tyrosine sur la gp130 va recruter SHP2 qui sera phosphorylée par JAK. Une interaction

avec la protéine 2 liée aux récepteurs des facteurs de croissance (Grb2) va entraîner l'activation de la cascade de signalisation ERK1/2/MAPK et induire la liaison des facteurs de transcription aux éléments de réponse présents dans le génome (54). Dans les hépatocytes, la voie MAPK va notamment entraîner la phosphorylation de NF-IL-6, un facteur de transcription qui va également se lier au promoteur du gène codant pour les protéines de phase aiguë (43). Gab1, suite à son activation par SHP2, va activer PI3K. L'activation de PI3K entraîne le recrutement à la membrane et la phosphorylation de Akt par PDK1. Akt va à son tour phosphoryler d'autres facteurs tel que Bad qui, une fois phosphorylé, va perdre son caractère pro-apoptotique (47). Quant à la voie JAK/STAT, la phosphorylation des motifs YXXQ/YXPQ va permettre le recrutement de la protéine STAT qui sera à son tour phosphorylée par JAK. La protéine STAT va alors former un homodimère (STAT3-STAT3) qui pourra transloquer vers le noyau et ainsi réguler plusieurs gènes d'intérêt (51,55). Cette voie est impliquée dans de nombreux processus biologiques : activation cellulaire, prolifération, différenciation, apoptose et angiogenèse (56). En tant que régulateur négatif de la voie JAK/STAT, la protéine de signalisation des cytokines Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) inhibe STAT3 en se liant à gp130, diminuant ainsi l'inflammation normalement associée à l'activation de STAT3 (56).

Des travaux antérieurs ont démontré que l'induction de la voie de signalisation classique activait la voie Jak/STAT, tandis que la voie de signalisation trans entraînait l'activation de toutes les voies : Jak/STAT, MAPK/ERK1-2 et PI3K/Akt (37). Il a également été constaté que les réponses intracellulaires à la signalisation trans via le complexe IL-6/sIL-6R étaient différentes des réponses à la signalisation classique (44).

Notamment, la voie IL-6/sIL-6R est particulièrement importante au niveau des rôles pro-inflammatoires de l'IL-6 et dans l'induction d'une inflammation chronique et sévère. Dans une étude animale induisant une septicémie polymicrobienne, le blocage complet des voies classiques d'activation de IL-6 n'a pas entraîné d'augmentation significative de la survie murine. En revanche, l'inhibition sélective de la voie de trans-signalisation a augmenté la survie des animaux de 100% (57). L'ubiquité de la gp130 sur les cellules dépourvues de IL-6R est une caractéristique importante qui souligne pourquoi le rôle de l'IL-6 est si significatif lors de pathologies inflammatoires chroniques. La formation des ostéoclastes, un mécanisme crucial dans de nombreuses maladies comme la polyarthrite rhumatoïde n'est pas inductible par IL-6, mais plutôt par le complexe IL-6/sIL-6R (48). De plus, la voie de trans-signalisation est

importante dans la stimulation des lymphocytes Th17, ceux-ci étant davantage stimulés en présence de sIL-6R (44). D'ailleurs, il a été établi que IL-6 favorise plutôt la production de cellules Th17 au détriment des cellules Treg et la voie de signalisation trans joue un rôle important dans la production de chimiokines et dans la différenciation des macrophages (58–60). Ainsi, IL-6 est impliquée dans de nombreuses pathologies et a de nombreuses actions qui diffèrent selon la cellule cible et la voie de signalisation utilisée.

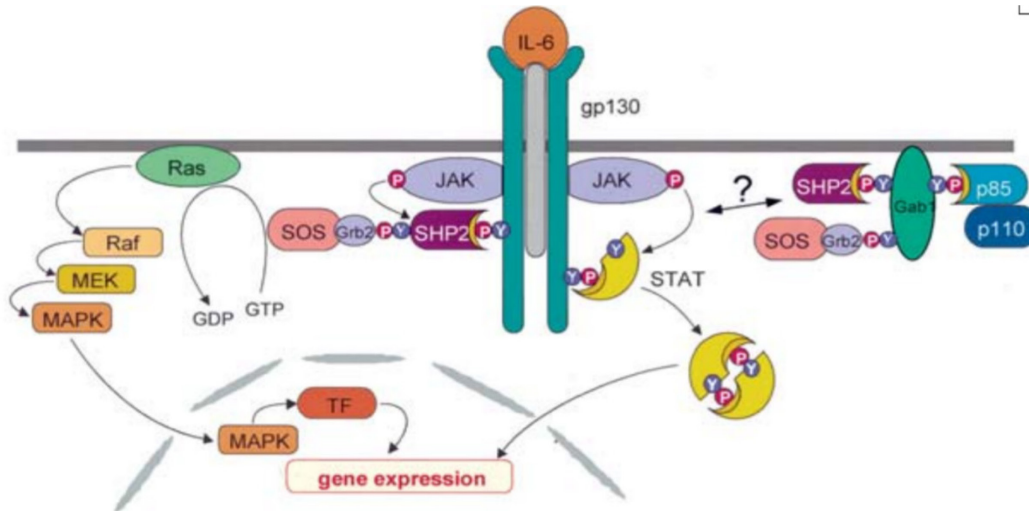


Figure 1.4 L'IL-6 active la voie JAK/STAT et la cascade MAPK

Représentation des deux principales voies activées par IL-6. TF, facteur de transcription (47).

1.7.5 Rôle physiologique de l'IL-6 dans la défense immunitaire

Un nombre considérable d'études traitant des rôles physiologiques de l'IL-6 dans la défense immunitaire ont été publiées au cours des dernières années. L'une d'elle a mis en lumière comment IL-6 joue un rôle clé dans la différenciation des cellules T CD4 (61). IL-6 peut à la fois moduler l'équilibre Th1/Th2 vers Th2 et favoriser la production autocrine d'IL-4. Ce mécanisme permet ainsi de renforcer la différenciation des Th2 par le biais d'une boucle d'auto-rétroaction (62). IL-6 participe également à la différenciation des cellules Th17 et inhibe la différenciation des Tregs, un aspect d'intérêt dans la physiopathologie de la PTB (63,64). De plus, IL-6 est indispensable à la production d'IL-21 par les cellules T CD4 naïves et mémoires lors de la stimulation des récepteurs des cellules T (64). Auparavant, IL-6 était caractérisée comme un facteur de croissance des cellules B et un inducteur de la production d'anticorps (65).

Cependant, des données récentes indiquent que c'est IL-21 induite par IL-6, plutôt que IL-6 directement, qui favorise la production d'anticorps (64). IL-6 joue donc un rôle physiologique important dans la défense immunitaire en étant un élément clé de la différenciation des cellules T CD4 et en favorisant la production d'anticorps en augmentant les fonctions d'aide des cellules B des cellules T CD4+ par une production accrue d'IL-21 (61,64).

1.7.6 Rôle de l'IL-6 dans la physiopathologie des maladies auto-immunes

En outre, l'amplification de l'IL-6 joue un rôle important dans les interactions entre le système immunitaire et les tissus non immunisés par l'activation de NF- κ B et STAT3, un élément important à prendre en compte compte tenu de l'environnement pluricellulaire pendant la grossesse [17]. Il existe un lien épidémiologique entre le diabète maternel de type I et de type 2 et les naissances prématurées, l'hypertension et la prééclampsie [20]. De plus, la présence d'arthrite inflammatoire et de maladies intestinales inflammatoires chez les femmes enceintes est également corrélée à des taux plus élevés de naissances prématurées dans certaines études [21,22]. Bien qu'aucun mécanisme de signalisation ou cascade d'événements autres que les effets des médicaments anti-inflammatoires n'ait encore été proposé pour expliquer l'incidence plus élevée de la prématurité, toutes ces pathologies présentent des taux élevés d'IL-6 circulante.

Par ailleurs, les protéines de phase aiguë (APP) ont été définies comme un ensemble de protéines plasmatiques dont les concentrations augmentent ou diminuent d'au moins 25 % dans les troubles inflammatoires (66). IL-6 a été identifiée comme le principal stimulateur de leur production (43,67). IL-6 induit rapidement une gamme de protéines de phase aiguë telles que la protéine C réactive (CRP), l'amyloïde A sérique (SAA), le fibrinogène, l'haptoglobine et l' α 1-antichymotrypsine (42). En outre, IL-6 stimule les cellules tueuses naturelles (NK) et l'activité cytotoxique des granulocytes neutrophiles, lesquelles jouant un rôle important dans le processus inflammatoire (68–72).

Un fait intéressant en lien avec IL-6 est sa participation en la propagation de l'inflammation tel que vu dans la polyarthrite rhumatoïde en favorisant un déséquilibre entre 2 types de cellules : Th17 et Treg (73). IL-6 active la régulation à la hausse du récepteur orphelin des rétinoïdes (ROR) γ t par STAT3, ce qui augmente la production de Th17(74,75). IL-6 inhibe

également la différenciation des Tregs induite par le TGF- β (63). Ce faisant, IL-6 favorise un état où les Th17 sont prédominants par rapport aux cellules Treg. Ce déséquilibre est considéré comme un facteur clé dans le développement de multiples maladies à médiation immunitaire (73,76).

Enfin, IL-6 peut participer à l'apparition de diverses maladies immunitaires en faisant partie d'une boucle de rétroaction positive (Figure 1.5) favorisant l'auto-immunité (77). IL-17A est une cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules Th17. Compte tenu de la nécessité de l'IL-6 pour le développement des cellules Th17, il est suggéré que IL-6 agit en amont de l'IL-17A (63,78). Il est intéressant de noter qu'IL-6 agit également comme une cible critique en aval de IL-17A et que ces cytokines déclenchent ensemble une boucle de rétroaction positive de l'expression de l'IL-6 par l'activation de NF- κ B et STAT3 dans les cellules non immunitaires telles que les fibroblastes. En outre, le blocage de la boucle IL-6 supprime le développement de l'arthrite chez les souris F759, lesquelles présente normalement une activation accrue de STAT3 via l'activation de gp130 et développe spontanément une arthrite de type polyarthrite rhumatoïde (77,79). De plus, le système d'amplification induit par IL-6 joue un rôle clé dans les interactions entre le système immunitaire et les tissus non immunisés par le biais de l'activation de NF- κ B et STAT3 (80). Parallèlement, la production élevée d'IL-6 augmente l'expression de STAT3, ce qui entraîne la stimulation de gènes anti-apoptotiques, tels que B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl), favorisant la résistance des cellules T à l'apoptose (81). L'expansion des cellules T qui s'ensuit contribue à la perpétuation de l'inflammation chronique attestant qu'IL-6 joue un rôle important dans la cascade inflammatoire (82).

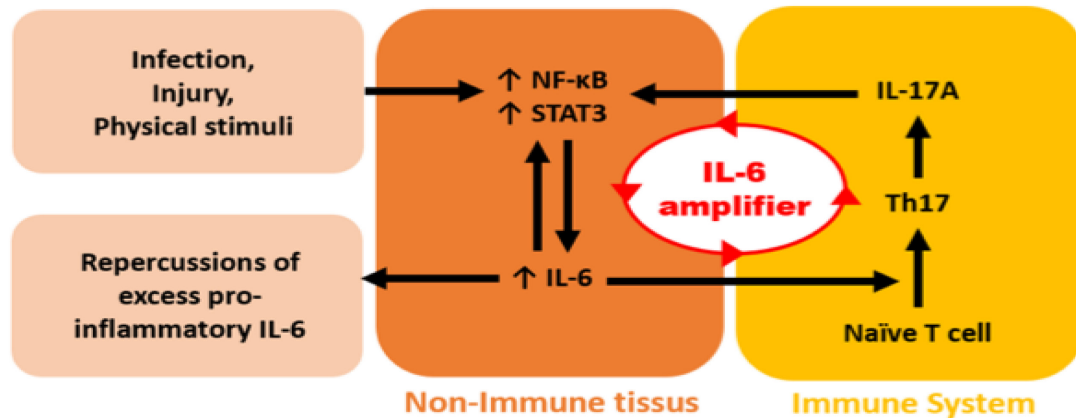


Figure 1.5 Le système d'amplification induit par IL-6

IL-6 est essentiel à la différenciation des cellules T naïves en cellules matures Th17. Les cellules Th17 produisent IL-17A, une interleukine qui stimule à son tour l'activation de NF-κB et STAT3. NF-κB et STAT3 stimulent ensuite la production d'IL-6, créant une boucle de rétroaction positive. Les infections, les blessures et les stimuli physiques peuvent également entraîner une activation accrue de NF-κB et STAT3. L'accumulation d'IL-6 peut favoriser le développement de maladies pro-inflammatoires et auto-immunes. L'amplificateur IL-6 joue un rôle clé dans les interactions entre le système immunitaire et les tissus non immunitaires par le biais de l'activation de NF-κB et de STAT3 (83).

1.8 Le rôle d'IL-6 dans la physiopathologie de l'accouchement prématuré et des effets délétères subséquents

La grossesse étant un processus biologique durant lequel l'inflammation joue un rôle prédominant, il est évident que la participation des cytokines au sein du système reproducteur et des tissus gestationnels tout au long de la grossesse soit conséquente. En plus de leurs rôles respectifs dans la fonction inflammatoire, les cytokines sont impliquées dans l'évolution chronologique d'un ensemble de processus physiologiques, de l'implantation embryonnaire à la préparation jusqu'au déroulement de l'accouchement. Les rôles d'IL-6 sont multiples durant les mois avenants à la parturition.

1.8.1 Polymorphismes de l'IL-6 et polymorphismes mononucléotides (SNP) associés à la PTB

Des concentrations élevées d'IL-6 dans le liquide amniotique, le liquide cervico-vaginal et le plasma maternel ont été associées à la PTB chez les femmes symptomatiques et asymptomatiques (84–88). Parmi les SNP associés à l'IL-6 et à la prématurité, le SNP appelé IL-6 -174, également connu sous le nom de rs1800755, a été largement étudié. Il est situé dans une région promotrice clé contrôlant l'induction de la transcription de la cytokine. Plusieurs études ont associé le génotype -174 GG/GC, qui se traduit par une production accrue d'IL-6, comme un inducteur majeur de l'inflammation sous-jacente à la PTB (89–91). Le génotype CC, entraînant une diminution de la production d'IL-6, aurait pour sa part un effet protecteur (89,92–94). En outre, plusieurs groupes ont démontré la liaison de IL-6 -174 dans la pathogenèse de la chorioamnionite, une infection bactérienne qui augmente considérablement le risque de PTB (95–97). Menon et al. ont démontré pour la première fois une interaction entre plusieurs loci, y compris les SNP en position -3448 pour le TNF α , -7227 pour l'IL-6 et -33314 pour l'IL-6R, comme étant associés à la PTB (98). Dans une deuxième étude, Moura et al. ont démontré que l'association de TNF α GG, IL-6 GG et IFN AA présentait une susceptibilité accrue à la PTB spontanée (PTBs) (99).

Annells, Stonek et Pereyra n'ont pas trouvé de différence significative entre l'association du polymorphisme -174 GC ou CC avec la PTB (100–102). Bitner et al. n'ont pas trouvé d'association entre IL-6 -174 et l'accouchement prématuré à la suite d'une rupture prématurée des membranes (PROM), mais ils ont trouvé une association avec la PTB lorsque IL-6 -174 GG/GC était combiné avec le polymorphisme de IL-1RN*2 (103,104). Dans une population hétérogène de 834 femmes à risque, aucune association entre IL-6 -174 et la PTB n'a été trouvée (105). Une étude plus modeste, portant sur une population japonaise de 51 naissances prématurées et 71 naissances à terme, n'a pas associé de PTB à IL-6 -174, mais, fait intéressant, a trouvé une association entre le polymorphisme IL-6 -572 G/C et la PTB (106).

En accord avec plusieurs autres groupes, les incohérences constatées dans ces études pourraient être liées aux différentes caractéristiques des populations recrutées (93,99). En fait, l'ethnicité joue un rôle dans les variations liées au génotype entre l'IL-6 et la PTB ; des

différences de variantes génétiques ont été identifiées au niveau des gènes IL-6 et IL-6R entre les femmes euro-américaines et afro-américaines (107,108). Wu et al. ont réalisé une excellente méta-analyse combinant l'évaluation de 1 165 PTB spontanée et de 3 830 témoins à terme. Les groupes de patientes ont été séparés en populations homogènes ou hétérogènes avec ou sans l'inclusion du génotype fœtal. Les auteurs ont corroboré que l'IL6 -174 CC est protecteur dans la population caucasienne, mais que dans une population hétérogène (ou lorsque le génotype fœtal est impliqué), il n'est pas possible de porter un jugement définitif (93). Il est important de noter que la race est souvent utilisée de manière incorrecte comme indicateur de l'ascendance génétique et que les individus non blancs sont fréquemment exclu ou sous-représenté dans les analyses génétiques (109).

1.8.2 Rôles de l'IL-6 dans la mise en place et le déclenchement de l'accouchement au cours d'un accouchement normal et d'un accouchement prématuré.

IL-6 joue un rôle important dans la période précédant l'accouchement en contribuant à un environnement utérin pro-inflammatoire en vue de la naissance. En effet, la concentration d'IL-6 augmente dans le myomètre, le col de l'utérus, la choriodécidua et le sang maternel à l'approche de l'accouchement, lorsque comparé aux femmes qui ne sont pas en travail (110–112). Les publications font état de nombreuses preuves de la contribution des cytokines aux événements physiologiques et moléculaires conduisant à l'augmentation des UAP, à savoir OXTR, le récepteur du PGF2 (PTGFR), les différents récepteurs du PGE2 (EP1/2/3/4) et la Connexin43 (Cx43) (113–115). Bien avant les premières contractions, le tissu utérin est sujet à une multitude de changements biologiques qui préparent le passage d'un environnement principalement quiescent à une activation de plus en plus prononcée (116). L'expression marquée de la COX-2, entraînant un accroissement de la production de PGE2 et de PGF2, augmente de manière significative à l'approche de l'accouchement (117–120).

Diverses études ont identifié l'amnios comme un producteur important d'IL-6 dans les états infectieux et non infectieux (112,121–123). D'ailleurs, l'inhibition de l'IL-6 à l'aide d'un anticorps anti-IL-6R a permis de limiter la production de PGE2 dans des cellules épithéliales amniotiques primaires (123). Une étude utilisant des cellules primaires de la décidue et de

l'amnios et reproduisant les niveaux amniotiques d'IL-6 trouvés lors d'une infection intra-utérine ou d'un travail préterme spontané (sPTL) a démontré que l'IL-6 était capable de stimuler la production de prostaglandines (124). De plus, l'IL-6 stimule la PGHS2 tout en inhibant l'expression de la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (PGDH), une enzyme impliquée dans la dégradation des PG. Ces actions entraînent une augmentation de la production de prostaglandines et une diminution de leur dégradation (117). Parallèlement, avec d'autres cytokines pro-inflammatoires, IL-6 stimule une augmentation de la concentration de l'ARNm du PTGFR, ce qui augmente la sensibilité utérine au PGF2a et multiplie ainsi l'effet initial des prostaglandines sur le tissu utérin (125).

Corroborant ces faits, une importante étude de Robertson et al. utilisant un modèle de souris knockout (KO) IL-6 a démontré l'influence critique de l'IL-6 sur la synchronisation des naissances. Ils ont démontré que les souris KO IL-6 ont donné naissance 24 heures plus tard que le groupe témoin en raison du ralentissement de la régulation à la hausse des UAP (126). Il est important de noter que le traitement avec de l'IL-6 recombinant a rétabli le moment normal de la naissance chez ces souris, ce qui démontre l'implication essentielle de la cytokine dans les processus naturels de l'accouchement. Conformément à la durée accrue de la gestation, les niveaux d'expression de l'ARNm d'OXTTR dans le tissu utérin des souris KO IL-6 étaient 73% inférieurs à ceux des souris WT au jour 19,5 post-coïtal (pc) de la gestation. Néanmoins, le niveau d'expression d'OXTTR dans le groupe KO a encore augmenté de manière comparable au jour de gestation 20,5 pc, établissant que bien que l'IL-6 accélère de manière significative l'augmentation de l'expression de certaines UAP, d'autres régulateurs sont néanmoins essentiels dans l'activation utérine. Une étude sur des explants utérins obtenus à partir de rates enceintes traitées à l'IL-6 a montré que l'expression de l'ARNm de l'OXTTR augmentait de 3 à 5 fois par rapport aux contrôles (115). En accord avec cette étude, une seconde expérience utilisant des cultures de cellules musculaires lisses utérines humaines primaires a démontré qu'une concentration élevée d'IL-6 régule positivement l'expression et la capacité de liaison de l'ARNm d'OXTTR et que les concentrations d'OXTTR sont directement régulées par l'IL-6 (115,127). Papatheodorou et al. ont observé dans une étude portant sur 22 femmes primigestes sans antécédents de PTB et en phase active d'accouchement que les taux plasmatiques maternels d'IL-6 étaient de 8,46 pg/ml par rapport à un taux normal de 5,8 pg/ml chez une femme saine non

enceinte (122). Ils ont aussi démontré que l'IL-6 et la corticolibérine (CRH), une hormone associée à la chronicité de la parturition, sont toutes deux sécrétées de manière pulsatile pendant l'accouchement et que la sécrétion d'IL-6 précède et possiblement induit directement et indirectement la CRH (128,129). Ils émettent également l'hypothèse que l'IL-6, étant également une myokine, pourrait être impliquée dans le mécanisme positif d'activation et de stimulation des contractions utérines (130). Le système immunitaire fœtal peut également être impliqué dans la transition vers un environnement favorable à la parturition. Dans des conditions d'accouchement à terme, il a constaté que des niveaux élevés de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le *high-mobility group box 1* (HMGB1), une alarmine impliquée dans l'inflammation stérile menant à la PTB, sont importants dans la transition vers un état d'accouchement. Ces médiateurs sont présents en concentrations beaucoup plus élevées du côté fœtal que du côté maternel à terme (131).

1.8.3 IL-6, infection intra-utérine, infection intra-amniotique et PTB

L'implication de l'infection et/ou de l'inflammation stérile a été bien établie dans le déclenchement du travail, comme le confirment de nombreux modèles animaux utilisant des injections microbiennes ou des médiateurs pro-inflammatoires pour provoquer l'accouchement (132–135). Bien que l'IL-6 soit un élément essentiel de l'accouchement à terme, cette cytokine est aussi largement reconnue pour sa régulation abondante et rapidement à la hausse en présence d'un facteur de stress infectieux (31,84,86,87,136–139).

La chorioamnionite est fortement associée à des concentrations élevées d'IL-6 et entraîne souvent un travail préterme (PTL)(136,140,141). Ceci est confirmé par plusieurs études établissant l'IL-6 comme un marqueur déterminant de la PTB (84,142–155). Dans une étude de Wakabayashi et al. le nombre de macrophages sécrétant de l'IL-6 était significativement plus élevé dans les placentas avec chorioamnionite par rapport aux patients avec PTB idiopathique (88% et 48% respectivement) (123). Une récente étude de cohorte de grossesses réalisée par Akkaya Firat et al. a montré que les taux d'IL-6 étaient significativement plus élevés dans le groupe d'accouchement prématuré par rapport aux groupes de contrôle et d'accouchement à terme. En outre, ils ont également trouvé une corrélation associant l'âge gestationnel, le poids à la naissance, la dilatation du col et les niveaux d'IL-6 (156). Soutenue par ces résultats, une autre

étude a démontré que parmi une liste variée de cytokines, seuls le TNF α , RANTES et l'IL-6 étaient significativement plus élevés dans le liquide cervico-vaginal des femmes accouchant prématurément par rapport au groupe d'accouchement à terme (155). Une étude de Lee et al. a examiné le rôle des différentes voies de signalisation de l'IL-6 (signalisation classique et trans-signalisation) dans une cohorte de 301 femmes ayant reçu une amniocentèse pour une éventuelle IAI. Ils ont montré que les niveaux d'IL-6 amniotique chez les femmes présentant un IAI et un PPRM ainsi que les niveaux de sIL-6, étaient significativement plus élevés par rapport au groupe témoin (53). En outre, ils ont signalé que la source principale de sIL-6R et de gp130 était les membranes fœtales suivie par le placenta comme deuxième source la plus importante. Cette étude démontre pour la première fois l'importance des différentes voies de signalisation de l'IL-6 pendant les infections intra-amniotiques en particulier pour la voie de trans-signalisation qui peut être activée à tout moment dans des conditions d'infection (53,157). Il est nécessaire de rappeler que la particularité de l'IL-6 dans le processus inflammatoire au cours d'une infection est qu'il est possible d'observer une augmentation drastique et déterminante de sIL-6R pouvant se lier à gp130 ubiquitaire. La voie de trans-signalisation induite par IL-6/sIL-6R permet l'activation de la voie pro-inflammatoire de l'IL-6 (54).

Les méthodes de diagnostic de l'invasion microbienne du liquide amniotique (MIAC) ne fournissent pas un résultat rapide qui établit clairement la présence d'une infection. De plus, l'infection peut souvent être présente chez des femmes asymptomatiques. Sur le plan clinique, l'évaluation du MIAC se fait par le biais d'une numération leucocytaire, d'un frottis de culture gram et de l'utilisation d'une amniocentèse. Comme les niveaux élevés d'IL-6 dans le MIAC sont généralement reflétés dans le liquide cervico-vaginal, un échantillonnage du liquide cervico-vaginal dans le but de doser IL-6 pourrait constituer un outil de routine étant à la fois abordable et sécuritaire pour la mère et le fœtus et qui permettrait de valider le statut inflammatoire pendant la grossesse.

1.8.4 Implication de l'IL-6 dans le recrutement et l'activation des leucocytes pendant la PTB

Les systèmes immunitaires maternel et fœtal jouent un rôle fondamental au cours de la grossesse. Le fœtus, pouvant être considéré comme un greffon semi-allogénique, présente des

antigènes paternels qui ne doivent pas interférer avec le système immunitaire maternel. La composition et les rôles des leucocytes au sein de l'utérus, à l'interface mère-fœtus (decidua) et dans les tissus fœtaux suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la PTB. Plusieurs études ont démontré le rôle central des leucocytes dans le développement de la cascade inflammatoire menant à l'accouchement, la délétion d'un ou plusieurs types de cellules supprimant complètement le processus (111,112,158–164). Par définition, les cytokines sont définies comme des messagers entre les cellules immunitaires et l'IL-6 n'échappe pas à cette affirmation. L'IL-6 joue un rôle majeur dans le syndrome inflammatoire durant la PTB par l'intermédiaire de divers leucocytes clés.

1.8.4.1 Neutrophiles

De tous les leucocytes, les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans le sang. L'origine des neutrophiles diffère selon le tissu gestationnel, étant principalement d'origine maternelle dans la choriodecidua et d'origine fœtale dans l'amnios et le liquide amniotique, sans pour autant être limités à leurs tissus respectifs (165,166). L'importance des neutrophiles est incontestable au cours de l'IUI et de l'IAI, où il est possible de voir leur nombre augmenter de façon drastique (167,168); notamment, les neutrophiles sont les principaux effecteurs au cours de l'inflammation aiguë. Cependant, leur nécessité pour déclencher la parturition chez la souris reste sujette à débat. En fait, la déplétion des neutrophiles chez les souris ne protège pas les mères contre la PTB causée par l'inflammation sous-jacente (169–171). L'expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 n'est pas diminuée suite à cette déplétion, elle a même parfois augmenté dans les membranes fœtales (169,171). Le plus souvent, le recrutement des neutrophiles dans les tissus se fait sous l'effet des chimiokines IL-8 et/ou de la protéine-1 chimio attractante des monocytes (MCP-1). Il a été démontré que l'IL-6 est capable d'induire l'expression de ces chimiokines par les cellules environnantes provoquant ainsi une augmentation du recrutement des neutrophiles (172–175). De plus, il est reconnu que la voie de trans-signalisation de l'IL-6 est principalement associée à ses fonctions pro-inflammatoires (176). La stimulation apoptotique des neutrophiles permet la capacité de détacher sIL-6R de leurs membranes par l'activation de ADAM17 (177). Ce mécanisme permet au récepteur de se fixer aux cellules adjacentes et d'activer la voie de signalisation. Ce

phénomène renforce davantage le mécanisme inflammatoire produit par l'IL-6. En outre, les cellules endothéliales peuvent exprimer à la fois IL-6 et IL-6R, ce qui leur permet d'interagir de manière paracrine avec les tissus voisins (176,178). Il faut noter que l'IL-6 augmente également l'expression des molécules d'adhésion endothéliale par les cellules endothéliales, favorisant le recrutement et le captage des leucocytes dans l'environnement intra-utérin déjà inflammé (157,176). Comme cela a été observé dans la chorioamnionite, l'inflammation chronique peut déséquilibrer l'homéostasie fragile à l'interface mère-fœtus et induire une PTB (179). Lorsque l'inflammation se poursuit pendant plusieurs heures, les neutrophiles vont produire sélectivement du MCP-1 au détriment de l'IL-8, favorisant le recrutement des macrophages (180). Ce faisant, le complexe IL-6/sIL-6R agit comme un marqueur critique pendant la transition entre le recrutement des neutrophiles et des monocytes, faisant le pont entre l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique pendant la PTB (157,178,181–183).

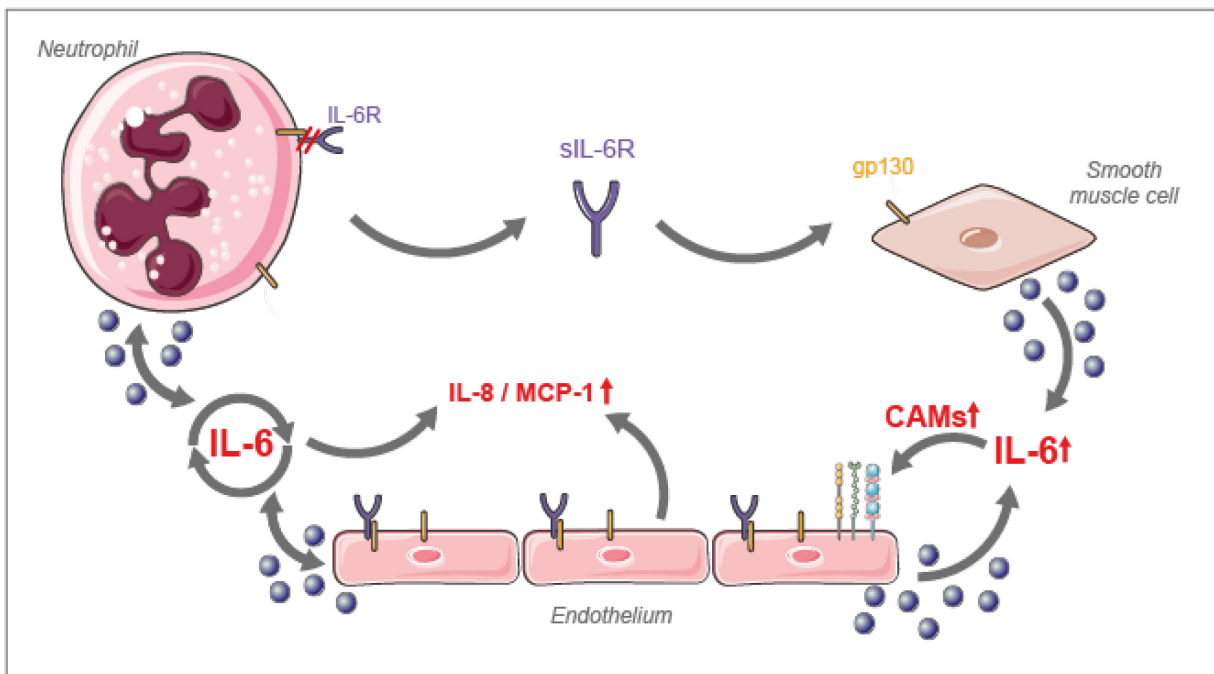


Figure 1.6 Les effets de l'IL-6 sur les neutrophiles pendant la PTB

Les MMP des neutrophiles peuvent cliver l'IL-6R de leur membrane qui se liera ensuite à l'IL-6 et à la gp130 dans les cellules qui n'expriment pas l'IL-6R (c'est-à-dire les cellules musculaires lisses de l'utérus). L'IL-6 augmente les CAMs sur les cellules endothéliales, favorisant le piégeage des leucocytes dans l'environnement inflammé. Les cellules endothéliales ont la capacité de sécréter IL-6, créant une

boucle de rétroaction inflammatoire positive de concert avec les neutrophiles et augmentant davantage l'emprise inflammatoire des leucocytes en augmentant la sécrétion de IL-8 et de MCP-1 (83).

1.8.4.2 Macrophages

Les macrophages représentent la deuxième plus grande population leucocytaire présente à l'interface materno-fœtale pendant la grossesse. Ces cellules sont d'origine maternelle dans le tissu décidual et d'origine fœtale (cellules de Hofbauer) au niveau des villosités placentaires. En revanche, dans l'IAI ou inflammation stérile intra-amniotique, les macrophages présents dans la cavité amniotique peuvent être à la fois être d'origine maternelle et/ou fœtale (184). Leur nombre reste relativement constant tout au long de la grossesse, mais il est possible de voir une diminution au cours du troisième trimestre (185–187). Néanmoins, le recrutement des macrophages augmente considérablement dans la decidua à l'approche de l'accouchement à terme ou du PTL (112,188). Leurs rôles sont complexes et varient en fonction du tissu dans lequel ils se trouvent, du microenvironnement présent et du moment de la gestation. La participation des macrophages au processus d'accouchement est cependant cruciale. Il a été démontré que la déplétion des macrophages dans le col de l'utérus et dans les reins des souris empêcherait une maturation cervicale adéquate et provoquerait la mort et la résorption ultérieure des fœtus (189). L'activation des macrophages peut être divisée en deux sous-catégories dont les fonctions reflètent celles des Th1 et Th2, M1 étant principalement pro-inflammatoire et M2 étant anti-inflammatoire (190). Il a été noté que lors de complications de la grossesse, l'équilibre M1/M2 est modifié à l'interface materno-fœtale, devenant davantage marqué par le sous-type M1 (186,191). Cependant, les macrophages polarisés en M2 ont toujours la capacité de produire des signaux pro-inflammatoires tels que IL-6 lorsque leurs TLRs sont activés, mais ne semblent pas changer de polarisation malgré la stimulation inflammatoire, possiblement afin de préserver la tolérance materno-fœtale (192,193).

Par ailleurs, il est possible d'associer l'augmentation de l'ARNm et de la concentration en protéine d'IL-6 à une infiltration leucocytaire, principalement de neutrophiles et de macrophages, dans les tissus du col de l'utérus et de la choriodecidua (112). De plus, l'IL-6 peut avoir un impact direct sur la différenciation des macrophages en régulant la production du facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF)(112). Dans un contexte de PTB

liée à une infection, les macrophages placentaires produisent une quantité considérable d'IL-6, augmentant l'effet des facteurs pro-inflammatoires sur l'environnement et sur l'induction de l'accouchement (194). L'abondance des macrophages dans les villosités placentaires est la source principale de la production d'IL-6 et est responsable de son augmentation dans un modèle de PTB associée à la chorioamnionite (123). De plus, pendant l'infection, le nombre de macrophages est considérablement augmenté. L'influence de l'IL-6 et de sa contribution pro-inflammatoire par les macrophages est telle que, suite à un traitement utilisant un anticorps anti-IL-6R, il a été possible de constater une diminution directe des naissances prématurées (123).

Pavlov et al. ont démontré que la production d'IL-6 est majoritairement inductible et qu'une fraction des macrophages placentaires peut sécréter jusqu'à 150 à 200 fois plus d'IL-6 que d'IL-1 β (194). De plus, à terme, la concentration d'IL-6 sécrétée par ces macrophages est significativement plus élevée que celle de l'IL-10 (194). Dans des conditions basales d'inflammation, environ 30% des macrophages placentaires produisent de l'IL-1 β , alors que moins de 5% synthétisent de l'IL-6 (194). Lorsqu'ils sont stimulés par le LPS, le nombre de cellules sécrétant de l'IL-6 augmente jusqu'à 30-40%, par rapport à une augmentation de seulement 20% pour l'IL-1 β (194). Ainsi, la production d'IL-6 par les cellules placentaires locales pendant l'infection est beaucoup plus inductible que celle de l'IL-1 β , laquelle est plus constitutive, et joue un rôle important dans la prématurité associée à l'infection.

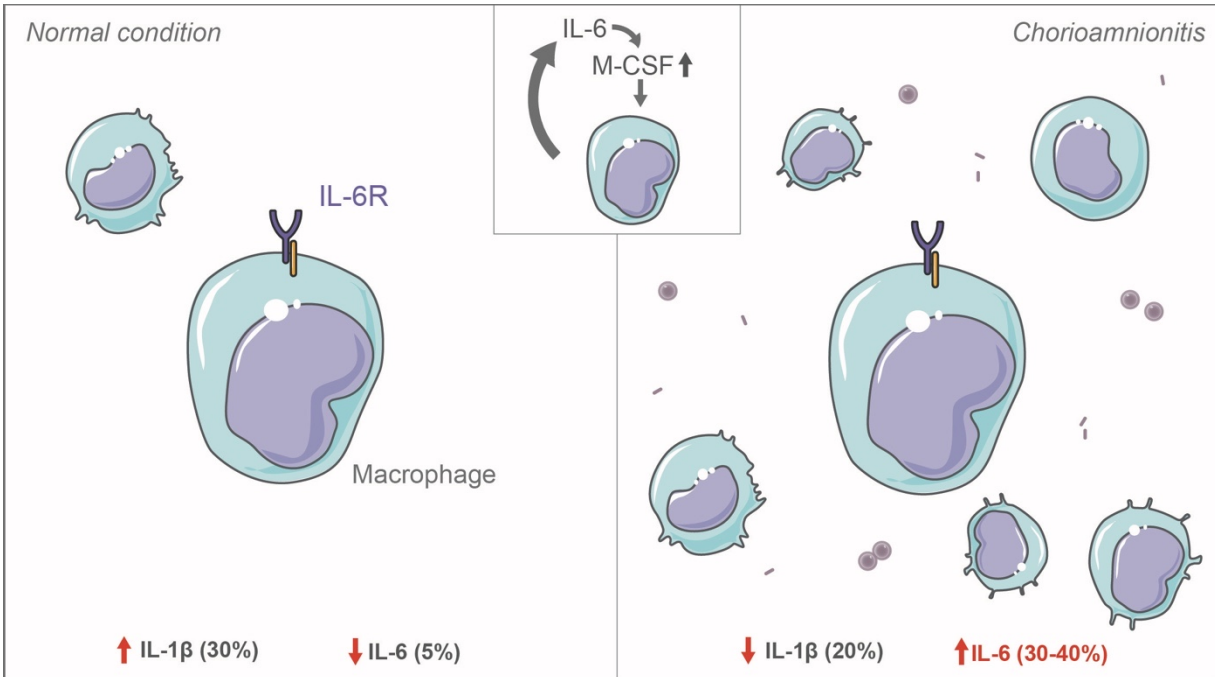


Figure 1.7 L'IL-6 augmente le recrutement des macrophages lors de la chorioamnionite

Dans des conditions normales de grossesse, les macrophages sécrètent une quantité négligeable d'IL-6 par rapport à une quantité importante d'IL-1 β . En présence d'une infection, il est possible d'observer une augmentation de la sécrétion d'IL-6 de 30 à 40 % par rapport à 20 % pour l'IL-1 β , ce qui démontre l'inductibilité de l'IL-6. En outre, IL-6 augmente la régulation du M-CSF, ce qui contribue à accroître la prolifération, la différenciation et la survie des macrophages (83).

1.8.4.3 Lymphocytes

L'inflammation intra-utérine fait intervenir une combinaison des systèmes immunitaires innés et adaptatifs. Pendant la grossesse, la rate et les ganglions lymphatiques sont soumis une augmentation de taille, suggérant une régulation à la hausse du nombre de lymphocytes et du rôle du système immunitaire adaptatif dans la préparation à l'accouchement (164,195). Pendant la gestation, le recrutement des lymphocytes est intensifié dans les tissus gestationnels. De fait, ce recrutement se produit en fonction de l'âge gestationnel, étant considérablement plus élevé à terme par rapport à l'accouchement prématuré (159).

Des études ont montré que l'implication des lymphocytes est un facteur important dans le processus de rejet du fœtus au niveau maternel en présence d'une chorioamnionite (196). En

plus, une étude *in vitro* a montré que la migration des lymphocytes était médiée par l'IL-6, ce qui pourrait expliquer la réponse inflammatoire aiguë observée au cours de la chorioamnionite (197). À cet égard, il est possible de constater une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ chez les femmes accouchant prématurément en raison des complications de la chorioamnionite chronique (196). De plus, agissant en synergie avec IL-7 ou IL-15, IL-6 est capable de permettre une activation indépendante du récepteur des cellules T CD8⁺ (TCR) et, agissant seul, peut également abaisser le seuil d'activation du TCR (198). Cependant, il semble que l'action de l'IL-6 sur ces cellules soit dose-dépendante (199). De plus, la voie IL-6/sIL-6R a été suggérée comme un mécanisme lié à l'inflammation chronique, puisque l'activation subséquente de cette voie permet de prévenir l'apoptose lymphocytaire (81). Il est reconnu que les lymphocytes Th2 prédominent au cours de la gestation normale, en particulier à l'interface materno-fœtale, et que la synthèse de IL-6 est principalement produite par les Th2 (200,201). Cependant, il semblerait que l'effecteur le plus probable dans l'induction de l'inflammation chronique soit plus corrélé à l'augmentation du rapport Th17/Treg qu'à celui du rapport Th1/Th2 (202). Comme indiqué précédemment, IL-6 favorise les cellules Th17 au détriment des Tregs et ce déséquilibre lymphocytaire est associé à la PTB (203). Il a été noté que les cellules Tregs aident à maintenir la grossesse via leurs rôles immunosuppresseurs, leur déplétion dans des modèles animaux induit des fausses couches précoces (162,166,204,205). De plus, les populations de lymphocytes Th17 augmentent considérablement pendant la chorioamnionite, ce qui concorde avec l'augmentation des niveaux d'IL-6 (206,207).

Dans une étude utilisant des souris IL-6^{-/-}, le niveau de cellules T CD4⁺, ces dernières étant capables d'exprimer des médiateurs pro-parturition tels que TNF α , IL-1 β et MMP-9, a diminué dans le tissu décidual à l'approche du travail (159,199). De plus, l'utilisation d'un mAb anti-IL-6R a permis d'inhiber le transfert sélectif des cellules T-naïves CD4⁺ vers les cellules Th17, mais n'a pas interféré avec les niveaux de lymphocytes Th1, Th2 ou Treg (202,208,209). Il est intéressant de noter que dans l'intestin, l'IL-6 ne semble pas jouer un rôle fondamental dans la différenciation des cellules Th17 dans des conditions normales d'inflammation (210,211). Il s'agit d'un point important à considérer lors de la mise en place d'un éventuel traitement anti-IL-6R pour la PTB. Ces lymphocytes sont impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière

intestinale et le système immunitaire du nouveau-né prématuré ne devrait pas être davantage affecté (212).

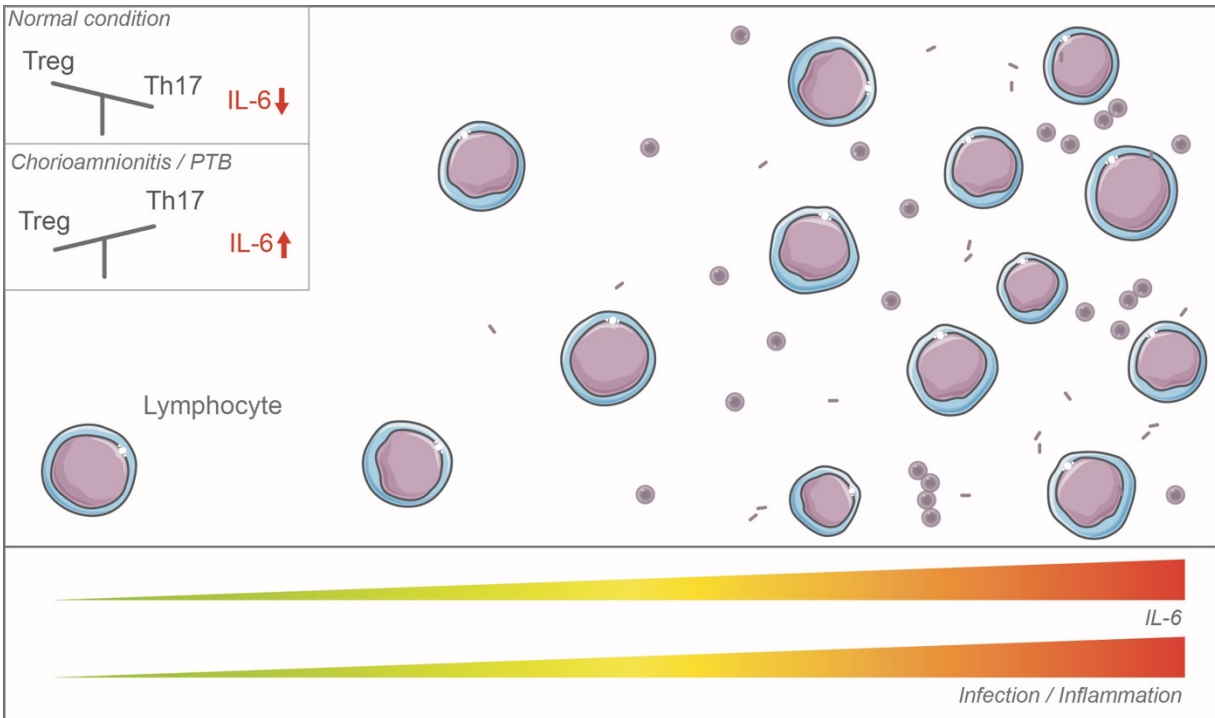


Figure 1.8 L'IL-6 est capable de moduler la migration et la différenciation des lymphocytes pendant l'infection

Dans des conditions normales de grossesse, les taux d'IL-6 sont peu élevés, ce qui permet de maintenir le rapport Treg/Th17 nécessaire au bon déroulement de la grossesse. En présence d'une infection, les taux d'IL-6 augmentent considérablement, ce qui entraîne un rapport en faveur des Th17, ceux-ci exerçant une régulation positive sur les médiateurs pro-inflammatoires. L'IL-6 est également impliquée dans la migration et dans l'inhibition de l'apoptose lymphocytaires, ce qui permet un afflux constant et considérable de lymphocytes au site de l'infection (83).

1.8.5 Le rôle prédominant de IL-6 dans l'induction du FIRS

Le FIRS (syndrome de réponse inflammatoire fœtale) est particulièrement observé chez les nouveau-nés souffrant de PTB (212). Cette condition se caractérise par une inflammation fœtale systémique et des taux élevés d'IL-6 dans le plasma fœtal (>11pg/mL). Le FIRS est le plus souvent associé à une chorioamnionite, une funisite ou une vascularite choriale, bien que certains cas n'aient pas de lien direct avec ces infections (33). Les maladies congénitales les plus

courantes associées au FIRS comprennent le syndrome de détresse respiratoire (SDR), la dysplasie broncho-pulmonaire (DBP), la septicémie, l'hémorragie intraventriculaire, la rétinopathie du prématuré (RDP) et l'entérocolite nécrosante (NEC) et de lésions cérébrales (141,212,213). De plus, une association entre les niveaux d'IL-6, d'encéphalopathie et de lésions de la substance blanche a été mise en évidence (214).

1.9 Pistes thérapeutiques pour la PTB

1.9.1 Tocolytiques, antibiotiques et AINS

Les traitements actuels consistent essentiellement à administrer des tocolytiques pour cibler la contraction utérine et, à ce jour, aucune thérapie n'a réussi à prolonger la grossesse ou à améliorer le pronostic néonatal. Les tocolytiques sont utilisés pour retarder l'accouchement de quelques heures seulement afin de laisser suffisamment de temps pour le transfert vers des soins spécialisés (215). Non seulement les tocolytiques n'ont montré aucune amélioration en matière de morbidité néonatale et de réduction de la PTB, mais ils ont également des effets indésirables importants (216). Les betamimétiques, un certain type de tocolytique a été associé avec une augmentation du risque chez le nouveau-né d'hémorragie intraventriculaire, d'hypocalcémie et d'hypoglycémie et de plusieurs autres effets secondaires chez la mère tels que des arythmies cardiaques importantes, de l'hypotension, de l'œdème pulmonaire et des hyperglycémies (217). Il existe un besoin majeur et non satisfait pour le développement de traitements efficaces ciblant non seulement le processus de contractions, mais qui ciblerait aussi l'inflammation et l'infection sous-jacente.

Divers anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), comme l'INDO et le Rofecoxib, un inhibiteur sélectif de la COX-2, ont été étudiés pour leur rôle dans l'inhibition des prostaglandines. Malgré des résultats prometteurs dans la diminution de la PTB, il a été démontré que l'utilisation des inhibiteurs de la COX a de nombreux effets secondaires dangereux sur le développement du fœtus tel que la fermeture prématurée du canal artériel, de l'hypertension pulmonaire, de l'hyperbilirubinémie, de l'hémorragie interventriculaire et de l'oligohydramnios (218–220).

La capacité à détecter les patients à risque de PTB est également très limitée. Les stratégies actuelles comprennent la mesure du risque basée sur l'identification et la stratification des facteurs de risque cliniques (**Tableau 1**) ou l'utilisation d'un outil de diagnostic tel que le test de fibronectine foétale (fFN). Le fFN a une excellente valeur prédictive négative, mais une valeur prédictive positive très limitée de 14 %. Ces méthodes de prédiction de risque ne permettent pas d'établir hors de tout doute une mesure précise du risque de PTB (216,221).

1.9.2 Progestérone

Le passage du stade lutéal au stade placentaire se produit généralement entre la 6^e et la 9^e semaine de gestation et la progestérone est produite par le corps jaune sous la stimulation de la gonadotrophine chorionique humaine trophoblastique. À ce stade, le placenta devient la principale source de progestérone jusqu'à l'accouchement. La progestérone procure un état de quiescence nécessaire à la poursuite de la grossesse en inhibant l'activité du myomètre (222). Les progestatifs tels que la progestérone naturelle et la 17-hydroxyprogestérone caproate (17-OHPC) artificielle sont les seuls médicaments et traitements prophylactiques ayant démontré une efficacité pour retarder les naissances prématurées (223). La progestérone inhibe le NF- κ B, la COX-2, la PGE2/F2 et la *myosine light-chain kinase* (MLCK), ce qui entraîne une diminution de la contractilité du myomètre (222).

Les données trouvées dans la littérature en rapport avec l'utilisation de la progestérone vaginale comme facteur protecteur, en particulier chez les femmes ayant un cervix court ou ayant testées positif à la fibronectine foétale, durant la prématurité sont contradictoires. C'est finalement en 2016 qu'une large étude (OPPTIMUM study) multicentrique, randomisée et à double insu a finalement permis de trancher sur la question (224). Les résultats de l'analyse ont permis de conclure que l'utilisation de la progestérone afin d'améliorer les issues à la naissance était inexistante ou négligeable au mieux. Concluant que le syndrome de la prématurité étant particulièrement hétérogène, certain sous-groupe de population pourrait bénéficier du traitement, mais qu'ils ne voyaient pas de résultats significatifs pour la majeure partie de la population.

En 2011, la 17-OHPC, fabriquée en laboratoire sous le nom de marque Makena, a été approuvée par la FDA. Depuis lors, les études ont montré que le Makena était plutôt inefficace. Une étude réalisée en 2020 a présenté les résultats d'un essai clinique de neuf ans, confirmant le manque d'efficacité de la 17-OHPC tant dans la prévention de la PTB que dans l'amélioration des scores néonataux (225). Cela a conduit la Food and Drug Administration (FDA) à reconsidérer son approbation.

1.9.3 Médicaments anti-inflammatoires suppresseurs de cytokines (CSAIDs)

Les CSAID ciblent certaines voies de signalisation problématiques tout en préservant une variété d'autres voies cruciales pour le processus normal de la gestation, ce qui en font d'excellents candidats pour le traitement de la PTB. Depuis leur première introduction, différents CSAID ont été étudiés. Typiquement, les CSAIDs inhibent les voies (PI3K/Akt)/mTOR, p38-MAPK et NF- κ B (en ciblant IKK), ce qui entraîne une diminution de la stimulation pro-inflammatoire (226,227). Par conséquent, ces mécanismes d'action entraînent moins d'effets secondaires que les AINS (226). De plus, une étude comparant 4 AINS (NBDI, NAC, TPCA-1 et SB239063) a montré que l'accumulation de PGE2 et de TNF α est inhibée dans le compartiment fœtal par TPCA-1, et dans les compartiments maternel et fœtal par SB239063 (226). Le TPCA-1 est un inhibiteur de l'IKK et le SB239063 est un inhibiteur de la p38-MAPK. Ces deux composés semblent intéressants pour prévenir l'inflammation fœtale intra-amniotique et pour réduire les conséquences à long terme de l'inflammation fœtale pour le nourrisson. Cependant, il a été démontré que la suppression du TNF α par le TPCA-1 et par le SB239063 persistait pendant plusieurs semaines après la naissance, laissant le nouveau-né avec un système immunitaire affaibli et un risque augmenté d'infections (226). Dans une deuxième étude, les inhibiteurs de TAK1 (iTAK1), une autre classe de CSAID, ont été examinés. D'autres études sont nécessaires, mais l'iTAK1 semble être efficace pour prévenir la PTB, cependant il ne semble pas réduire l'inflammation intra-amniotique (227).

1.9.4 Avantages du blocage de l'IL-6

De nombreuses études ont validé le fait que le blocage de l'IL-6 par KO génétique ou par l'administration d'anti-IL-6 ou d'anti-IL-6R peut entraîner une suppression préventive ou thérapeutique du développement de maladies. Par exemple, le blocage de l'IL-6 a entraîné une réduction notable des symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, de l'arthrite idiopathique juvénile systémique, MCD, du lupus érythémateux systémique, de la sclérose systémique, des myopathies inflammatoires, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, la neuromyéélite optique, la maladie de Still de l'adulte et de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn, la maladie de Behcet, l'uvéïte, le syndrome RS3PE, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), l'hypertension pulmonaire et la maladie liée aux IgG4 (209,215,228–236). Par conséquent, la PTB étant fortement associée à une inflammation dans laquelle l'IL-6 joue un rôle important, le blocage de l'IL-6 pourrait également être bénéfique dans la prévention de la PTB (215). En outre, des études animales ont montré que la thérapie anti-IL-6R diminue de manière significative le taux d'accouchement prématuré dans les modèles inflammatoires (123). L'anticorps monoclonal anti-IL-6R, le TOC, a été autorisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en 2010. Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour prouver son innocuité dans la grossesse humaine, les études actuelles ne montrent aucune indication d'un risque accru de malformation pour le fœtus (237). En ciblant la signalisation de l'IL-6, la prévention de la PTB pourrait être une option prometteuse; des recherches plus approfondies sur ce sujet bénéficieraient aux futures applications cliniques.

1.9.5 Inhibiteurs de l'IL-6/IL6R

Commercialement, il est possible de retrouver une large gamme d'inhibiteurs de l'IL-6 et de l'IL-6R, ce qui démontre l'intérêt croissant pour des agents similaires suite au succès thérapeutique retrouvé par de l'inhibition de l'IL-6 dans diverses maladies inflammatoires.

1.9.5.1 Tocilizumab

Le TOC (Actemra), un antagoniste de mIL-6R et sIL-6R, est un anticorps monoclonal humanisé commercialisé en 2009 dans l'Union européenne et en 2010 aux États-Unis (57,238). Le TOC est utilisé pour traiter les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde modérée à sévère

qui ne répondent pas à un antagoniste du TNF α ou à d'autres médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie (DMARD). En outre, il peut être utilisé pour traiter la MCD, la maladie de Cogan et le lupus (239). Cet agent biologique empêche spécifiquement l'IL-6 de se lier à son récepteur. Le TOC induit une diminution des marqueurs inflammatoires tels que la CRP et la vitesse de sédimentation des érythrocytes (240). Suite au succès du TOC, plusieurs autres inhibiteurs ont vu le jour. Dans une étude de synthèse sur les effets thérapeutiques du TOC comparé au méthotrexate dans la polyarthrite rhumatoïde, la majorité des effets secondaires étaient considérés de faible à modérer et ayant une faible proportion (7%) considéré comme sévère (241). Notamment, l'effet secondaire le plus notable était une augmentation du taux d'infection, plus particulièrement de la peau et du tissu sous-cutané, et des effets secondaires gastro-intestinaux.

1.9.5.2 Autres inhibiteurs

De récentes données ont démontré que l'Olamkicept (sgp130Fc), une molécule présentement en phase clinique 2, aurait un fort potentiel thérapeutique dans les MII (242). L'avantage de cette molécule est d'inhiber sélectivement la voie de signalisation trans du récepteur, celle-ci majoritairement responsable de l'induction de l'inflammation chronique. D'autres études doivent confirmer la sûreté de son utilisation dans la population cible et de son utilisation sécuritaire durant la gestation, mais cette molécule pourrait être un candidat envisageable pour réduire l'inflammation durant la prématurité. Le Siltuximab (Sylvant), un anticorps monoclonal chimérique humain souris, est un autre inhibiteur désormais sur le marché. Il se lie à l'IL-6 avec une affinité et une spécificité très grandes et empêche l'IL-6 de se lier à son récepteur. Le Siltuximab a été approuvé en 2014 par la FDA pour les patients atteints de la maladie de Castleman (55). Quelques effets indésirables ont été observés tels que le prurit, des infections des voies respiratoires supérieures, de l'hyperuricémie et une augmentation du poids (243). Sarilumab (Kevzara) est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie au récepteur de l'IL-6 membranaire ou soluble (comme le TOC), empêchant la transduction du signal. Il a également été approuvé par la FDA pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde chez les patients qui ne répondent à aucun des DMARD. Comparativement au TOC, le Sarilumab se lie à mIL-6R avec une plus grande affinité, bloquant l'activation du récepteur de manière plus efficace et inhibant la prolifération cellulaire induite par l'IL-6 à une concentration plus faible

(244). Cependant, quelques effets secondaires ont été rapportés lors des essais cliniques : fièvre, élévation du taux d'alanine aminotransférase et neutropénie (46). L'olokizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'IL-6 qui est actuellement en phase clinique 3. Il s'est avéré efficace dans la polyarthrite rhumatoïde réfractaire aux traitements par inhibiteurs du TNF α (245). La caractérisation du profil pharmacocinétique/pharmacodynamique de l'Olokizumab pour la suppression de la CRP est maintenant terminée, permettant ainsi d'entreprendre des études supplémentaires avec des groupes plus importants (246).

1.9.5.3 La synthèse d'un nouvel antagoniste allostérique nommée HSJ633

L'approche de 633 est similaire à celle qui a mené à la découverte d'autres antagonistes au sein du laboratoire hôte, notamment des récepteurs de l'IL-1 β et de FP; ce dernier étant présentement en phase clinique II (247,248). La structure d'aa de 633 a été générée en analysant les domaines extracellulaires de son récepteur et en sélectionnant une région conservée entre l'Homme et la souris. Grâce à la cristallographie et à la modélisation, il a pu être possible de former des peptides homologues dans des régions cibles d'IL-6R. Brièvement, cet homologue peptidique permet de déplacer l'équilibre durant le changement de conformation ce qui a pour effet de moduler la signalisation sans toutefois empêcher le ligand orthostérique de se lier à son récepteur. Le raisonnement clinique derrière la génération d'un modulateur allostérique est l'importance de préserver certaines voies intracellulaires inhérentes au processus inflammatoire durant le développement fœtal. Tel que mentionné, le récepteur à l'IL-6 active trois voies canoniques, soient celles de STAT3, Akt et Erk. En se liant de manière allostérique, 633 permet l'inhibition sélective de STAT3, tout en préservant les deux autres voies de signalisation. STAT3 a principalement un effet sur la production des APP, amplifiant ainsi le signal initial pro-inflammatoire. En outre, 633 a été spécifiquement conçu avec des aa de stéréochimie-D puisqu'ils sont plus résistants aux protéases que les stéréo-isomère-L, les rendant ainsi plus adaptés à une utilisation thérapeutique (249). Ces formulations pharmacologiques ont permis d'obtenir un peptidomimétique ayant un fort potentiel anti-inflammatoire, offrant une stabilité augmentée tout en étant spécifique et, ce faisant, sécuritaire pour son utilisation durant la grossesse.

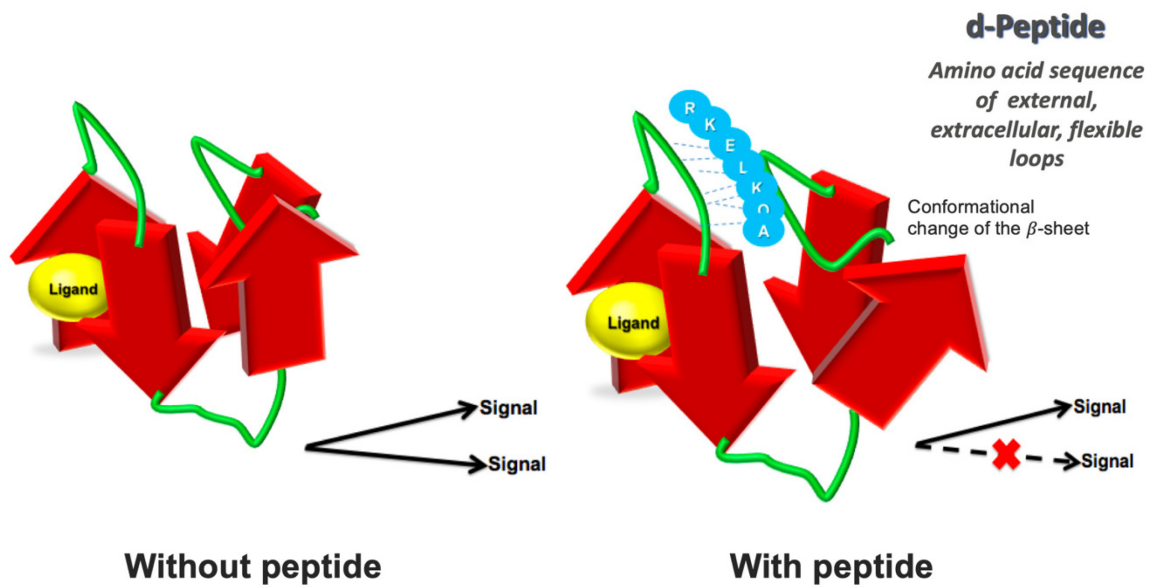


Figure 1.9 La liaison allostérique de 633 cause un changement de conformation de IL-6R

Sans peptide, il n'y a pas de modulation allostérique au niveau du récepteur; la liaison du ligand à son récepteur permettra l'activation des voies intracellulaires propres à la cellule. Avec un peptidomimétique, dans ce cas-ci 633, la modulation allostérique permet un changement de conformation résultant en une activation partielle des voies de signalisation intracellulaires.

1.10 Hypothèse

Brièvement, en inhibant sélectivement la voie pro-inflammatoire de STAT3 et en préservant les voies de ERK1/2 et de Akt, lesquelles sont essentielles au développement fœtale, nous supposons que, dans un modèle murin de prématurité induit par le LPS, 633 permettra de réduire les conséquences délétères de l'inflammation anténatale.

Conséquemment, notre hypothèse est la suivante:

- i) IL-6 promue et participe à un environnement pro-inflammatoire défavorable tel que vu durant la prématurité;**
- ii) Ce faisant, dans un contexte inflammatoire, 633 permet de prolonger la gestation et la maturation fœtale et permettra ultimement de maintenir l'intégrité des tissus fœtaux.**

1.11 Objectifs

Pour ce faire, les objectifs de ce travail de recherche sont les suivants :

- Valider l'impact inflammatoire d'IL-6 en utilisant un antagoniste de son récepteur dans un modèle d'inflammation généré par le LPS dans la PTB chez la souris.
- Analyser le profil inflammatoire obtenu suite à l'administration de 633 durant la PTB induite par le LPS dans les tissus maternels et gestationnels murins suivants: utérus, placenta, membranes fœtales ainsi que dans le sang et plasma maternel.
- Analyser l'efficacité de 633 dans un modèle murin de prématurité induit par le LPS dans le retardement de l'accouchement prématuré.
- Valider l'impact de 633 sur la survie et le poids des nouveau-nés exposés au modèle de PTB induite par le LPS.
- Valider la sécurité thérapeutique de 633 au niveau de l'intégrité tissulaire pulmonaire et digestive des souriceaux nés prématurés dans un modèle de PTB induit par le LPS.
- Valider l'impact de 633 sur le maintien de l'intégrité tissulaire pulmonaire et digestif des souriceaux nés prématurés dans un modèle de PTB induit par le LPS.

2 Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Afin de représenter le modèle LPS murin, des souris gestantes CD-1 ont été obtenues des laboratoires Charles River au 1^{er} jour de gestation. Les expérimentations ont préalablement été approuvées par le comité d'éthique de la recherche de Sainte-Justine selon les principes du *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* du Conseil Canadien de protection des animaux. Les souris ont pu s'acclimater durant 5 jours à l'animalerie avant de débiter les expérimentations. Dès leur arrivée et jusqu'à la fin des manipulations, les animaux avaient un accès constant à de l'eau et à de la nourriture et ont été gardés sous un cycle 12: 12 jours/nuit.

2.2 Produit chimique

Les produits chimiques ont été achetés dans ces compagnies suivantes: H5J633 (Elim Biopharmaceuticals, Hayward, CA), TOC (#186639, Hoffmann- La Roche Limitée, Mississauga, ON, CA), Lipopolysaccharides de *Salmonella typhimurium* (#L2630, Sigma Saint Louis MO, USA).

2.3 Modèle de prématurité induit par le LPS

Les souris CD-1 au jour gestationnel (GD)16 (durée normale: 19 jours) ont été anesthésiés à l'aide d'isoflurane et on soit reçu une injection sous-cutanée : de 633 (2 mg/kg/jour), de TOC (20mg/Kg/jour) ou de véhicule (100 µL d'eau stérile). Les injections ont été poursuivies jusqu'au GD18.5 et à toutes les 12 heures (voir **Figure supplémentaire 9.1**). Trente minutes après la première dose des composés précédents, une dose unique de LPS a été administrée de manière intrapéritonéal (10 µg dans 100 µL d'eau stérile; i.p), ce qui a permis aux composés thérapeutiques de bien se distribuer et de trouver un équilibre dans les tissus cibles. Un groupe de souris gestantes ont été sacrifiées 24 heures après l'administration des composés afin de collecter les tissus et fluides gestationnels soit: utérus, placenta, liquide amniotique, membranes fœtales et plasma sanguin. Les tissus récupérés ont rapidement été congelés dans de la glace sèche afin de préserver leur intégrité moléculaire. Les autres groupes

de souris gestantes ont pu donner naissance. Le moment de naissance a été évalué toutes les 2 heures et le moment de naissance, la survie des nouveau-nés et leur poids ont été comptabilisés. Les souriceaux ont été sacrifiés aux jours de gestation post-terme (PT)1 pour analyser la toxicité de 633. Finalement, un dernier groupe de souriceaux ont été sacrifiés à PT15 (représentant l'adolescence de la souris en termes de développement) et 30 (représentant le jeune adulte) pour études histologiques subséquentes.

2.4 Extraction postnatale des tissus en vue d'analyses histologiques

Après la naissance, des souriceaux ont été sacrifiés aux jours PT1, 15 et 30. Les souriceaux ont été préalablement anesthésiés à l'aide d'isoflurane, puis sacrifiés au CO₂ ainsi que par dislocation cervicale. La cage thoracique a été ouverte à l'aide de ciseaux chirurgicaux puis les côtes ont été enlevées. Afin de maintenir les poumons gonflés et d'assurer une meilleure préservation, les souriceaux ont été intubés via la trachée et les poumons ont été perfusés avec de la formaline 10% à une pression de 20 cm durant 10 minutes. Les bronches principales ont été sectionnées et les poumons ont été prélevés. La cavité abdominale a été ouverte à l'aide de ciseaux chirurgicaux et le rectum a été coupé puis l'intégralité du tube digestif a été dépliée. À environ 2 cm au-dessus du caecum, l'iléon a été sectionné. Minutieusement, l'intestin a complètement été nettoyé dans un pétri contenant du PBS en pressant l'appareil digestif. Les tissus ont été conservés dans la formaline 10% pendant 48 heures puis lavés et transférés dans du PBS à 4°C.

2.5 Analyses histologiques

Les tissus ont été mis dans des blocs de paraffine puis coupés à une épaisseur de 10µm pour les intestins et de 5µm pour les poumons à l'aide d'un microtome. Les sections ont ensuite été colorées à l'hématoxyline et éosine (H&E). Les lames ont été numérisées en utilisant un scanneur de lames à haute résolution Axio Scan.Z (Zeiss, San Diego, CA) en utilisant un objectif de 20X. Le logiciel de la même compagnie, soit Zen Blue 2.1 (Zeiss) a été utilisé pour l'acquisition des mesures.

Pour ce qui des poumons, des carrés d'une dimension de 1mm² ont été sélectionnés dans des parties représentatives du tissu sans vaisseaux sanguins dans la lame observée. À l'intérieur de ces carrés, l'intégralité des alvéoles a été comptée et mesurée et la mesure du nombre de septums a été évaluée sur une distance de 500 µm. Pour ce qui est des intestins, une mesure de la longueur et de l'atrophie des villosités a été faite. L'atrophie a été définie comme la plus petite mesure de la longueur retrouvée dans le groupe contrôle (<100 mm pour l'analyse de toxicité à PT1 et <500 mm pour les villosités à PT15) et transformée en pourcentage. Toutes les analyses histologiques ont été faites de manière à ce que l'évaluateur ne connaisse pas initialement les groupes à l'analyse (analyse à l'aveugle).

2.6 Immunohistochimie (IHC)

Afin de mesurer la biodistribution de 633, des souris gestantes GD17 ont été administrées avec soit du 633 couplé à du FITC (1mg/kg), du FITC seul (Sigma- Aldrich; 1mg/kg) ou véhicule (100 µl d'eau stérile). Les souris enceintes ont par la suite été séparées en deux autres groupes : le premier groupe étant sacrifié 1 heure après injection de 633-FITC et le 2e groupe après 4 heures. Les placentas ainsi que les fœtus ont été récupérés et ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% durant 1 journée puis ont été lavés et conservés dans du PBS. Les placentas ont été coupés longitudinalement et les fœtus ont été coupés sagittalement, tous deux à une épaisseur de 10 µm. Les noyaux des sections ont par la suite été marqués au DAPI (1 :5000; Invitrogen). Les lames ont été numérisées (Axio Scan, Zeiss, San Diego, CA) en utilisant un objectif de 10X. L'option MosaiX (mosaïque de photos) a été utilisée et les marquages au DAPI et au FITC ont été superposés en utilisant le logiciel Zen Blue 2.1. Pour obtenir une mesure d'intensité fluorescente, les placentas ainsi que les fœtus ont été mesurés en calculant la moyenne d'intensité lumineuse. Finalement, le logiciel a effectué une normalisation automatique des images afin que les tissus soient analysés avec les mêmes paramètres de coloration permettant une meilleure représentation de la fluorescence véritable du tissu. Toutes les analyses immunohistologiques ont été faites de manière à ce que l'évaluateur ne connaisse pas initialement les groupes à l'analyse (analyse à l'aveugle).

2.7 Extraction d'ARN et PCR quantitative

Les tissus récupérés préalablement ont été dégelés, coupés et pesés, et rapidement submergés dans 600µl de solution de lyse tissulaire froide afin de prévenir la dégradation d'ARN. Les échantillons ont par la suite été homogénéisés, puis l'ARN a été extrait selon le protocole du fabricant. Le spectrophotomètre Nanodrop 1000 a été utilisé afin de mesurer la concentration et la pureté (ratio A260/A280 > 1.60) des différents échantillons. Une quantité de 500ng a été convertie en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le «iScript Reverse Transcription Supermix» (Bio-Rad; Hercules CA, USA). Les amorces des gènes ont été synthétisées à partir de site web «National Center for Biotechnology Information Primer Blast» (voir Table 2.1). L'expression quantitative des gènes a été mesurée en utilisant du SYBR Green master mix (Bio-Rad) et normalisé avec le gène rapporteur HPRT.

Tableau 2.2 Séquences *Forward* et *Reverse* des gènes utilisés dans les analyses qPCR

Primers		
Gène	Forward	Reverse
IL-1β	5'-CCAAAGCAATACCCAAAGAAA-3'	5'-GCTTGTGCTCTGCTTGTGAG-3'
IL-6	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTAC-3'	5'-TCCACGATTTCCCAGAGAACA-3'
TNFα	5'-GTAGCCCACGTTCGTA-3'	5'-TCCACGATTTCCCAG-3'
OXTR	5'-TGTGTCTCCTTTTGGGACAA-3'	5'-GGCATTTCAGAATTGGCTGT-3'
IL-8	5'-TGCTTTTGGCTTTGCGTTGA-3'	5'-GTCAGAACGTGGCGCTATCT-3'
COX2	5'-TTAGCCCCAATAAGCCCAGG-3'	5'-TTTCTCTCCCTGATGCGTGG-3'
HPRT	5'-GGACCTCTCGAAGTGTGGATA-3'	5'-GCGCTCATCTTAGGCTTTGTAT-3'

2.8 ELISA murins

Les tests ELISA ont été réalisés avec la quantikine de souris : IL-1β/IL-1F2 (R&D systems, no. MLB00C), IL-6 (R&D Systems, no. M6000B), TNF-α (R&D Systems, no. MTA00B) et CRP (R&D systems; no. MCRP00). Brièvement, les tissus ont été mis dans une solution RIPA contenant des inhibiteurs à protéases et homogénéisés sur glace. Ensuite, 50 µl

d'échantillons de courbe standard, de contrôle et de tissus cibles (selon la quantikine analysée) ont été chargés dans une plaque 96 puits pré-enduite d'anticorps et incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits ont été lavés cinq fois avec une solution de lavage, puis ont été incubés pendant 2h avec un anticorps secondaire polyclonal. Une deuxième série de cinq lavages a été effectuée et une solution de substrat a été ajoutée et incubée pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée et la plaque a été lue à 450 nm avec une correction de la longueur d'onde à 540 nm.

2.9 Analyse statistique

Une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) a été réalisée pour comparer les groupes entre eux à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). La méthode de Dunnett pour les comparaisons multiples a été appliquée lorsque les données étaient comparées à un seul contrôle. Pour les résultats de toxicité intestinale et de l'évaluation du jour de naissance, une analyse *t* test a été utilisée. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Les données montrées correspondent aux moyennes \pm SEM.

3 Résultats

3.1 633 permet de diminuer la transcription de gènes pro-inflammatoires et de UAP dans les tissus gestationnels

Nos résultats utilisant un modèle d'inflammation induite par le LPS font suite à de nombreuses études montrant les effets délétères importants que les infections bactériennes peuvent provoquer durant la grossesse et dans le processus de la gestation. Dans le but de poursuivre la caractérisation du mécanisme d'action de 633 (voir **Annexe : données préliminaires**), l'expression génétique de protéines clés dans l'activation utérine et de cytokines pro-inflammatoires a été analysée dans les tissus fœtaux-maternelles (utérus, placenta et membranes fœtales)(**Figure 3.1**). Tel qu'attendu, les gènes codant pour les principaux facteurs pro-inflammatoires (**Tableau 2.2**) ont été régulés à la hausse suite à l'administration de LPS. Cette régulation à la hausse a pu être renversée en administrant un antagonisme du IL-6R. Ces résultats ont mis en évidence le rôle important qu'IL-6 joue dans l'induction de l'inflammation dans les tissus gestationnels. Son blocage suite à l'administration de 633 a permis de réduire significativement l'expression de : IL-1 β , TNF α , CCL2, caspase1 (Casp1) et de OXTR au niveau utérin (**Figure 3.1 : A**), de IL-6, CCL2 et de Casp1 au niveau placentaire (**Figure 3.1 : B**) et de IL-6, TNF α , CCL2 et de PGES dans les membranes fœtales (**Figure 3.1-C**). Il est à remarquer que l'effet du 633 est toujours semblable sinon supérieur au TOC.

3.2 L'administration de 633 permet de diminuer la synthèse de protéine pro-inflammatoire dans les tissus maternels et gestationnels

Nous avons poursuivi davantage l'étude du profil inflammatoire induit par le LPS et de la modulation par 633 dans les tissus gestationnels et maternels grâce à une analyse ELISA. Le plus grand effet protecteur d'IL-6 a pu être observé au niveau placentaire, où il a été possible d'analyser une diminution d'au moins deux fois moins d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α (**Figure 3.2 : D-F**). L'administration de 633 a aussi été bénéfique au niveau utérin, où il a été possible de voir une diminution significative d'IL-1 β et d'IL-6 (**Figure 3.2 : A-C**) et d'une tendance à

la baisse pour TNF α (**Figure 3.2 : G-I**). De plus, il a été possible d'observer une baisse considérable d'IL-1 β suite à l'administration de 633 au niveau du liquide amniotique et de CRP dans le plasma maternel (**Figure 3.2 : J-K**). L'hétérogénéité des résultats obtenus dans les groupes véhicules n'a pas permis d'établir une corrélation significative au niveau des membranes fœtales. Une plus grande cohorte de souris aurait été nécessaire afin d'établir une plus grande distinction.

3.3 Le marquage IHC permet de localiser 633 au niveau du placenta, mais pas dans le fœtus

Afin de vérifier la distribution du médicament lors de son administration anténatale, le peptide a été couplé à une molécule fluorescente, soit le FITC. Sa distribution a été vérifiée dans le placenta (**Figure 3.3**) et le fœtus (**Figure 3.4**) à différents temps d'incubation dans le but de vérifier si le temps de perfusion pouvait faire différer sa localisation. Un groupe non marqué a été utilisé comme contrôle afin de montrer la fluorescence naturelle du tissu et un second contrôle, marqué seulement au FITC, afin de voir la fluorescence de la molécule elle-même. Au niveau du placenta, il n'a pas été possible d'observer une différence significative après l'incubation de 1 heure (**Figure 3.3 : D**), tandis qu'il y a eu une différence notable après l'incubation de 4 heures (**Figure 3.3 : E**). De même, l'expérience a été faite sur les fœtus durant les mêmes temps d'incubation, mais aucune différence significative n'a été observée, et ce pour les deux temps d'incubation (**Figure 3.4 D-E**). De cette expérience, il est possible de déduire que l'action de 633 se produirait principalement du côté maternel. Ainsi, le contrôle inflammatoire se produirait principalement au niveau placentaire et empêcherait la propagation inflammatoire jusqu'à la circulation fœtale. Suite à l'analyse de ces résultats, il a été proposé de refaire ces résultats et d'ajouter des temps d'incubation plus longs afin de vérifier si la distribution pouvait être augmentée à travers le fœtus. De plus, il a été proposé d'ajouter un facteur inflammatoire en utilisant du LPS, ceci permettant de vérifier si la distribution pourrait être modifiée dû à une différence de perméabilité provoquée par une inflammation soutenue dans les tissus gestationnels.

3.4 633 et TOC permettent de prévenir la naissance prématurée et améliorent les issues à la naissance

Par la suite, une fois cette vérification validée, une seconde expérience in vivo voulant démontrer l'efficacité du 633 dans un modèle LPS fut analysée sur une nouvelle portée de souriceaux, et ce, toujours selon le modèle d'échéancier préalablement établi (voir **Figure supplémentaire 9.1**). Au jour PT1, une analyse périnatale (**Figure 3.5**) a été comptabilisée en comparant les 4 groupes de souriceaux. En accord avec l'hypothèse de départ, les souris gestantes véhicules ont eu un temps de gestation diminué (18,18 jours \pm 0,70) par rapport au groupe contrôle (19,04 jours \pm 0,45). (**Figure 3.5 : A**). Ce temps de gestation diminué a pu être renversé en administrant de manière anténatale du 633 (18,95 jours \pm 0,52). Ensuite, tel que montré à la **Figure 3.5 : B-D**, trois autres analyses périnatales ont été comptabilisées afin de vérifier l'effet protecteur de 633 sur ces mêmes souriceaux. Nous n'avons comptabilisé aucune naissance prématurée pour le groupe Sham (**Figure 3.5 : B**). Par ailleurs, la prématurité a été fixée en tenant compte du nombre de naissances se produisant avant le GD18.5 jour et a été rapportées en pourcentage. L'administration de 633 a permis d'obtenir moins de naissances prématurées (37,5%) que les groupes TOC (68,75%) et que véhicule (86,36%). Au niveau de la survie à la naissance (**Figure 3.5 : C**), analyse rapportant en pourcentage le nombre de souriceaux morts à la naissance sur la portée totale, il est possible de constater que le groupe 633 avait une fois de plus de meilleurs résultats, soit pour 68,75% des souriceaux en vie à la naissance. Le groupe TOC (50%) n'était pas significatif lorsque comparé avec le groupe véhicule (36,36%). Ces évaluations furent faites dans un délai de moins de 30 minutes après la fin de la parturition. Finalement, le poids à la naissance (**Figure 3.5 : D**) du groupe véhicule a été significativement diminué et l'administration anténatale de 633 ou de TOC permettait de retrouver le phénotype du groupe contrôle.

3.5 L'administration de 633 n'est pas toxique pour la progéniture

Avant de débiter les analyses histologiques subséquentes sur les souriceaux, il fut important de vérifier que le peptide à l'essai n'était pas toxique pour les nouveau-nés. La toxicité a été vérifiée en étudiant la morphologie des poumons et des intestins des souriceaux au jour

PT1 suivant le traitement expliqué plus haut (**Figure 3.6**) puisque ce sont les organes qui ont été analysés par la suite. Tel que présenté à la **Figure 3.6 : B-E**, l'exposition anténatale au 633 (à la même concentration que pour les analyses histologiques futures) ou TOC n'est pas toxique pour les poumons. En effet, il n'y avait aucune différence significative entre le groupe sham et les groupes 633 et TOC. Dans le même sens, une seconde analyse histologique (**Figure 3.7**) a été faite sur les intestins en vérifiant cette fois-ci la longueur des villosités et si l'atrophie variait entre les groupes sham et celui de 633. En accord avec l'analyse des poumons, l'administration anténatale de 633 n'est pas toxique pour les intestins. Ces résultats ont permis d'établir que les dommages observés étaient le résultat de l'inflammation induite par l'administration de LPS et non pas des traitements octroyés par les manipulations *in vivo*.

3.6 La modulation allostérique par 633 permet de protéger le tissu foetal de l'inflammation induite par LPS

Afin de mesurer les conséquences à long terme de l'inflammation engendrée *in utero* chez l'enfant, des analyses morphologiques sur des souriceaux aux jours PT15, au niveau de l'intestin (**Figure 3.8**), et PT15 et PT30 pour les poumons, ont été faites (**Figure 3.9**). Un temps histologique a été ajouté au niveau pulmonaire puisque l'alvéolarisation se termine beaucoup plus tard chez les souriceaux (250). Une première analyse histologique a été faite en mesurant la longueur des villosités des intestins ainsi que leur atrophie (**Figure 3.8 : B-C**). On peut remarquer une différence marquée entre la longueur villositaire du groupe Sham ($1391\mu\text{m} \pm 119$) et 633 ($1415\mu\text{m} \pm 165$) lorsque comparé avec véhicule ($826\mu\text{m} \pm 97$) et TOC ($870\mu\text{m} \pm 185$). De la même manière, l'atrophie des villosités entre les groupes Sham ($4\% \pm 6$) et 633 ($1\% \pm 3$) étaient similaire, tandis que TOC ($17\% \pm 9$) n'avait pas de différences significatives lorsque mis en comparaison avec le groupe véhicule ($31\% \pm 22$).

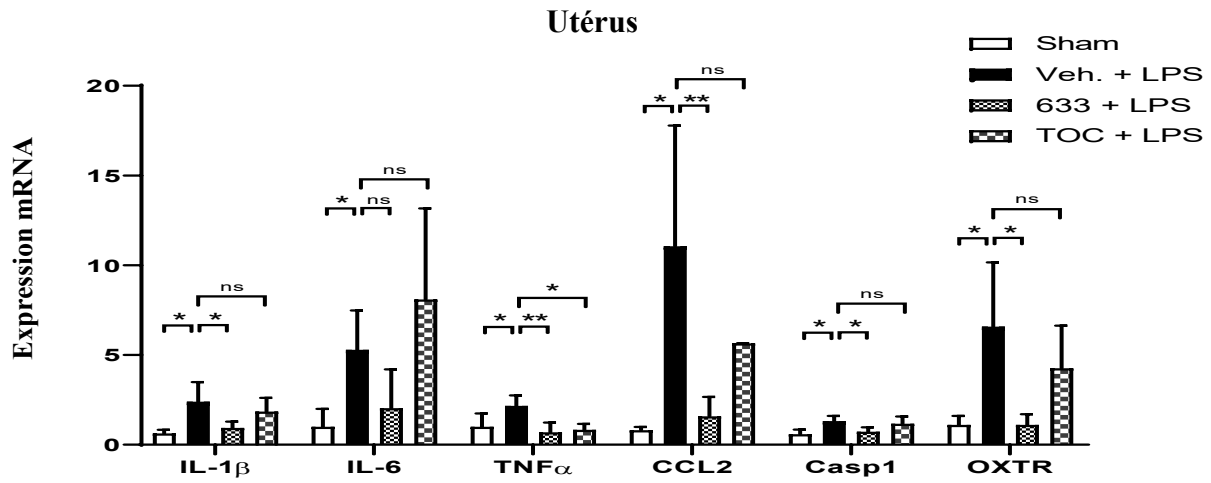
L'évaluation histologique sommaire des poumons du groupe véhicule (**Figure 3.9 : A**) permet de révéler un parenchyme alvéolaire atypique lorsque comparé au groupe Sham et 633, démontrant l'importance des dommages inflammatoires sur le poumon. Malgré une tendance vers un phénotype non inflammé, le groupe 633 à PT15 semble avoir été plus affecté au niveau du poumon (**Figure 3.9 : B**) que pour les intestins, possiblement expliqué par la continuité du processus de développement pulmonaire hors utérin. Malgré tout, il est possible de remarquer

une alvéolarisation améliorée pour le groupe 633 à PT30 (**Figure 3.9 : D-E**) suggérant des effets anti-inflammatoires postnatals de ce nouveau composé. Ces bénéfices postnatals pourraient d'ailleurs refléter des résultats ayant déjà été publiés par le laboratoire avec l'utilisation d'un antagoniste similaire chez le souriceau (251). Les résultats sur l'intestin et le poumon permettent de montrer que l'administration anténatale de 633 permet de grandement diminuer et possiblement même rattraper les effets néfastes de l'inflammation durant le développement fœtal.

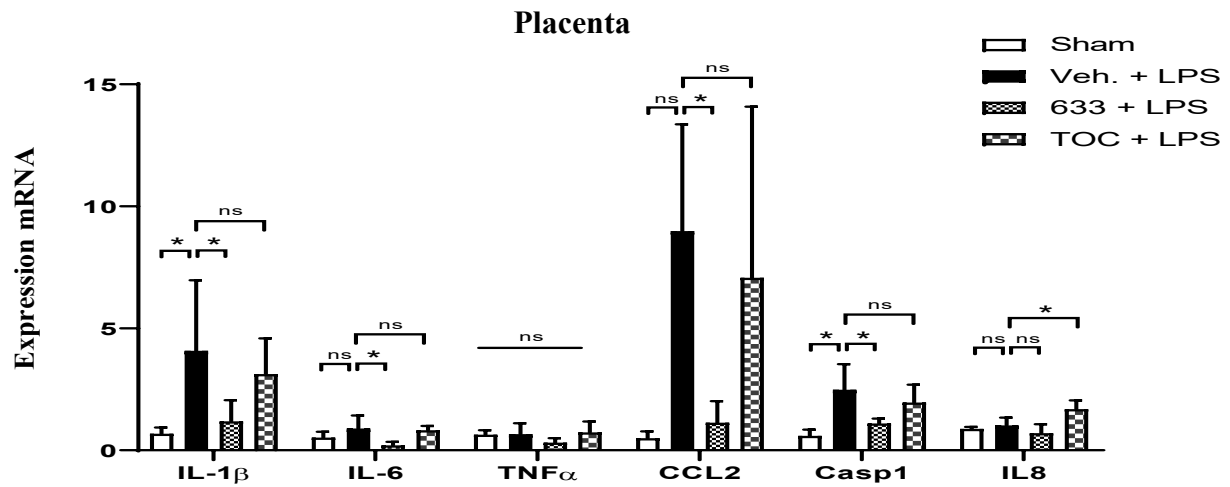
Figures et tableaux

Figure 3.1 633 permet de diminuer la régulation de gènes UAP et pro-inflammatoires

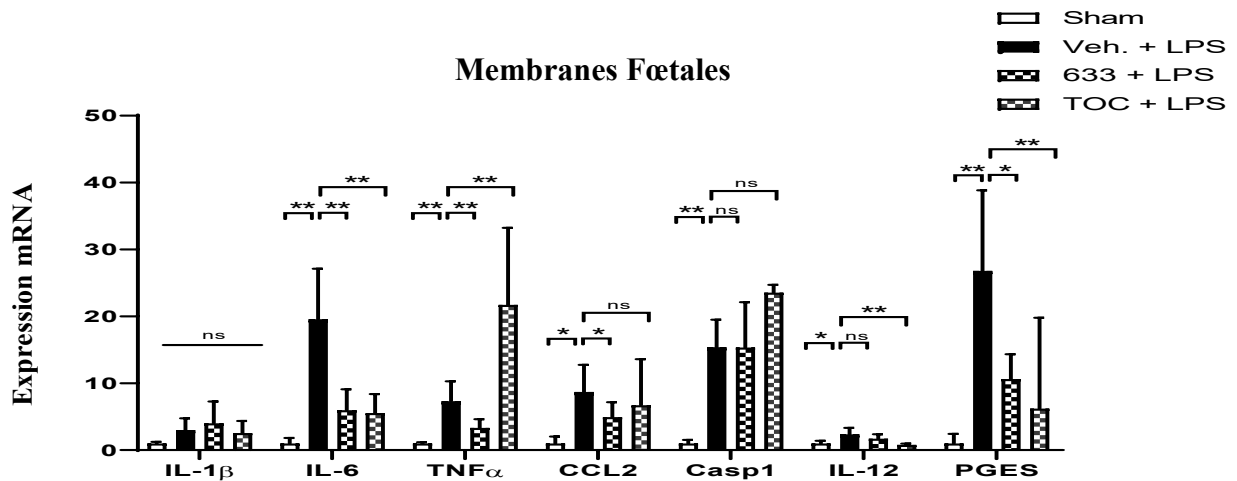
A



B



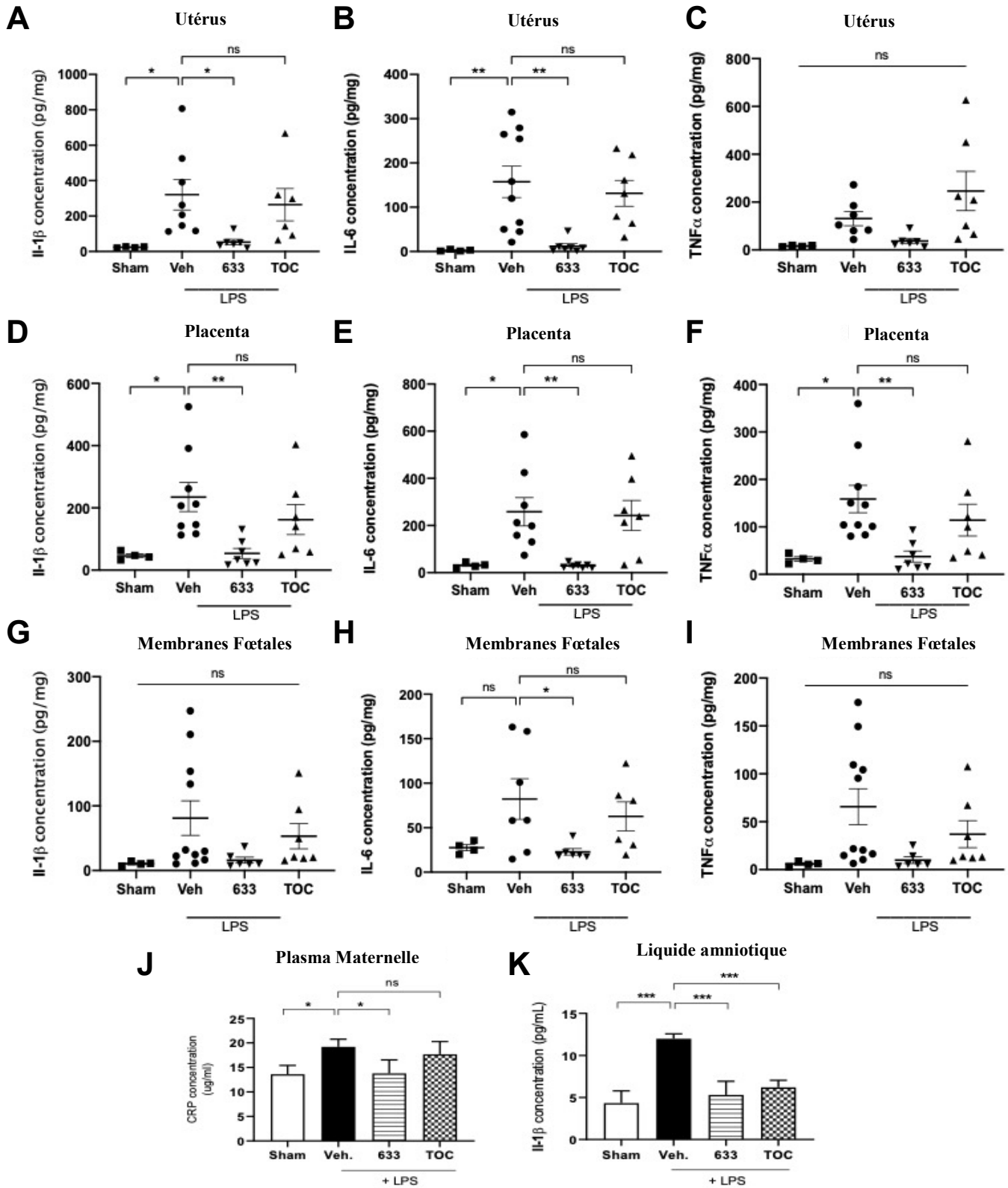
C



3.7 633 permet de diminuer la régulation de gènes UAP et pro-inflammatoires

633 peut prévenir la PTB induite par le LPS chez des souris gestantes grâce à la modulation de gènes pro et anti-inflammatoires clés dans les tissus maternels et gestationnels. Les échantillons de tissus ont été récoltés sur des souris gestantes à G17.5 suivant un traitement unique au LPS (10 μ g i.p) à G16.5. Une PCR quantitative a été faite et l'expression des différents gènes a été normalisée avec le gène rapporteur HPRT. Les résultats sont exprimés en comparaison avec le groupe contrôle véhicule. Les gènes suivants ont été analysés dans l'utérus (A) : IL-1 β , IL-6, TNF α , CLL2, Casp1, OXTR, suivis des gènes suivants dans le placenta (B) : IL-1 β , IL-6, TNF α , CLL2, Casp1, IL-8 et finalement ceux-ci dans les membranes fœtales (C) : IL-1 β , IL-6, TNF α , CLL2, Casp1, IL-12, PGES. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 4-10, *p<0,05, **p<0.001 ns : non significatif.

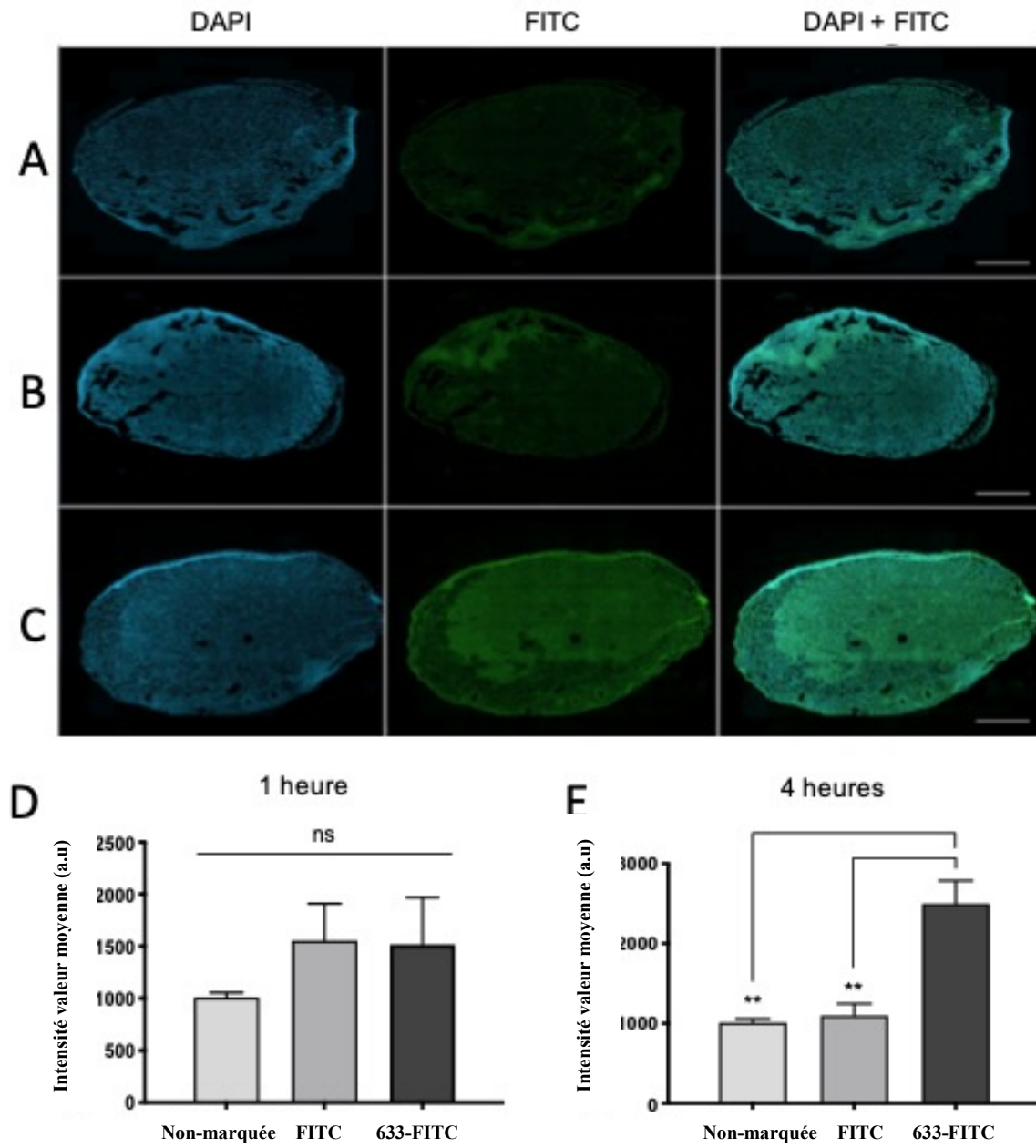
Figure 3.2. 633 permet de diminuer la synthèse de protéines pro-inflammatoires dans les tissus gestationnels et maternels



3.9 633 permet de diminuer la synthèse de protéines pro-inflammatoires dans les tissus gestationnels et maternels

L'administration anténatale de 633 permet de diminuer la synthèse de protéines clés dans les tissus maternels et gestationnels dans un modèle de PTB induite par le LPS chez des souris gestantes. Les échantillons de tissus ont été récoltés sur des souris gestantes à G17.5 suivant un traitement unique au LPS (10 μ g i.p) à G16.5. Les taux biologiques des différentes protéines ont tous été analysés par ELISA. Les résultats sont exprimés en comparaison avec le groupe contrôle véhicule. Les trois cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α ont été analysé dans l'utérus (A-C), dans le placenta (D-F) et dans les membranes fœtales (G-I). Une ponction cardiaque a été réalisée sur les mères gestantes et les niveaux sériques de CRP (J) et de IL-1 β ont été analysés. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 4-10, *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001 ns : non significatif.

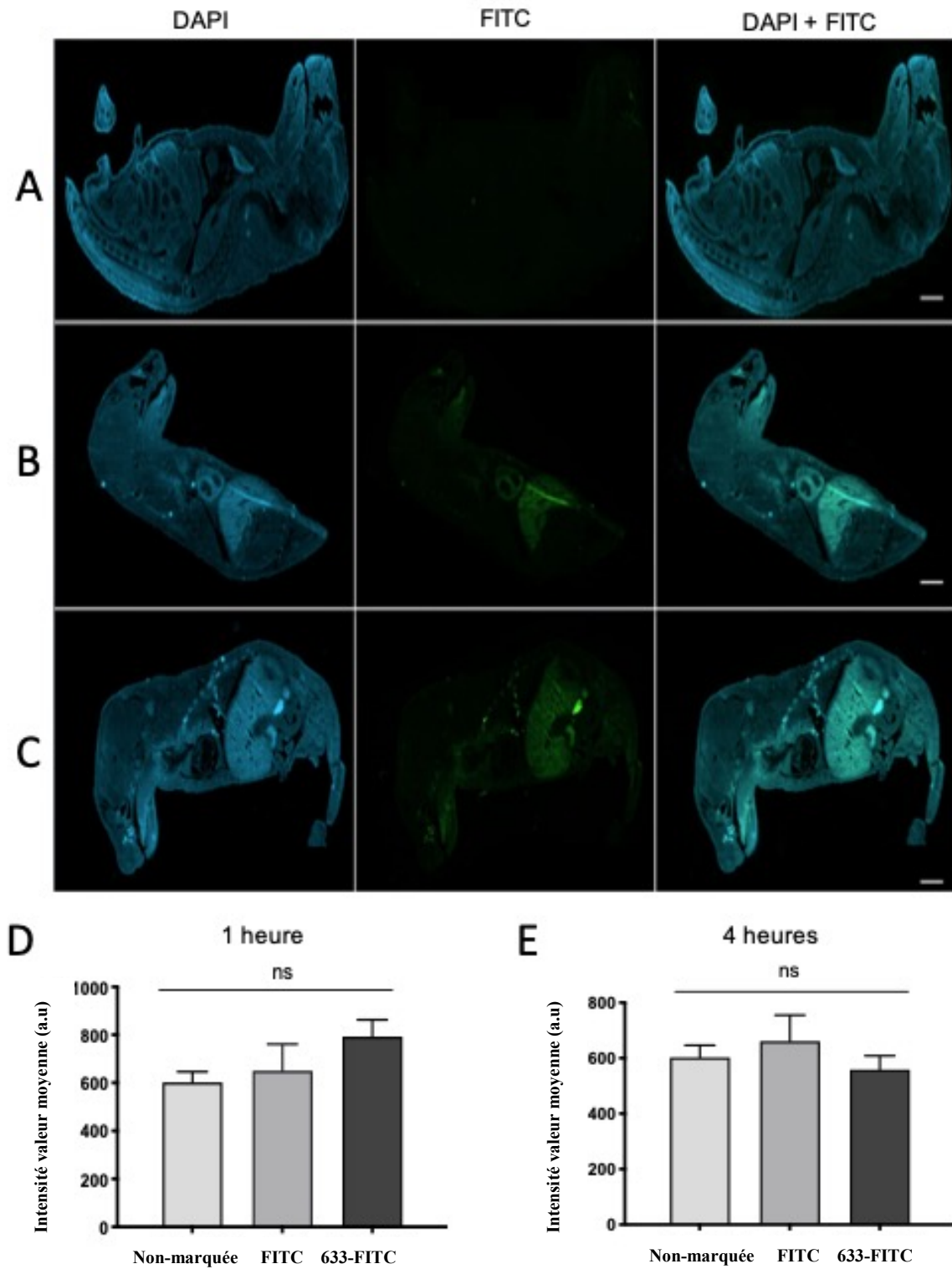
Figure 3.3 La biodistribution de 633 dans le placenta



3.10 La biodistribution de 633 dans le placenta

Il est possible de localiser 633 au niveau placentaire chez les souris gestantes. (A-C) Photos de sections de placentas marqués au DAPI et au FITC. Barres d'échelle: 100 μm . (A) Placenta non marqué au FITC. (B) Placenta marqué FITC seul. (C) Placenta marqué au 633-FITC. (D) Mesure de la fluorescence du FITC et de 633-FITC sur des placentas après incubation de 1h. (E) Mesure de la fluorescence du FITC et de 633-FITC sur des placentas après incubation de 4h. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 2-8, **p<0,001, ns: non-significatif.

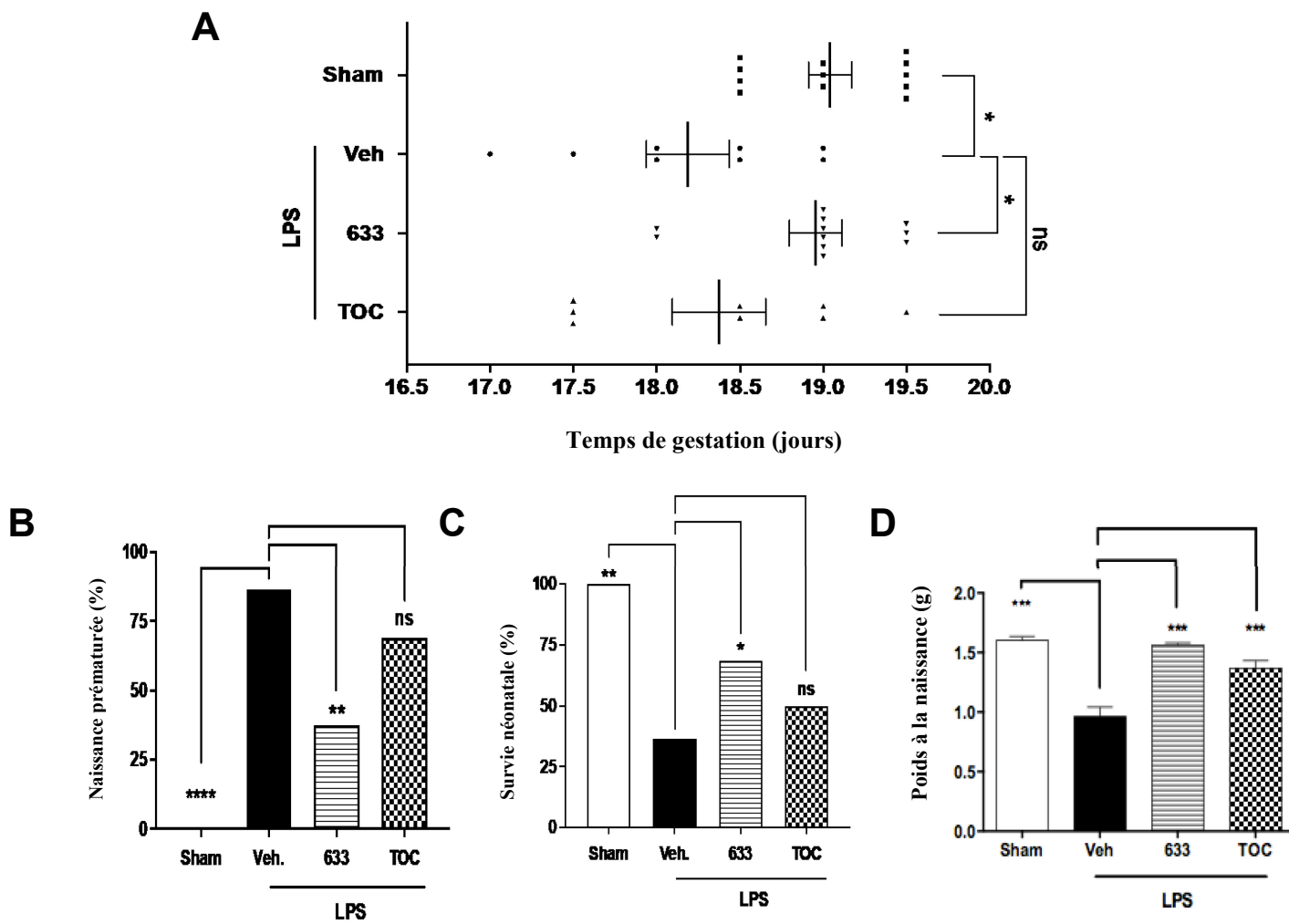
Figure 3.4 La biodistribution de 633 dans le fœtus



3.12 La biodistribution de 633 dans le fœtus.

633 ne se distribue pas au niveau du fœtus. (A-C) Photos de sections de fœtus à GD17 marqué au DAPI et au FITC. Barres d'échelle: 200 μm . (A) Fœtus non marqué au FITC. (B) Fœtus marqué FITC seul. (C) Fœtus marqué au 633-FITC. (D) Mesure de la fluorescence du FITC et de 633-FITC sur des fœtus après incubation de 1h. (E) Mesure de la fluorescence du FITC et de 633-FITC sur des fœtus après incubation de 4h. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 2-8, ns : non significatif.

Figure 3.5 Évaluation périnatale : Les effets délétères de l'inflammation induite par le LPS sont diminués par l'administration anténatale de 633



3.13 Évaluation périnatale : Les effets délétères de l'inflammation induite par le LPS sont diminués par l'administration anténatale de 633.

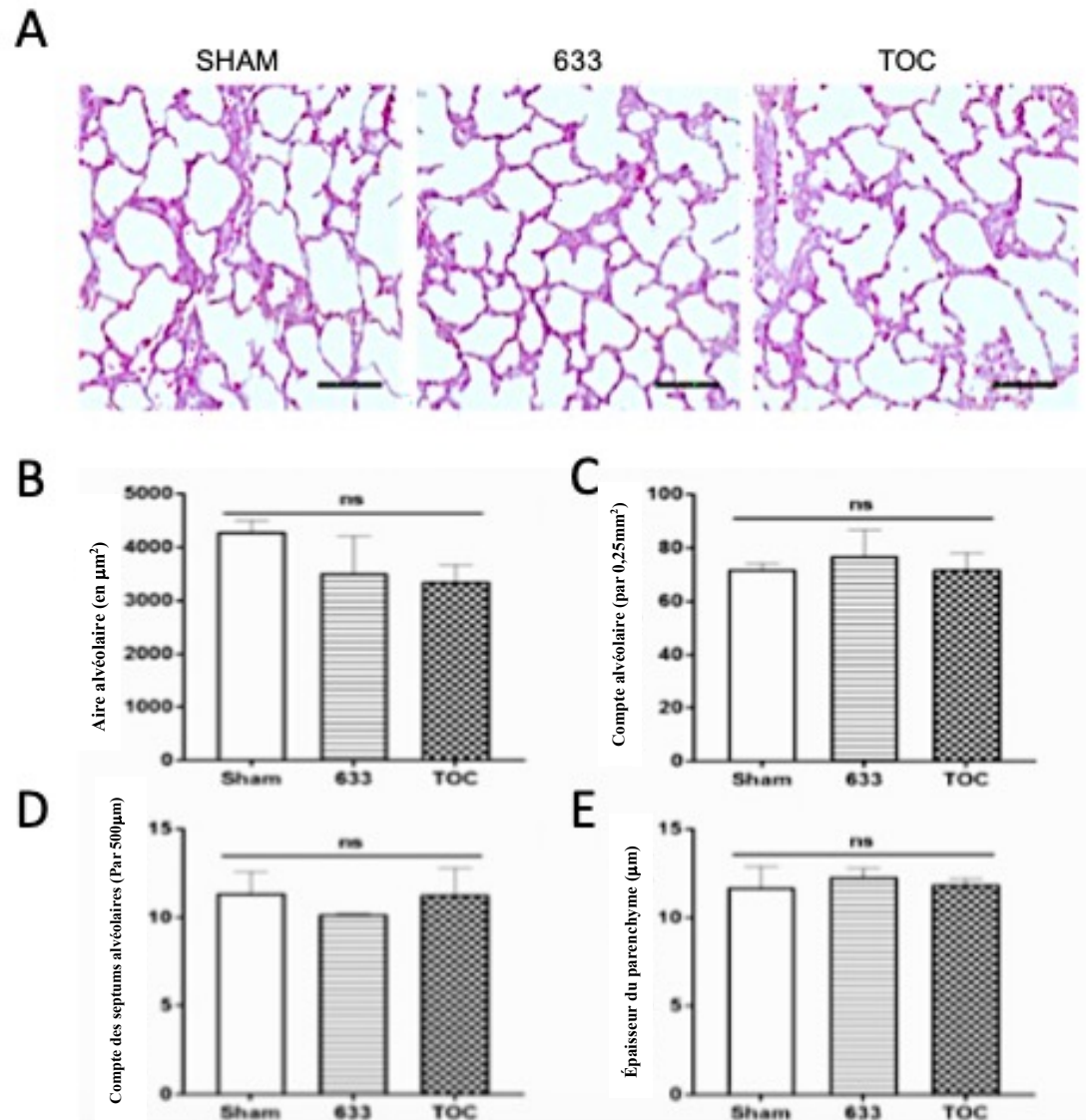
633 permet de diminuer les naissances prématurées et des comorbidités périnatales associées. (A) Durée de gestation. Le moment de naissance des souris gestantes est affiché. 633 permet de prévenir la naissance prématurée induite par LPS. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, ns : non significatif.

(B) Pourcentage de prématurité. La prématurité étant défini comme une naissance se produisant avant la 18.5^e journée. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,00001$, ns : non significatif

(C) La survie du nouveau-né. Seul 633 permet d'améliorer le pourcentage de survie à la naissance. Les valeurs ont été obtenues >30 minutes suivant l'accouchement. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 3-4, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, ns : non significatif

(D) Le poids à la naissance du nouveau-né. 633 et TOC permettent d'améliorer le poids à la naissance. Les valeurs ont été obtenues >30 minutes suivant la parturition. Les valeurs sont présentées selon une moyenne \pm SEM. n = 35-45, *** $p < 0,0001$

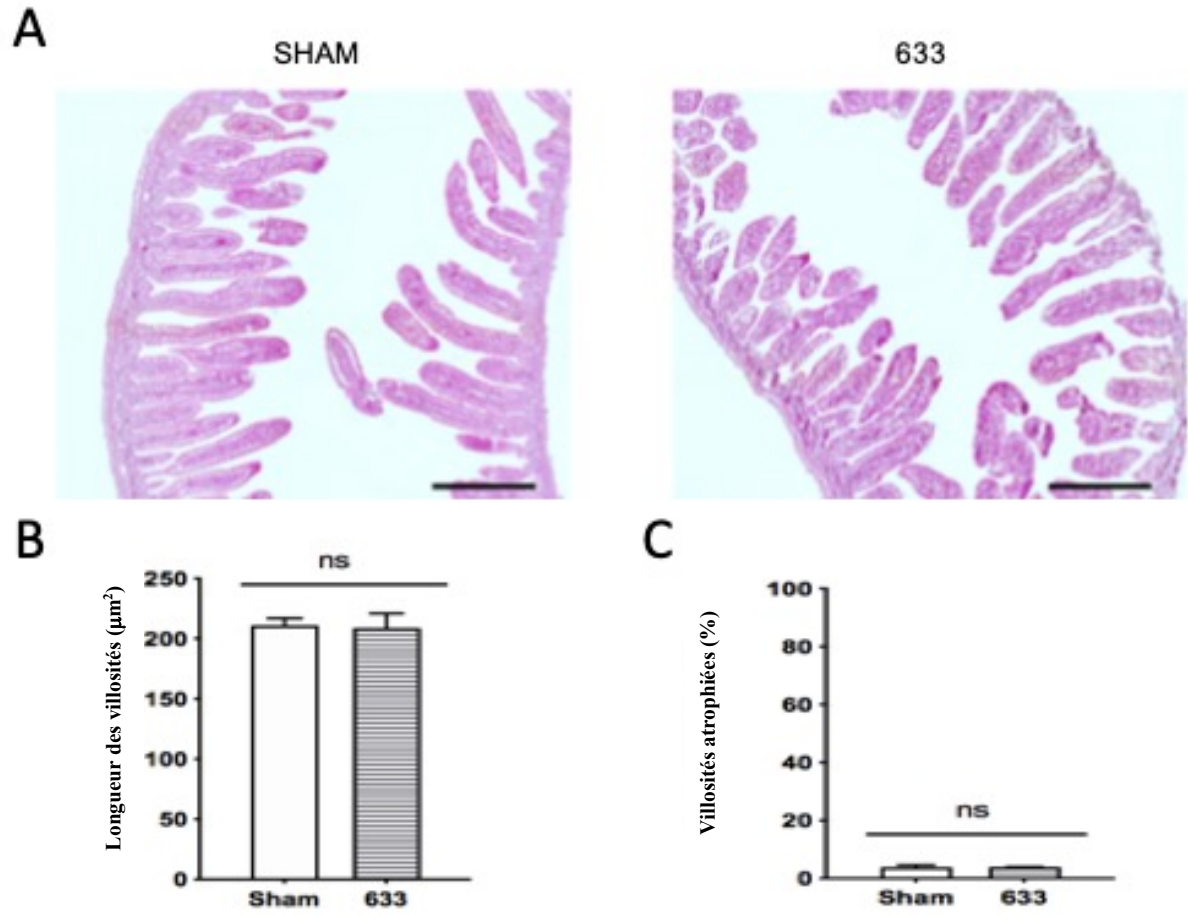
Figure 3.6 L'exposition anténatale au 633 ou TOC n'est pas toxique pour les poumons



3.14 L'exposition anténatale au 633 ou TOC n'est pas toxique pour les poumons

633 n'est pas toxique pour les poumons au niveau morphologique. (A) Photos représentatives du parenchyme pulmonaire coloré au H&E. Barres d'échelle : 100 μ m. (B) Mesure du compte alvéolaire; (C) de l'aire alvéolaire ; (D) du compte des septums alvéolaires; (E) de l'épaisseur des septums. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 2-4, ns : non significatif.

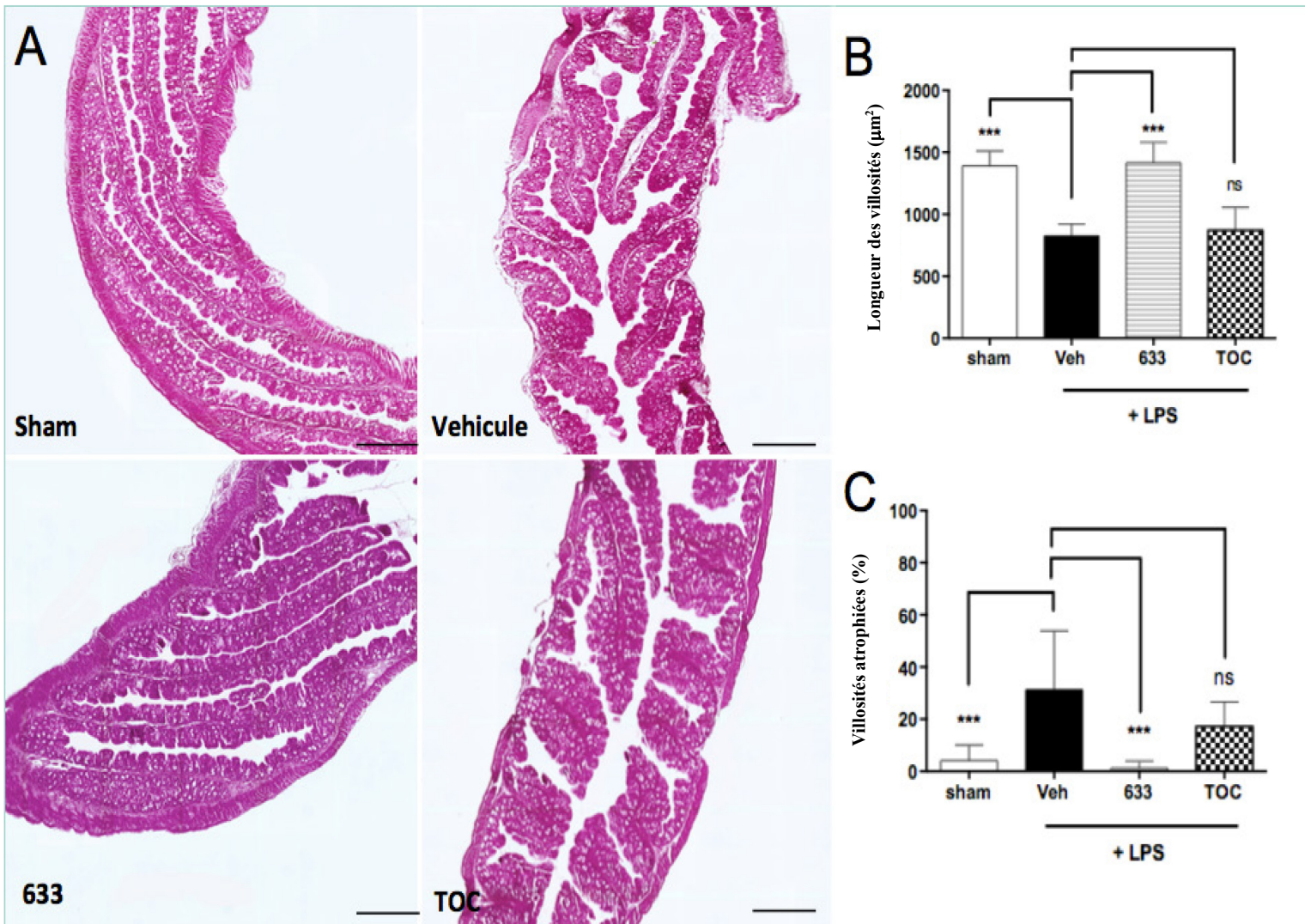
Figure 3.7 L'exposition anténatale de 633 n'induit pas d'anomalies morphologiques sur les intestins



3.15 L'exposition anténatale de 633 n'induit pas d'anomalies morphologiques sur les intestins.

633 n'est pas toxique pour les intestins au niveau morphologique. (A) Photos des villosités de l'intestin colorées au H&E. Barres d'échelle : 100 mm. Mesure de : (B) la longueur des villosités (C) l'atrophie des villosités. L'atrophie a été définie comme une profondeur >100mm et transformée en pourcentage. Les données sont obtenues suite à un *T*-Test. n = 2-4, ns: non significatif.

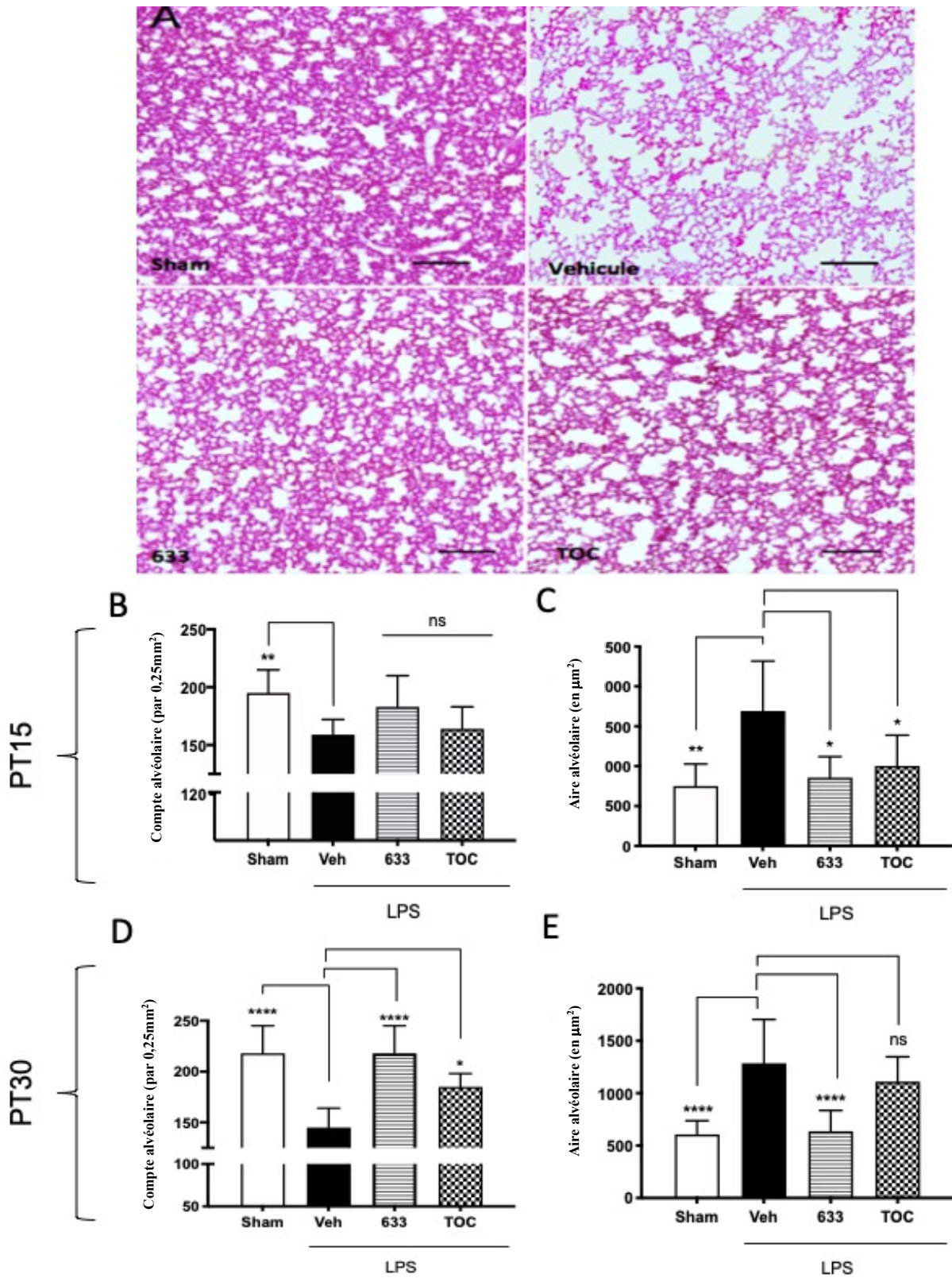
Figure 3.8 L'exposition anténatale de 633 permet de protéger l'intestin des effets délétères de l'inflammation.



3.16 L'exposition anténatale de 633 permet de protéger l'intestin des effets délétères de l'inflammation

L'inflammation induite par le LPS avant la naissance provoque des dommages morphologiques sur les intestins et a pu être corrigée suite à l'administration anténatale de 633. (A) Photos représentatives des villosités intestinales colorées au H&E. Barres d'échelle : 500 μm . (B) Mesure de la longueur villositaire. (C) Mesure de l'atrophie des villosités. L'atrophie a été définie comme une longueur de $>500\mu\text{m}$ et transformée en pourcentage. Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 4 à 8, ns : non significatif, ***p < 0.0001.

Figure 3.9 L'exposition anténatale de 633 permet de protéger le parenchyme pulmonaire des effets délétères de l'inflammation



3.18 L'exposition anténatale de 633 permet de protéger le parenchyme pulmonaire des effets délétères de l'inflammation

L'inflammation induite par le LPS avant la naissance provoque des dommages morphologiques sur les poumons et a pu être corrigée suite à l'administration anténatale de 633. (A) Photos représentatives du parenchyme pulmonaire coloré au H&E. Barres d'échelle : 200 μm . Mesure de : (B) du compte alvéolaire à PT15 et à PT30 (D), (C) de l'aire alvéolaire à PT15 et à PT30 (E). Les valeurs sont présentées comme une moyenne \pm SEM. n = 4 à 8, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$, ns : non significatif.

4 Discussion

L'inflammation est une composante indissociable et nécessaire au processus de l'accouchement, qu'il soit à terme ou non (252). Il participe au processus normal de la parturition et est largement augmenté dans le cervix, le myomètre, les membranes fœtales ainsi que dans la cavité amniotique au moment de l'accouchement. Notamment, il permet l'infiltration leucocytaire au tissu gestationnel permettant la maturation cervicale 34. Toutefois, lorsque déclenché trop tôt, ce processus peut devenir pathologique tant pour la mère que pour le fœtus. Les dommages engendrés via cette inflammation anténatale au niveau utérin peuvent avoir des répercussions longtemps sur le développement de l'enfant et même perdurer durant sa vie adulte.

Cette étude prouve le rôle crucial d'IL-6 dans l'induction de la PTB et des dommages que cette cytokine peut occasionner sur le fœtus. En effet, en utilisant un antagoniste du récepteur de l'IL-6 dans un modèle d'inflammation induit avec du LPS, c'est-à-dire un type d'inflammation pathophysiologique imitant une infection bactérienne, il a été possible d'améliorer la condition fœtale à la naissance et de diminuer le taux de prématurité. Le fait de sélectivement cibler cette cytokine uniquement montre le rôle important qu'elle peut avoir dans le développement inflammatoire lors de cette condition et des dommages qu'elle peut occasionner sur le fœtus. D'ailleurs, l'un des avantages de 633 sur lequel nous avons particulièrement misé est sa capacité à moduler spécifiquement les voies de signalisation de IL-6R de manière allostérique. L'inhibition sélective de la voie pro-inflammatoire STAT3 et la préservation des voies de AKT et de ERK sont favorables au développement fœtal et permettent un processus inflammatoire normal. En effet, malgré le rôle important d'IL-6 dans la promotion de l'inflammation, il joue également un rôle nécessaire sur le métabolisme et dans la résolution inflammatoire, notamment en contrôlant le niveau de cytokines pro-inflammatoires (253).

STAT3 a été démontré comme un facteur de transcription déterminant dans l'activation de la phase aiguë de l'inflammation synthétisée par le foie (254,255). En diminuant l'activité de STAT3, 633 diminue la synthèse de protéines clés dans la mise en place de la prématurité en diminuant la CRP, IL-1 β , IL-6 et TNF α en plus de diminuer l'expression génétique de plusieurs

autres protéines pro-inflammatoires. L'une des activités particulièrement intéressantes de STAT3 en ce qui a trait à la prématurité est qu'il est essentiel à la différenciation des Th17 (256). Comme mentionné, ces dernières sont largement impliquées dans les maladies auto-immunes chroniques et inflammatoires et sécrètent de l'IL-17, une cytokine participant à son tour à la stimulation et à l'activation des neutrophiles et cytokines pro-inflammatoires (203). Une hausse d'IL-6, et ainsi de STAT3, crée alors un débalancement déjà fragile vers les Th17 au détriment des Treg. Ces dernières données pourraient être des raisons majeures pourquoi 633 et TOC auraient effectivement réussi à diminuer les symptômes inflammatoires et augmentés la durée de gestation. Durant les expériences, l'une des préoccupations quant à l'inhibition de STAT3 était dû à son rôle nécessaire durant le développement fœtal. Il a été démontré que STAT3 était essentiel lors de la différenciation épithéliale pulmonaire en plus de promouvoir la production du surfactant chez la souris fœtus (257). Par ailleurs, il serait aussi impliqué dans le développement du système nerveux central et de l'œil (258). L'un des avantages de 633 est qu'il permet d'inhiber la voie de STAT3 provenant uniquement de l'IL-6R, et non pas de la totalité des voies d'activation impliquant STAT3. En outre, dans cette étude, il a démontré que le peptide ne se retrouvait pas dans le fœtus, ou que très peu significativement, un avantage considérable puisque cela diminue les chances de contrevenir à son développement.

L'utilisation du peptide 633 préserve les voies de signalisation de MAPK et de AKT (voir **Annexe : Figure 9.3**), voies cruciales dans la survie et la croissance cellulaire. L'implication de ces voies a notamment été démontrée en comparant les deux traitements antagonistes de IL-6R. L'une des utilités de la thérapie au TOC lors de cette étude était d'avoir un contrôle supplémentaire montrant ce que l'inhibition complète d'IL-6 pouvait engendrer dans un contexte d'inflammation gestationnel. Tel que mentionné précédemment, Roberston et al. ont démontré que chez des souris KO IL-6, le temps de gestation était prolongé de plusieurs jours (126). Cela concrétise le rôle d'IL-6 dans l'activation locale de gènes responsables de l'activité utérine, notamment des PG (126). De plus, des études ont démontré le rôle important de la voie de MAPK dans la prévention de l'apoptose et dans la capacité tissulaire à se régénérer et recouvrir d'une insulte inflammatoire (259,260). Parallèlement, AKT a été démontré comme responsable de la survie cellulaire, de la progression dans le cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN, des processus tous très importants lors du développement fœtal et afin de permettre

une réponse adéquate aux dommages cellulaires (261). Au travers des expériences, le TOC avait une moins grande efficacité que le peptide 633 autant au niveau des issues à la naissance que de l'intégrité du tissu fœtal. Ceci permet d'expliquer en partie la différence vue dans nos résultats, ces résultats corrélerent avec la différence dans les mécanismes d'action des deux traitements. L'inhibition des voies de AKT et de ERK de la voie d'IL-6 est ici mise de l'avant comme essentiel lors du développement du fœtus.

Quant à la biodistribution de 633 chez la mère et dans le fœtus, les résultats ont permis de montrer que le peptide diffusait jusqu'au placenta, mais qu'il ne traversait pas la barrière placentaire pour se rendre jusqu'à la circulation et dans les tissus fœtaux. L'inflammation engendrée *in utero* serait diminuée directement au niveau du placenta, empêchant ainsi les répercussions en aval sur le fœtus. 633 est une petite molécule flexible qui perfuse bien dans les tissus. Les structures pharmacologiques de 633, un peptide de 9 aa, et TOC, un anticorps d'une masse moléculaire de près de 150 000 g/mol, a probablement participé aux différences significatives observées dans nos résultats. De plus, il serait intéressant de vérifier si une concentration plus élevée de TOC permettrait de diminuer le taux de prématurité et de retrouver une thérapie semblable à celle offerte par 633 durant cette étude. Néanmoins, la hausse de concentration pourrait affecter la toxicité du TOC et celle-ci n'a jamais été vérifiée dans un contexte de développement fœtal.

Les poumons immatures des bébés prématurés sont particulièrement sensibles aux dommages inflammatoires dû au fait qu'une partie de leur développement se produit immédiatement avant la naissance. En plus, ces insultes inflammatoires générées *in utero* sont exacerbées à la naissance puisqu'un soutien périnatal sous la forme d'oxygénothérapie ou encore à l'aide de ventilation mécanique est souvent nécessaire. En plus des médiateurs inflammatoires déjà présents dans la circulation fœtale, il a aussi été documenté que l'aspiration du liquide amniotique par le fœtus agissait comme une translation inflammatoire supplémentaire, exacerbant les dommages sur le parenchyme pulmonaire. De ce fait, l'inflammation induite par IL-6 joue un rôle central dans le développement de la DBP, l'une des principales affections causant la mortalité et la morbidité chez les enfants prématurés (262). Les cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1 β et TNF α créent un environnement hostile et

dommageable lors de cette ultime phase de développement puisque l'endothélium pulmonaire est particulièrement vulnérable à l'inflammation chronique. Dans cette étude, l'administration de LPS a causé une différence significative dans le développement du parenchyme pulmonaire, notamment en diminuant la surface disponible permettant les échanges gazeux. En accord avec nos résultats, il a été documenté que la présence d'IL-6 est corrélée à une diminution de la fonction pulmonaire (altération de l'alvéolisation, réduction de la production de protéines associées à la production de surface, diminution de la formation microvasculaire) chez les humains prématurés et reproduite expérimentalement chez les animaux (263–265). Par définition, le SDR est une maladie respiratoire engendrée par un manque de surfactant pulmonaire, survenant principalement chez les enfants prématurés qui ne peuvent pas encore produire des quantités suffisantes de surfactant. La chorioamnionite associée au FIRS augmente le risque de SDR, et ces nourrissons réagissent moins bien au traitement que ceux chez qui on a diagnostiqué une chorioamnionite sans FIRS (266). Dans une étude de Yoon et al., les nourrissons ayant développé une DBP présentaient un taux médian d'IL-6 plus élevé au niveau du cordon ombilical que ceux sans DBP (267).

La NEC, une condition où une partie de l'appareil digestif meurt constitue également une pathologie associée à la prématurité. Elle touche 7 % des nouveau-nés prématurés; de ce nombre, un tiers décèdera des complications qui en découlent (268). Cette affection grave se caractérise par des concentrations plasmatiques et des niveaux d'expression tissulaire élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α (269,270). Wisgrill et al. ont démontré que le niveau d'IL-6 plasmatique présente une corrélation directe avec la gravité de la NEC et la nécessité d'une intervention chirurgicale ultérieure (271). De plus, il a d'ailleurs été démontré que des taux élevés de IL-6 ont été trouvés dans le plasma et dans les selles des patients atteints de NEC et auraient un lien direct avec la sévérité de cette condition. Nous avons démontré que l'administration de LPS était dommageable pour l'intégrité intestinale et l'administration de 633 avait un effet protecteur chez les fœtus. Ces effets bénéfiques étaient même maintenus jusqu'à plusieurs jours après la naissance des souriceaux. Afin de poursuivre davantage les résultats de cette étude, il sera intéressant de mesurer la fonction immunitaire du système digestif, notamment en analysant le compte et la grosseur des follicules lymphoïdes retrouvés dans le colon. Ceci permettra de mieux expliquer comment les dommages

inflammatoires peuvent diminuer la surveillance immunitaire du nouveau-né. Les taux de lymphocytes B et T présents chez le bébé naissant n'atteignent pas les mêmes niveaux que ceux retrouvés chez adulte avant la 3 ou 4^e semaines de vie. Qui plus est, l'enfant né prématuré à une diminution de sa production d'acide gastrique. Ces derniers facteurs pris ensemble augmentent la possibilité que les bactéries interagissent avec les entérocytes immatures. D'ailleurs, il a été documenté qu'une augmentation de l'invasion bactérienne augmenterait les risques de dommages causés par la NEC (268).

Finalement, le design spécifique de 633 en fait une thérapie de choix pour la modulation inflammatoire durant la grossesse. Les peptides, et plus particulièrement les peptidomimétiques, ont un avantage significatif lorsque comparé à une thérapie similaire utilisant des anticorps. Ces derniers sont abondamment utilisés en clinique. Effectivement, les traitements utilisant les anticorps dominant actuellement le marché mondial (272). Toutefois, il est important à savoir qu'ils amènent tout de même leurs lots d'effets secondaires. De par leur structure biologique, ils atteignent généralement moins bien leurs tissus cibles lorsque comparés aux peptides, ils sont plus dispendieux et, bien importants, peuvent déclencher et accentuer une réponse immunitaire pathophysiologique, même lorsqu'humanisée (273). Dû à leur grande spécificité, les peptidomimétiques permettent d'obtenir sensiblement les mêmes résultats et d'éviter les effets collatéraux que les anticorps peuvent provoquer. En 2017, on pouvait compter 68 peptides disponibles commercialement aux USA, en Europe et/ou au Japon et plus de 155 étaient en phase de développement clinique (272). C'est une branche de développement pharmacologique en pleine expansion, plaçant les traitements tel que 633 comme ayant un futur potentiel clinique très avantageux.

5 Conclusion

En sommes, 633 est une molécule ayant un fort potentiel thérapeutique dans un modèle murin d'inflammation durant la PTB. Nos expériences font suite à de nombreuses publications au sein du laboratoire prouvant le raisonnement fondamental et clinique derrière la génération de tel peptidomimétique (135,247,248,251,274–278). IL-6 est une cible de choix pour le traitement de l'inflammation engendré *in utero*. Non seulement cette cytokine peut induire une inflammation suffisante pour diminuer le temps de gestation, mais peut aussi causer des dommages importants au niveau de l'intégrité du tissu fœtal. Les avantages de la modulation allostérique de l'IL-6R par 633 permettront d'offrir une thérapie innovante, relativement peu coûteuse et sécuritaire pour la mère et le fœtus.

6 Directions futures

La caractérisation d'un nouveau composé thérapeutique ouvre de larges horizons scientifiques autant au niveau fondamental que clinique. Avant d'être commercialisée, une gamme d'expériences devra être mise en place afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de 633 et de s'assurer que son administration soit sécuritaire pour le mère de même que pour le fœtus. En plus, mieux comprendre la pharmacodynamie de la molécule permettra une utilisation dans une plus grande étendue de pathologie inflammatoire. Finalement, en comprenant le mécanisme d'action du peptide, celui-ci intrinsèquement lié à IL-6 et IL-6R, nous comprenons davantage le profil moléculaire et cellulaire de cette cytokine.

6.1 Investiguer davantage le mécanisme d'action de 633 durant la prématurité en utilisant un inhibiteur de STAT3

Afin de compléter le profil pharmacologique de 633 et du rôle d'IL-6 dans la prématurité, une expérience utilisant différents types d'inhibiteurs de STAT3 seulement pourra être utilisée en utilisant le même modèle que durant cette étude. Cela permettra de clarifier le rôle de 633 dans la prématurité et de son fonctionnement dans l'inhibition inflammatoire durant la gestation.

6.2 Biodistribution détaillée de 633 et de TOC

Une nouvelle expérience sera nécessaire afin de valider avec certitude la localisation possible de 633 et de TOC. Il sera nécessaire d'analyser via différentes coupes de placenta afin de vérifier si leur distribution se situe plutôt du côté maternel ou fœtal. À cette future expérience seront aussi ajoutés d'autres tissus gestationnels tels que les membranes fœtales et l'utérus. En plus de l'utilisation de l'immunofluorescence, il sera pertinent d'ajouter une analyse utilisant la cytométrie en flux afin d'obtenir une analyse plus complète. Finalement, un nouveau groupe pourra être ajouté afin vérifier si l'administration de LPS peut modifier la biodistribution de 633 ou de TOC. Cela permettra d'investiguer l'impact que l'inflammation peut avoir au niveau du passage de diverses molécules thérapeutiques à travers la barrière placentaire.

6.3 Caractérisation du profil inflammatoire dans les tissus fœtaux suite à l'administration de 633

Afin de mieux caractériser 633 durant la prématurité, il sera nécessaire d'obtenir des informations sur son effet dans les tissus des souriceaux aux différents temps de vie préalablement étudiés au niveau histologique durant ce travail (PT1, PT5, PT15, PT30). Pour ce faire, il sera nécessaire de vérifier l'expression de gènes pro et anti-inflammatoires (voir **Tableau 2.2**) dans les différents tissus (poumons et intestins). En plus, un dosage protéique de IL-1 β , IL-6 et TNF α sera fait sur ces mêmes tissus.

6.4 Vérifier la liaison de 633 au récepteur à la membrane et au récepteur soluble.

Il a été démontré que la voie de signalisation trans d'IL-6 permet une activation différente de celle activée lors de la liaison au mIL-6R. En effet, l'activation via sIL-6R active majoritairement une voie pro-inflammatoire. Ainsi il sera pertinent de vérifier la sélectivité de 633 sur les différents types de récepteurs de l'IL-6. Pour ce faire, une expérience *in vitro* serait faite en utilisant un type cellulaire ne contenant pas de récepteur membranaire. Du sIL-6R sera ajouté avec du 633 afin de vérifier si le peptide peut effectivement contrer l'effet du récepteur soluble.

6.5 Vérifier l'effet de 633 sur l'infiltration leucocytaire dans les tissus gestationnels et dans les tissus fœtaux.

L'infiltration leucocytaire dans les tissus gestationnels et dans les organes fœtaux sera analysée dans une étude *in vivo* chez la souris gestante. Toujours en respectant l'échéancier préalablement établi, les tissus gestationnels et les organes des souriceaux seront collectés et analysés à l'aide d'immunohistochimie et en utilisant la cytométrie en flux. Les marqueurs cellulaires pertinents seront sélectionnés afin d'analyser de manière plus approfondie l'infiltration et l'activation des macrophages, neutrophiles et lymphocytaires dans les tissus.

6.6 Investiguer le rôle de STAT3 induit par IL-6 dans la différenciation leucocytaire

Une question a été soulevée dans cette étude quant au rôle de l'IL-6 dans la tolérance mère-fœtus via l'activation de STAT3. Il sera pertinent de vérifier si l'efficacité de 633 pourrait être en grande partie due au fait qu'il empêche la différenciation lymphocytaire vers les Th17 au détriment des Treg. Pour ce faire, des études plus détaillées seront faites de manière *in vivo* en utilisant 633 en plus d'un inhibiteur de STAT3 afin d'investiguer la différenciation lymphocytaire. Les marqueurs cellulaires pertinents seront sélectionnés afin de procéder à l'analyse du compte et de l'activation de différents types lymphocytaires en utilisant la cytométrie en flux et à des analyses biochimiques (qPCR et ELISA afin de vérifier la synthèse et sécrétion de cytokines). De plus, afin d'obtenir un profil beaucoup plus complet et détaillé, il sera possible d'ajouter une analyse de type RNA-seq sur les tissus gestationnels et maternels.

7 Publications

Elizabeth Prairie, France Côté, Marika Tsakpinoglou, Michael Mina, Christiane Quiniou, Kelycia Leimert, David Olson, Sylvain Chemtob. The Determinant Role of IL-6 in the Establishment of Inflammation Leading to Spontaneous Preterm Birth, Cytokine and Growth Factor Reviews. Article accepté pour publication, Décembre 2020.

Alexandra Beaudry-Richard, Mathieu Nadeau-Vallée, **Elizabeth Prairie**, Noémie Maurice, Émilie Heckel, Sheetal Pundir, Ankush Madaan, Amarilys Boudreault, Xin Hou, Christiane Quiniou, Estefania Marin Sierra, Alexandre Beaulac, Sarah A. Robertson, Jeffrey Keelan, Kristina Adams-Waldorf, David M. Olson, Jose-Carlos Rivera, William Lubell, Jean-Sebastien Joyal, Jean-François Bouchard, Sylvain Chemtob. Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny, Scientific Reports. Août 2018.

8 Bibliographie

1. World Health Organization. Preterm birth. 2018.
2. Göthová M. [Approach to preterm birth on the threshold of viability (the 22-25 week) of gestation]. *Ces Gynekol.* 2013 Dec;78(6):573–83.
3. Institute of Medicine. Leading Health Indicators for Healthy People 2010: Final Report. Chrvala CA, Bulger RJ, editors. Washington (DC): National Academy of Sciences; 2010.
4. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health.* 2013;10 Suppl 1(Suppl 1):S2.
5. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R, et al. 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 (London, England).* 2012 Jun;379(9832):2162–72.
6. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller A-B, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Oct;52:3–12.
7. Statistique Canada. Naissances vivantes prématurées au Canada, 2000 à 2013. 2016.
8. Instituts de recherche en santé du Canada. Le gouvernement du Canada investit dans la santé des prématurés [Internet]. 2017 [cited 2020 Jan 5]. Available from: https://www.canada.ca/fr/instituts-recherche-sante/nouvelles/2017/05/le_gouvernement_ducanadainvestitdanslasantedesprematures.html#shr-pg0
9. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2016 Dec 17 [cited 2021 Feb 2];388(10063):3027–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27839855>
10. Barradas DT, Wasserman MP, Daniel-Robinson L, Bruce MA, DiSantis KI, Navarro FH, et al. Hospital Utilization and Costs Among Preterm Infants by Payer: Nationwide

- Inpatient Sample, 2009. *Matern Child Health J* [Internet]. 2016;20(4):808–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10995-015-1911-y>
11. Boardman JP. Preterm Birth: Causes, Consequences and Prevention. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* [Internet]. 2008 Jan 1;28(5):559. Available from: <https://doi.org/10.1080/01443610802243047>
 12. Moutquin J-M. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG*. 2003 Apr;110 Suppl:30–3.
 13. Manuck TA, Esplin MS, Biggio J, Bukowski R, Parry S, Zhang H, et al. The phenotype of spontaneous preterm birth: application of a clinical phenotyping tool. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Feb 4];212(4):487.e1-487.e11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687564>
 14. NIH. What are the risk factors for preterm labor and birth? 2017.
 15. March Of Dimes. PRETERM LABOR AND PREMATURE BIRTH: ARE YOU AT RISK? 2018.
 16. MAYO CLINIC. Preterm labor. 2019.
 17. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet (London, England)*. 2008 Jan;371(9606):75–84.
 18. Boyd HA, Poulsen G, Wohlfahrt J, Murray JC, Feenstra B, Melbye M. Maternal contributions to preterm delivery. *Am J Epidemiol*. 2009 Dec;170(11):1358–64.
 19. Wilcox AJ, Skjaerven R, Lie RT. Familial patterns of preterm delivery: maternal and fetal contributions. *Am J Epidemiol*. 2008 Feb;167(4):474–9.
 20. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins \& Cotran Pathologic Basis of Disease E-Book [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2020. (Robbins Pathology). Available from: <https://books.google.ca/books?id=7WnnDwAAQBAJ>
 21. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Immunology* . 2018. p. 2379. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02379>
 22. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Dec 14;9(6):7204–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29467962>

23. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* [Internet]. 2018 Aug 13;18(4):e27–e27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30181915>
24. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009 Apr;22(2):240–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19366914>
25. Monastero RN, Pentyala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. Li J-D, editor. *Int J Inflam* [Internet]. 2017;2017:4309485. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/4309485>
26. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol* [Internet]. 2013 Jan;50(1):7–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23345459>
27. Dutta S, Sengupta P. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *J Pregnancy*. 2017 Nov 1;1.
28. Behrman RE, Butler AS. Preterm birth: causes, consequences, and prevention. 2007;
29. Simhan HN, Caritis SN. Prevention of preterm delivery. *N Engl J Med*. 2007 Aug;357(5):477–87.
30. Frey HA, Klebanoff MA. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016 Apr;21(2):68–73.
31. Payne MS, Bayatibojakhi S. Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. *Front Immunol*. 2014;5:595.
32. McGaw T. Periodontal Disease and Preterm Delivery of Low-Birth-Weight Infants. *J l'Association Dent Can*. 2002;68(3):165–9.
33. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Oct;213(4 Suppl):S29–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26428501>
34. Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Martinez A, et al. Clinical chorioamnionitis at term I: microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *J Perinat Med* [Internet]. 2015 Jan;43(1):19–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25720095>
35. Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med*

- [Internet]. 2011/09/25. 2012 Feb;17(1):12–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21944863>
36. Pacora P, Chaiworapongsa T, Maymon E, Kim YM, Gomez R, Yoon BH, et al. Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome. *J Matern neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2002 Jan;11(1):18–25.
 37. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2021 Feb 25];11(5):317–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839830>
 38. Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol.* 2012 Sep;95(1–2):1–14.
 39. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1996 Dec;1:d340-57.
 40. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* [Internet]. 1998 Sep 1;334 (Pt 2(Pt 2):297–314. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9716487>
 41. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018;18(12):773–89. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0066-7>
 42. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Sep;6(10):a016295.
 43. Castell J V, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989 Jan;242(2):237–9.
 44. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2012/10/24. 2012;8(9):1237–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23136552>
 45. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric

- Cytokine Family. *Front Immunol.* 2016;7:479.
46. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* 2012;122(4):143–59.
 47. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug;374(Pt 1):1–20.
 48. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797–819.
 49. Murakami M, Kamimura D, Hirano T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity.* 2019 Apr;50(4):812–31.
 50. Wei S-T, Sun Y-H, Zong S-H, Xiang Y-B. Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit [Internet].* 2015 Dec 24;21:4030–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26704133>
 51. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Dec;8(4):241–52.
 52. Reeh H, Rudolph N, Billing U, Christen H, Streif S, Bullinger E, et al. Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. *Cell Commun Signal [Internet].* 2019;17(1):46. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0356-0>
 53. Lee SY, Buhimschi IA, Dulay AT, Ali UA, Zhao G, Abdel-Razeq SS, et al. IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol [Internet].* 2011/01/31. 2011 Mar 1;186(5):3226–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282511>
 54. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2011;1813(5):878–88. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488911000425>
 55. Kishimoto T. IL-6: From its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010;22(5):347–52.
 56. Gao Y, Zhao H, Wang P, Wang J, Zou L. The roles of SOCS3 and STAT3 in bacterial infection and inflammatory diseases. *Scand J Immunol.* 2018 Dec;88(6):e12727.

57. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg R-P, Dorsch M, et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*. 2011 Jun;39(6):1407–13.
58. Silver JS, Hunter CA. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2010 Dec;88(6):1145–56.
59. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, et al. Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. *Ciba Found Symp*. 1992;167:47.
60. Su H, Lei C-T, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Apr 21;8:405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28484449>
61. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol*. 2009 Jan;130(1):27–33.
62. Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Feb 3;185(3):461–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9053446>
63. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May;441(7090):235–8.
64. Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2009 Jan;206(1):69–78.
65. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986 Nov;324(6092):73–6.
66. Morley JJ, Kushner I. SERUM C-REACTIVE PROTEIN LEVELS IN DISEASE*. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1982 Jun 1;389(1):406–18. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb22153.x>
67. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A [Internet]. 1987 Oct;84(20):7251–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2444978>
68. Graeve L, Baumann M, Heinrich PC. Interleukin-6 in autoimmune diseases. *Clin Investig* [Internet]. 1993;71(8):664–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00184499>
 69. Luger TA, Krutmann J, Kirnbauer R, Urbanski A, Schwarz T, Klappacher G, et al. IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J Immunol*. 1989 Aug;143(4):1206–9.
 70. Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* [Internet]. 1988 Sep 1;141(5):1543 LP – 1549. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/141/5/1543.abstract>
 71. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 Feb;320(6):365–76.
 72. Weissmann G, Korchak H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation*. 1984 Jun;8 Suppl:S3-14.
 73. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1830–5.
 74. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):29–39.
 75. Mathur AN, Chang H-C, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*. 2007 Apr;178(8):4901–7.
 76. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.
 77. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity* [Internet]. 2008 Oct 17;29(4):628–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.018>
 78. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2001 Aug;125(2):177–83.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11529906>

79. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Oct 7;196(7):979–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12370259>
80. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(7):717–30.
81. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* [Internet]. 2000;6(5):583–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/75068>
82. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005 Jun;28(3):187–96.
83. Prairie E, Côté F, Tsakpinoglou M, Mina M, Quiniou C, Leimert K, et al. The Determinant Role of IL-6 in the Establishment of Inflammation Leading to Spontaneous Preterm Birth. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2021; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610120302410>
84. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest*. 1990 May;85(5):1392–400.
85. Weiyuan Z, Li W. Study of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in maternal serum and amniotic fluid of patients with premature rupture of membranes. *J Perinat Med*. 1998;26(6):491–4.
86. Rizzo G, Capponi A, Vlachopoulou A, Angelini E, Grassi C, Romanini C. Interleukin-6 concentrations in cervical secretions in the prediction of intrauterine infection in preterm premature rupture of the membranes. *Gynecol Obstet Invest*. 1998 Aug;46(2):91–5.
87. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol*. 2000 Jun;95(6 Pt 2):1056–64.
88. Wei S-Q, Fraser W, Luo Z-C. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2010 Aug;116(2 Pt 1):393–401.

89. Speer EM, Gentile DA, Zeevi A, Pillage G, Huo D, Skoner DP. Role of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in spontaneous preterm delivery. *Hum Immunol*. 2006 Nov;67(11):915–23.
90. Gómez LM, Sammel MD, Appleby DH, Elovitz MA, Baldwin DA, Jeffcoat MK, et al. Evidence of a gene-environment interaction that predisposes to spontaneous preterm birth: a role for asymptomatic bacterial vaginosis and DNA variants in genes that control the inflammatory response. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2010 Apr 1;202(4):386.e1-386.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.042>
91. Härtel C, Finas D, Ahrens P, Kattner E, Schaible T, Müller D, et al. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2004 Dec 1;10(12):911–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/molehr/gah120>
92. Karakaş NM, Ecevit AN, Yalçın Y, Özdemir B, Verdi H, Tekindal MA, et al. Effect of maternal and neonatal interleukin-6 -174 G/C polymorphism on preterm birth and neonatal morbidity. *J Matern neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2018 Apr;31(8):1009–15.
93. Wu W, Clark EAS, Stoddard GJ, Watkins WS, Esplin MS, Manuck TA, et al. Effect of interleukin-6 polymorphism on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. *BMC Genet* [Internet]. 2013 Apr 25;14:30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23617681>
94. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998 Oct;102(7):1369–76.
95. Resch B, Radinger A, Mannhalter C, Horvath B, Binder A, Zenz W, et al. Maternal interleukin-6 (-174) C/C polymorphism is associated with chorioamnionitis and cystic periventricular leucomalacia of the preterm infant. *J Perinatol*. 2010 Nov;30(11):712–6.
96. Reiman M, Kujari H, Ekholm E, Lapinleimu H, Lehtonen L, Haataja L. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. *J Pediatr*. 2008 Jul;153(1):19–24.
97. Djukic M, Gibson CS, Maclennan AH, Goldwater PN, Haan EA, McMichael G, et al.

- Genetic susceptibility to viral exposure may increase the risk of cerebral palsy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009 Jun;49(3):247–53.
98. Menon R, Velez DR, Simhan H, Ryckman K, Jiang L, Thorsen P, et al. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor- α , tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Jun;194(6):1616–24.
 99. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Gonçalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2009 Jun;80(1–2):115–21.
 100. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, Bardy P, et al. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2004;191(6):2056–67. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937804004168>
 101. Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, Philipp K, Tempfer C. Interleukin 6-174 G/C promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1626 pregnant women. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Apr;59(4):347–51.
 102. Pereyra S, Velazquez T, Bertoni B, Sapiro R. Rapid multiplex high resolution melting method to analyze inflammatory related SNPs in preterm birth. *BMC Res Notes* [Internet]. 2012 Jan 26;5:69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22280494>
 103. Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA, Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, et al. IL-1 β , IL-6 promoter, TNF- α promoter and IL-1RA gene polymorphisms and the risk of preterm delivery due to preterm premature rupture of membranes in a population of Polish women. *Arch Med Sci* [Internet]. 2010/09/07. 2010 Apr 30;6(4):125–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173653>
 104. Kalinka J, Bitner A. [Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women]. *Ginekol Pol*. 2009 Feb;80(2):111–7.
 105. Harper M, Zheng SL, Thom E, Klebanoff MA, Thorp Jr J, Sorokin Y, et al. Cytokine gene polymorphisms and length of gestation. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Jan;117(1):125–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173653>
 106. Sugita N, Kobayashi T, Kikuchi A, Shimada Y, Hirano E, Sasahara J, et al.

- Immunoregulatory gene polymorphisms in Japanese women with preterm births and periodontitis. *J Reprod Immunol*. 2012 Mar;93(2):94–101.
107. Hassan MI, Aschner Y, Manning CH, Xu J, Aschner JL. Racial differences in selected cytokine allelic and genotypic frequencies among healthy, pregnant women in North Carolina. *Cytokine*. 2003 Jan;21(1):10–6.
 108. Velez DR, Menon R, Thorsen P, Jiang L, Simhan H, Morgan N, et al. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2007 Sep 1;71(5):586–600. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2007.00352.x>
 109. Leimert KB, Olson DM. Racial disparities in pregnancy outcomes: genetics, epigenetics, and allostatic load. *Curr Opin Physiol* [Internet]. 2020;13:155–65. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468867319301890>
 110. Herrera CA, Stoerker J, Carlquist J, Stoddard GJ, Jackson M, Esplin S, et al. Cell-free DNA, inflammation, and the initiation of spontaneous term labor. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017;217(5):583.e1-583.e8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937817306361>
 111. Bollapragada S, Youssef R, Jordan F, Greer I, Norman J, Nelson S. Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Jan;200(1):104.e1-11.
 112. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*. 2003 Jan;9(1):41–5.
 113. Olson DM, Mijovic JE, Sadowsky DW. Control of human parturition. *Semin Perinatol* [Internet]. 1995;19(1):52–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146000595800476>
 114. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2008;79(1):50–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037808000491>
 115. Fang X, Wong S, Mitchell BF. Effects of LPS and IL-6 on oxytocin receptor in non-

- pregnant and pregnant rat uterus. *Am J Reprod Immunol*. 2000 Aug;44(2):65–72.
116. Lye SJ. The Initiation and Inhibition of Labor - Toward a Molecular Understanding. *Semin Reprod Med*. 1994;12(04):284–97.
 117. Gibb W, Challis JRG. Mechanisms of term and preterm birth. *J Obstet Gynaecol Canada JOGC = J d'obstetrique Gynecol du Canada JOGC*. 2002 Nov;24(11):874–83.
 118. Slater DM, Dennes WJB, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclooxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1999 Sep 1;5(9):880–4. Available from: <https://doi.org/10.1093/molehr/5.9.880>
 119. Hirst JJ, Mijovic JE, Zakar T, Olson DM. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 mRNA levels and enzyme activity in human decidua at term labor. *J Soc Gynecol Investig*. 1998;5(1):13–20.
 120. Mijovic JE, Zakar T, Nairn TK, Olson DM. Prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 expression and activity increases with term labor in human chorion. *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 1):E832-40.
 121. Toda A, Sawada K, Fujikawa T, Wakabayashi A, Nakamura K, Sawada I, et al. Targeting Inhibitor of κ B Kinase β ; Prevents Inflammation-Induced Preterm Delivery by Inhibiting IL-6 Production from Amniotic Cells. *Am J Pathol* [Internet]. 2016 Mar 1;186(3):616–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.004>
 122. Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin (IL)-6 and IL-8 Production by Human Amnion: Regulation by Cytokines, Growth Factors, Glucocorticoids, Phorbol Esters, and Bacterial Lipopolysaccharide. *Biol Reprod* [Internet]. 1997 Dec 1;57(6):1438–44. Available from: <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1438>
 123. Wakabayashi A, Sawada K, Nakayama M, Toda A, Kimoto A, Mabuchi S, et al. Targeting interleukin-6 receptor inhibits preterm delivery induced by inflammation. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2013 Aug 22;19(11):718–26. Available from: <https://doi.org/10.1093/molehr/gat057>
 124. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol*. 1991 Jan;192(1):189–91.

125. Zaragoza DB, Wilson RR, Mitchell BF, Olson DM. The interleukin 1beta-induced expression of human prostaglandin F2alpha receptor messenger RNA in human myometrial-derived ULTR cells requires the transcription factor, NFkappaB. *Biol Reprod*. 2006 Nov;75(5):697–704.
126. Robertson SA, Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM, et al. Interleukin-6 Is an Essential Determinant of On-Time Parturition in the Mouse. *Endocrinology* [Internet]. 2010 Aug 1;151(8):3996–4006. Available from: <https://doi.org/10.1210/en.2010-0063>
127. Rauk PN, Friebe-Hoffmann U, Winebrenner LD, Chiao JP. Interleukin-6 up-regulates the oxytocin receptor in cultured uterine smooth muscle cells. *Am J Reprod Immunol*. 2001 Mar;45(3):148–53.
128. McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* [Internet]. 1995;1(5):460–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm0595-460>
129. Wadhwa PD, Porto M, Garite TJ, Chiciz-DeMet A, Sandman CA. Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2020 May 27];179(4):1079–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937898702194>
130. Papatheodorou DC, Karagiannidis LK, Paltoglou G, Margeli A, Kaparos G, Valsamakis G, et al. Pulsatile Interleukin-6 Leads CRH Secretion and Is Associated With Myometrial Contractility During the Active Phase of Term Human Labor. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Oct 1;98(10):4105–12. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4023>
131. Menon R, Taylor BD. Exploring Inflammatory Mediators in Fetal and Maternal Compartments During Human Parturition. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2019;134(4). Available from: https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2019/10000/Exploring_Inflammatory_Mediators_in_Fetal_and.16.aspx
132. Rinaldi SF, Makieva S, Frew L, Wade J, Thomson AJW, Moran CM, et al. Ultrasound-guided intrauterine injection of lipopolysaccharide as a novel model of preterm birth in

- the mouse. *Am J Pathol*. 2015 May;185(5):1201–6.
133. McCarthy R, Martin-Fairey C, Sojka DK, Herzog ED, Jungheim ES, Stout MJ, et al. Mouse models of preterm birth: suggested assessment and reporting guidelines. *Biol Reprod* [Internet]. 2018 Nov 1;99(5):922–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29733339>
 134. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Dec;195(6):1578–89.
 135. Nadeau-Vallee M, Chin P-Y, Belarbi L, Brien M-E, Pundir S, Berryer MH, et al. Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. *J Immunol*. 2017 Mar;198(5):2047–62.
 136. Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Docheva N, Dong Z, Kim CJ, et al. CXCL10 and IL-6: Markers of two different forms of intra-amniotic inflammation in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2017 Jul 1;78(1):e12685. Available from: <https://doi.org/10.1111/aji.12685>
 137. Salminen A, Paananen R, Vuolteenaho R, Metsola J, Ojaniemi M, Autio-Harmainen H, et al. Maternal Endotoxin-Induced Preterm Birth in Mice: Fetal Responses in Toll-Like Receptors, Collectins, and Cytokines. *Pediatr Res* [Internet]. 2008;63(3):280–6. Available from: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318163a8b2>
 138. Jarocki S, Redźko S, Przepieść J, Urban J. [Maternal serum Th1 and Th2 cytokines in preterm and term delivery]. *Ginekol Pol*. 2007 Apr;78(4):284–7.
 139. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Mazor M, et al. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2006 Aug;195(2):394.e1-394.24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16890549>
 140. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2006 Dec 1;113(s3):17–42. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x>
 141. Galinsky R, Polglase GR, Hooper SB, Black MJ, Moss TJM. The consequences of

- chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. *J Pregnancy* [Internet]. 2013/03/07. 2013;2013:412831. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533760>
142. Öz M, Polat B, Özgü E, Seçkin KD, Taşın C, Danişman N. Interleukin-6 and C-reactive protein levels in the amniotic fluid as indicators of preterm delivery in Turkish women. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2015;42(6):801–4.
143. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC, Mercer B, Iams J, et al. The Preterm Prediction Study: Association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2020 May 30];184(3):483–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937801183766>
144. Dulay AT, Buhimschi IA, Zhao G, Bahtiyar MO, Thung SF, Cackovic M, et al. Compartmentalization of acute phase reactants Interleukin-6, C-Reactive Protein and Procalcitonin as biomarkers of intra-amniotic infection and chorioamnionitis. *Cytokine* [Internet]. 2015;76(2):236–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466615001659>
145. Romero R, Yoon BH, Kenney JS, Gomez R, Allison AC, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin-6 determinations are of diagnostic and prognostic value in preterm labor. *Am J Reprod Immunol*. 1993;30(2–3):167–83.
146. Cox SM, Casey ML, MacDonald PC. Accumulation of interleukin-1 β and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Hum Reprod Update* [Internet]. 1997 Sep 1;3(5):517–27. Available from: <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.517>
147. Yoon BH, Romero R, Moon J, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Kim YM, et al. Differences in the fetal interleukin-6 response to microbial invasion of the amniotic cavity between term and preterm gestation. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2003 Jan 1;13(1):32–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/jmf.13.1.32.38>
148. Holst R-M, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm U-B, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2005 Jan 1;84(6):551–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/j.0001->

6349.2005.00708.x

149. Holst R-M, Laurini R, Jacobsson B, Samuelsson E, Sävman K, Doverhag C, et al. Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: Relationship to histological chorioamnionitis. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2007 Jan 1;20(12):885–93. Available from: <https://doi.org/10.1080/14767050701752601>
150. Marconi C, de Andrade Ramos BR, Peraçoli JC, Donders GGG, da Silva MG. Amniotic Fluid Interleukin-1 Beta and Interleukin-6, but not Interleukin-8 Correlate with Microbial Invasion of the Amniotic Cavity in Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2011 Jun 1;65(6):549–56. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00940.x>
151. Romero R, Kadar N, Miranda J, Korzeniewski SJ, Schwartz AG, Chaemsaihong P, et al. The diagnostic performance of the Mass Restricted (MR) score in the identification of microbial invasion of the amniotic cavity or intra-amniotic inflammation is not superior to amniotic fluid interleukin-6. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2014 May 1;27(8):757–69. Available from: <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.844123>
152. Chaemsaihong P, Romero R, Korzeniewski SJ, Martinez-Varea A, Dong Z, Yoon BH, et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2016 Feb 1;29(3):360–7. Available from: <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1006621>
153. Combs A, Garite TJ, Lapidus J. 14: Amniotic fluid glucose and interleukin-6 as independent markers of intraamniotic infection in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Jan 1;216(1):S10–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.904>
154. Kim A, Lee ES, Shin JC, Kim HY. Identification of biomarkers for preterm delivery in mid-trimester amniotic fluid. *Placenta*. 2013 Oct;34(10):873–8.
155. Amabebe E, Reynolds S, He X, Wood R, Stern V, Anumba DOC. Infection/inflammation-associated preterm delivery within 14 days of presentation with symptoms of preterm labour: A multivariate predictive model. *PLoS One* [Internet]. 2019 Sep 12;14(9):e0222455–e0222455. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31513646>

156. Akkaya Fırat A, Alıcı Davutoğlu E, Özel A, Güngör ZB, Madazlı R, Ulakoğlu Zengin E. Hypoxia-inducible factor-1 α , hepcidin and interleukin-6 levels in pregnancies with preterm labour. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol*. 2019 Dec;1–7.
157. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2020 Jun 1];24(1):25–9. Available from: [https://www.cell.com/trends/immunology/comments/S1471-4906\(02\)00013-3#](https://www.cell.com/trends/immunology/comments/S1471-4906(02)00013-3#)
158. Castillo-Castrejon M, Meraz-Cruz N, Gomez-Lopez N, Flores-Pliego A, Beltrán-Montoya J, Viveros-Alcaráz M, et al. Chorionic decidua cells from term human pregnancies show distinctive functional properties related to the induction of labor. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2013/11/29. 2014 Jan;71(1):86–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286217>
159. Gomez-Lopez N, Vega-Sanchez R, Castillo-Castrejon M, Romero R, Cubeiro-Arreola K, Vadillo-Ortega F. Evidence for a role for the adaptive immune response in human term parturition. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Mar;69(3):212–30.
160. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J Leukoc Biol*. 2010 Oct;88(4):625–33.
161. Miller D, Gershater M, Slutsky R, Romero R, Gomez-Lopez N. Maternal and fetal T cells in term pregnancy and preterm labor. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(7):693–704. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0471-2>
162. Gomez-Lopez N, Arenas-Hernandez M, Romero R, Miller D, Garcia-Flores V, Leng Y, et al. Regulatory T Cells Play a Role in a Subset of Idiopathic Preterm Labor/Birth and Adverse Neonatal Outcomes. *Cell Rep* [Internet]. 2020;32(1):107874. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221112472030855X>
163. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2014/06/23. 2014 Nov;11(6):571–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24954221>
164. Gomez-Lopez N, Estrada-Gutierrez G, Jimenez-Zamudio L, Vega-Sanchez R, Vadillo-Ortega F. Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2009;80(1):122–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037809000485>

165. Steel JH, O'donoghue K, Kennea NL, Sullivan MHF, Edwards AD. Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation. *Placenta*. 2005;26(8–9):672–7.
166. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:387–411.
167. Presicce P, Park C-W, Senthamaraikannan P, Bhattacharyya S, Jackson C, Kong F, et al. IL-1 signaling mediates intrauterine inflammation and chorio-decidua neutrophil recruitment and activation. *JCI insight*. 2018 Mar;3(6).
168. Cappelletti M, Presicce P, Kallapur SG. Immunobiology of Acute Chorioamnionitis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Apr 16;11:649. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32373122>
169. Filipovich Y, Agrawal V, Crawford SE, Fitchev P, Qu X, Klein J, et al. Depletion of polymorphonuclear leukocytes has no effect on preterm delivery in a mouse model of Escherichia coli-induced labor. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2020 Jun 1];213(5):697.e1-697.e10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937815007759>
170. Timmons BC, Mahendroo MS. Timing of neutrophil activation and expression of proinflammatory markers do not support a role for neutrophils in cervical ripening in the mouse. *Biol Reprod*. 2006 Feb;74(2):236–45.
171. Rinaldi SF, Catalano RD, Wade J, Rossi AG, Norman JE. Decidual Neutrophil Infiltration Is Not Required for Preterm Birth in a Mouse Model of Infection-Induced Preterm Labor. *J Immunol* [Internet]. 2014 Mar 1;192(5):2315 LP – 2325. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/192/5/2315.abstract>
172. Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest*. 1997 Dec;100(11):2752–6.
173. Coletta I, Soldo L, Polentarutti N, Mancini F, Guglielmotti A, Pinza M, et al. Selective induction of MCP-1 in human mesangial cells by the IL-6/sIL-6R complex. *Exp Nephrol*. 2000;8(1):37–43.
174. Spörri B, Müller KM, Wiesmann U, Bickel M. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int*

- Immunol [Internet]. 1999 Jul 1;11(7):1053–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/intimm/11.7.1053>
175. Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, et al. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*. 1998 Jan;91(1):258–65.
176. Zegeye MM, Lindkvist M, Fälker K, Kumawat AK, Paramel G, Grenegård M, et al. Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2018;16(1):55. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0268-4>
177. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, et al. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*. 2007 Sep;110(6):1748–55.
178. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2020 Jun 2];6(3):315–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761300803349>
179. Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, Yoo W, Dong Z, Topping V, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2010 Jul;23(7):1000–11.
180. Yamashiro S, Kamohara H, Yoshimura T. MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF-alpha plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. *J Leukoc Biol*. 1999 May;65(5):671–9.
181. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001 Jun;14(6):705–14.
182. Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, et al. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*. 2001 Sep;167(6):3435–42.

183. McLoughlin RM, Hurst SM, Nowell MA, Harris DA, Horiuchi S, Morgan LW, et al. Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Immunol*. 2004 May;172(9):5676–83.
184. Gomez-Lopez N, Romero R, Leng Y, Xu Y, Slutsky R, Levenson D, et al. The origin of amniotic fluid monocytes/macrophages in women with intra-amniotic inflammation or infection. *J Perinat Med* [Internet]. 2019;47(8):822–40. Available from: <https://www.degruyter.com/view/journals/jpme/47/8/article-p822.xml>
185. Reyes L, Wolfe B, Golos T. Hofbauer Cells: Placental Macrophages of Fetal Origin. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:45–60.
186. Yao Y, Xu X-H, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Apr 15;10:792. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31037072>
187. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2009 Oct;82(1):24–31.
188. Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, Shynlova O, Tower CL, Garrod A, et al. Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor. *Biol Reprod*. 2012 Feb;86(2):39.
189. Yellon SM, Greaves E, Heuerman AC, Dobyns AE, Norman JE. Effects of macrophage depletion on characteristics of cervix remodeling and pregnancy in CD11b-dtr mice. *Biol Reprod* [Internet]. 2019 Jan 9;100(5):1386–94. Available from: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox002>
190. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2017 Feb 10;79(1):541–66. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
191. Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2019;67(5):295–309. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00552-7>
192. Young OM, Tang Z, Niven-Fairchild T, Tadesse S, Krikun G, Norwitz ER, et al. Toll-like Receptor-Mediated Responses by Placental Hofbauer Cells (HBCs): A Potential Pro-Inflammatory Role for Fetal M2 Macrophages. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2015

- Jan 1;73(1):22–35. Available from: <https://doi.org/10.1111/aji.12336>
193. Schliefssteiner C, Ibesich S, Wadsack C. Placental Hofbauer Cell Polarization Resists Inflammatory Cues In Vitro. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jan 22 [cited 2020 Jun 9];21(3):736. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/736>
 194. Pavlov O, Pavlova O, Ailamazyan E, Selkov S. ORIGINAL ARTICLE: Characterization of Cytokine Production by Human Term Placenta Macrophages In Vitro. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2008 Dec 1;60(6):556–67. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00657.x>
 195. Hetherington CM, Humber DP. The effect of pregnancy on lymph node weight in the mouse. *J Immunogenet*. 1977 Aug;4(4):271–6.
 196. Xu Y, Tarquini F, Romero R, Kim CJ, Tarca AL, Bhatti G, et al. Peripheral CD300a+CD8+ T lymphocytes with a distinct cytotoxic molecular signature increase in pregnant women with chronic chorioamnionitis. *Am J Reprod Immunol*. 2012 Mar;67(3):184–97.
 197. Weissenbach M, Clahsen T, Weber C, Spitzer D, Wirth D, Vestweber D, et al. Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur J Immunol*. 2004 Oct;34(10):2895–906.
 198. Gagnon J, Ramanathan S, Leblanc C, Cloutier A, McDonald PP, Ilangumaran S. IL-6, in Synergy with IL-7 or IL-15, Stimulates TCR-Independent Proliferation and Functional Differentiation of CD8⁺ T Lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 2008 Jun 15;180(12):7958 LP – 7968. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/180/12/7958.abstract>
 199. Gomez-Lopez N, Olson DM, Robertson SA. Interleukin-6 controls uterine Th9 cells and CD8(+) T regulatory cells to accelerate parturition in mice. *Immunol Cell Biol*. 2016 Jan;94(1):79–89.
 200. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2012/06/07. 2012;2012:967629. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22719180>
 201. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol*. 2002;21(6):471–95.
 202. Hohki S, Ohguro N, Haruta H, Nakai K, Terabe F, Serada S, et al. Blockade of

- interleukin-6 signaling suppresses experimental autoimmune uveoretinitis by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Exp Eye Res.* 2010 Aug;91(2):162–70.
203. Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology* [Internet]. 2016 May 1;148(1):13–21. Available from: <https://doi.org/10.1111/imm.12595>
204. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004 Mar;5(3):266–71.
205. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, Way SS. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* [Internet]. 2012/09/26. 2012 Oct 4;490(7418):102–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23023128>
206. Rito DC, Viehl LT, Buchanan PM, Haridas S, Koenig JM. Augmented Th17-type immune responses in preterm neonates exposed to histologic chorioamnionitis. *Pediatr Res* [Internet]. 2016/11/21. 2017 Apr;81(4):639–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27870827>
207. Cua DJ, Kastelein RA. TGF- β , a “double agent” in the immune pathology war. *Nat Immunol* [Internet]. 2006;7(6):557–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni0606-557>
208. Fujimoto M, Serada S, Mihara M, Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, et al. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum* [Internet]. 58(12):3710–9. Available from: <https://facultyopinions.com/1145177>
209. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008/06/24. 2008 Jul 1;105(26):9041–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18577591>
210. McGeachy MJ, McSorley SJ. Microbial-induced Th17: superhero or supervillain? *J Immunol* [Internet]. 2012 Oct 1;189(7):3285–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22997231>
211. Shaw MH, Kamada N, Kim Y-G, Núñez G. Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med* [Internet]. 2012/01/30. 2012 Feb 13;209(2):251–8. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22291094>

212. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev.* 2007 Dec;65(12 Pt 2):S194-202.
213. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RA de A, Severino VO, Rocha LP, Monteiro MLGDR, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2018 May;31(9):1227–33.
214. Chiesa C, Pacifico L, Natale F, Hofer N, Osborn JF, Resch B. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine.* 2015 Nov;76(1):1–12.
215. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* [Internet]. 2014/08/14. 2014 Aug 15;345(6198):760–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124429>
216. Moutquin J-M, Milot-Roy V, Irion O. Preterm Birth Prevention: Effectiveness of Current Strategies. *J SOGC.* 1996;18(6):571–88.
217. Haas, D. Benjamin, T. Sawyer, R. Quinney S. Short-term tocolytics for preterm delivery - current perspectives. *Int J womens Heal.* 2014;(6):343–9.
218. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic indomethacin for preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2003 Nov;88(6):F464–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14602691>
219. Peruzzi L, Gianoglio B, Porcellini MG, Coppo R. Neonatal end-stage renal failure associated with maternal ingestion of cyclo-oxygenase-type-1 selective inhibitor nimesulide as tocolytic. Vol. 354, *Lancet* (London, England). England; 1999. p. 1615.
220. Mersal A, Attili I, Alkhotani A. Severe neonatal pulmonary hypertension secondary to antenatal maternal diclofenac ingestion reversed by inhaled nitric oxide and oral sildenafil. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2007;27(6):448–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059116>
221. Boyle AK, Rinaldi SF, Norman JE, Stock SJ. Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies. *J Reprod Immunol.* 2017 Feb;119:62–6.
222. Sykes L, Bennett PR. Efficacy of progesterone for prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2018;52:126–36. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693418301792>

223. O'Brien JM, Lewis DF. Prevention of preterm birth with vaginal progesterone or 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate: a critical examination of efficacy and safety. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jan;214(1):45–56.
224. Norman JE, Marlow N, Messow C-M, Shennan A, Bennett PR, Thornton S, et al. Vaginal progesterone prophylaxis for preterm birth (the OPPTIMUM study): a multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2016 May 21 [cited 2020 Oct 11];387(10033):2106–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921136>
225. Blackwell SC, Gyamfi-Bannerman C, Biggio JRJ, Chauhan SP, Hughes BL, Louis JM, et al. 17-OHPC to Prevent Recurrent Preterm Birth in Singleton Gestations (PROLONG Study): A Multicenter, International, Randomized Double-Blind Trial. *Am J Perinatol*. 2020 Jan;37(2):127–36.
226. Stinson LF, Ireland DJ, Kemp MW, Payne MS, Stock SJ, Newnham JP, et al. Effects of cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs on inflammatory activation in ex vivo human and ovine fetal membranes. *REPRODUCTION* [Internet]. 2014;147(3):313–20. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/147/3/313.xml>
227. Ng PY, Ireland DJ, Keelan JA. Drugs to block cytokine signaling for the prevention and treatment of inflammation-induced preterm birth. *Front Immunol*. 2015;6:166.
228. Tanaka T, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(1):88–96. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532314000104>
229. Carbone G, Wilson A, Diehl SA, Bunn J, Cooper SM, Rincon M. Interleukin-6 receptor blockade selectively reduces IL-21 production by CD4 T cells and IgG4 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2013/03/07. 2013;9(3):279–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23493630>
230. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet (London, England)*. 2008 Mar;371(9617):998–1006.

231. Katsume A, Saito H, Yamada Y, Yorozu K, Ueda O, Akamatsu K, et al. Anti-interleukin 6 (IL-6) receptor antibody suppresses Castleman's disease like symptoms emerged in IL-6 transgenic mice. *Cytokine*. 2002 Dec;20(6):304–11.
232. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2004;13(5):339–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15230289>
233. Denton CP, Ong VH, Xu S, Chen-Harris H, Modrusan Z, Lafyatis R, et al. Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the faSScinate clinical trial in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2018 Sep 1;77(9):1362 LP – 1371. Available from: <http://ard.bmj.com/content/77/9/1362.abstract>
234. Okiyama N, Sugihara T, Iwakura Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H. Therapeutic effects of interleukin-6 blockade in a murine model of polymyositis that does not require interleukin-17A. *Arthritis Rheum*. 2009 Aug;60(8):2505–12.
235. Araki M, Aranami T, Matsuoka T, Nakamura M, Miyake S, Yamamura T. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheumatol*. 2013 Jul;23(4):827–31.
236. Elkayam O, Jiries N, Dranitzki Z, Kivity S, Lidar M, Levy O, et al. Tocilizumab in Adult-onset Still's Disease: the Israeli Experience. *J Rheumatol* [Internet]. 2014 Jan 15;jrheum.130881. Available from: <http://www.jrheum.org/content/early/2014/01/14/jrheum.130881.abstract>
237. Hoeltzenbein M, Beck E, Rajwanshi R, Gøtestam Skorpen C, Berber E, Schaefer C, et al. Tocilizumab use in pregnancy: Analysis of a global safety database including data from clinical trials and post-marketing data. *Semin Arthritis Rheum*. 2016 Oct;46(2):238–45.
238. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* [Internet]. 2017 Nov;77(17):1865–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29094311>
239. Karkhur S, Hasanreisoglu M, Vigil E, Halim MS, Hassan M, Plaza C, et al. Interleukin-6 inhibition in the management of non-infectious uveitis and beyond. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2019;9(1).
240. Dhillon S. Intravenous tocilizumab: a review of its use in adults with rheumatoid arthritis.

- BioDrugs. 2014 Feb;28(1):75–106.
241. Jones G, Ding C. Tocilizumab: a review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* [Internet]. 2010 Dec 19;3:81–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21234291>
 242. Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, Conrad C, Tran F, Höper H, et al. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Dec 17];160(7):2354-2366.e11. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(21\)00467-4/fulltext#](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(21)00467-4/fulltext#)
 243. Deisseroth A, Ko C-W, Nie L, Zirkelbach JF, Zhao L, Bullock J, et al. FDA approval: siltuximab for the treatment of patients with multicentric Castleman disease. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Mar;21(5):950–4.
 244. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: Recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:75–82.
 245. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* [Internet]. 2016;64(6):1403–15. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816000830>
 246. Kretsos K, Jullion A, Zamacona M, Harari O, Shaw S, Boulanger B, et al. Model-Based Optimal Design and Execution of the First-Inpatient Trial of the Anti-IL-6, Olokizumab. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* [Internet]. 2014 Jun 1;3(6):119. Available from: <https://doi.org/10.1038/psp.2014.17>
 247. Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD, et al. THG113: A novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2020 Apr 28];26(6):389–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0146000502800611>
 248. Quiniou C, Sapiha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, et al. Development of a Novel Noncompetitive Antagonist of IL-1 Receptor. *J Immunol* [Internet]. 2008 May 15;180(10):6977 LP – 6987. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/180/10/6977.abstract>
 249. Kumar J, Sim V. D-amino acid-based peptide inhibitors as early or preventative therapy in Alzheimer disease. *Prion*. 2014;8(1):119–24.

250. Pan H, Deutsch GH, Wert SE, Ambalavanan N, Ansong C, Ardini-Poleske ME, et al. Comprehensive anatomic ontologies for lung development: A comparison of alveolar formation and maturation within mouse and human lung. *J Biomed Semantics* [Internet]. 2019;10(1):18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13326-019-0209-1>
251. Beaudry-Richard A, Nadeau-Vallée M, Prairie É, Maurice N, Heckel É, Nezhady M, et al. Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Aug 8;8(1):11875. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30089839>
252. Vannuccini S, Petraglia F. Endocrinology of Delivery. In: Huhtaniemi I, Martini LBT-E of ED (Second E, editors. Oxford: Academic Press; 2019. p. 425–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012801238364357X>
253. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Jan 15;101(2):311–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435302>
254. Luttkicken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*. 1994 Jan;263(5143):89–92.
255. Zhong Z, Wen Z, Darnell JEJ. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994 Apr;264(5155):95–8.
256. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*. 2007 Mar;282(13):9358–63.
257. Kameyama H, Kudoh S, Hatakeyama J, Matuo A, Ito T. Significance of Stat3 Signaling in Epithelial Cell Differentiation of Fetal Mouse Lungs. *Acta Histochem Cytochem* [Internet]. 2017/02/23. 2017 Feb 28;50(1):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386145>
258. Yan Y, Bian W, Xie Z, Cao X, Le Roux I, Guillemot F, et al. Stat3 signaling is present and active during development of the central nervous system and eye of vertebrates. *Dev Dyn*. 2004 Oct;231(2):248–57.

259. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1263–84.
260. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol*. 2010 Jun;184(12):7219–28.
261. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1823(12):2168–78.
262. Tudor RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc* [Internet]. 2006 Aug;3(6):503–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921129>
263. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007 Sep;50(3):652–83.
264. von Bismarck P, Claass A, Schickor C, Krause MF, Rose-John S. ALTERED PULMONARY INTERLEUKIN-6 SIGNALING IN PRETERM INFANTS DEVELOPING BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA. *Exp Lung Res* [Internet]. 2008 Jan 1;34(10):694–706. Available from: <https://doi.org/10.1080/01902140802389693>
265. Ambalavanan N, Carlo WA, D’Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* [Internet]. 2009 Apr;123(4):1132–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19336372>
266. Been J V., Rours IG, Kornelisse RF, Jonkers F, de Krijger RR, Zimmermann LJ. Chorioamnionitis Alters the Response to Surfactant in Preterm Infants. *J Pediatr*. 2010;156(1).
267. Yoon BH, Romero R, Kim KS, Park JS, Ki SH, Kim B, et al. A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(4):773–9.
268. Holman RC, Stoll BJ, Curns AT, Yorita KL, Steiner CA, Schonberger LB. Necrotising

- enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006;20(6):498–506.
269. Szpecht D, Neumann-Klimasińska N, Błaszczyszki M, Seremak-Mrozikiewicz A, Kurzawińska G, Cygan D, et al. Candidate gene analysis in pathogenesis of surgically and non-surgically treated necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Mol Cell Biochem.* 2018;439(1–2):53–63.
270. Cakir U, Tayman C, Serkant U, Yakut HI, Cakir E, Ates U, et al. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) for the treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *J Ethnopharmacol.* 2018;225(May):297–308.
271. Wisgrill L, Weinhandl A, Unterasinger L, Amann G, Oehler R, Metzelder ML, et al. Interleukin-6 serum levels predict surgical intervention in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2019;54(3):449–54.
272. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci [Internet].* 2020;27(1):1. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
273. Gokhale AS, Satyanarayanajois S. Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy.* 2014;6(6):755–74.
274. Geranurimi A, Cheng CWH, Quiniou C, Zhu T, Hou X, Rivera JC, et al. Probing Anti-inflammatory Properties Independent of NF- κ B Through Conformational Constraint of Peptide-Based Interleukin-1 Receptor Biased Ligands. *Front Chem [Internet].* 2019 Feb 13;7:23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30815434>
275. Nadeau-Vallee M, Quiniou C, Palacios J, Hou X, Erfani A, Madaan A, et al. Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth. *J Immunol.* 2015 Oct;195(7):3402–15.
276. Sayah DN, Zhou TE, Omri S, Mazzaferri J, Quiniou C, Wirth M, et al. Novel Anti-Interleukin-1 β Therapy Preserves Retinal Integrity: A Longitudinal Investigation Using OCT Imaging and Automated Retinal Segmentation in Small Rodents [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. 2020. p. 296. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00296>
277. Nadeau-Vallée M, Quiniou C, Palacios J, Hou X, Erfani A, Madaan A, et al. Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-

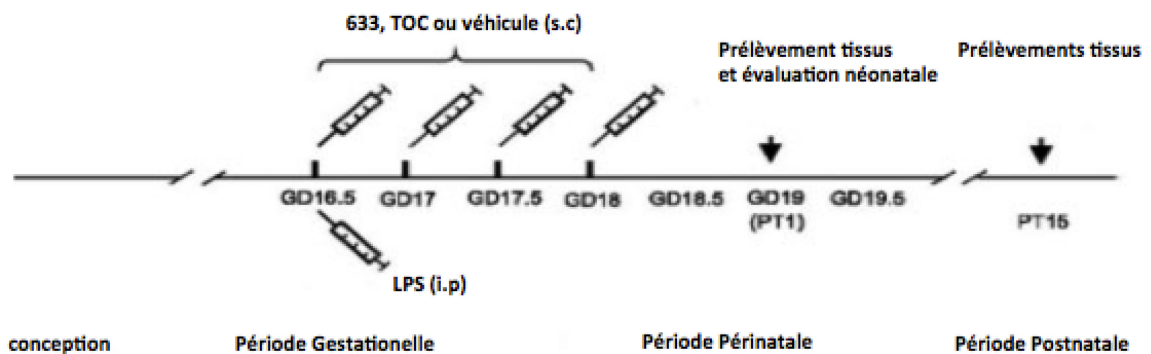
Induced Preterm Birth. *J Immunol* [Internet]. 2015 Aug 24;1500758. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/early/2015/08/21/jimmunol.1500758.abstract>

278. Quiniou C, Kooli E, Joyal J-S, Sapieha P, Sennlaub F, Lahaie I, et al. Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor. *Semin Perinatol*. 2008 Oct;32(5):325–33.

9 Annexe

9.1 Figure supplémentaire

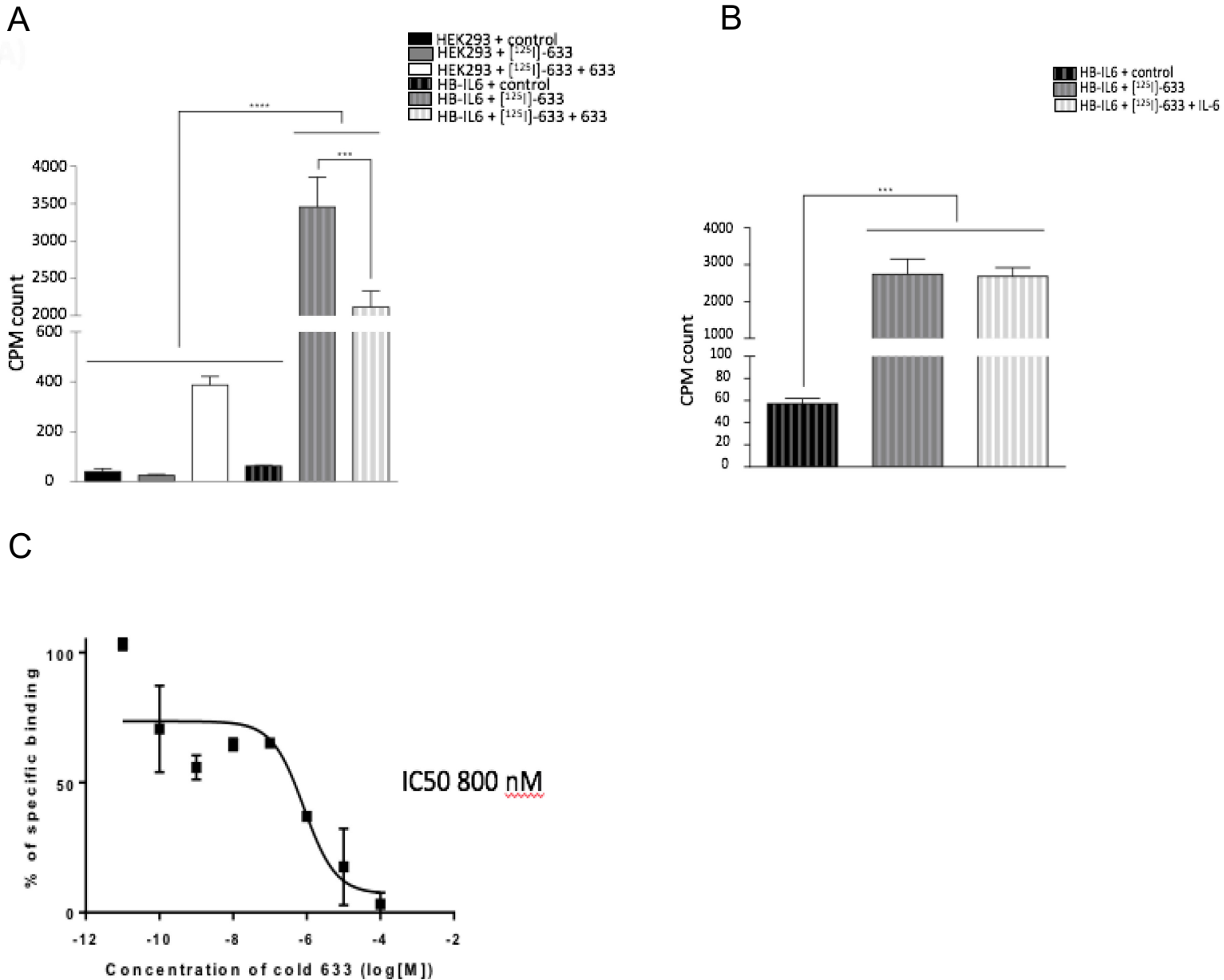
Figure 9.1 Échéancier du modèle de naissance prématurée



Échéancier détaillé du protocole des différents traitements et prélèvements chez la souris gestante et sa progéniture. 633 (1mg/kg par 12h), TOC (10mg/kg par 12h) ou véhicule ont été administrés sous-cutané durant 2 jours consécutifs, soit aux 12 heures jusqu'au GD18.5 et LPS (10mg/kg) a été administré intrapéritonéalement au GD16.5.

9.2 Données préliminaires

Figure 9.2 633 se lie spécifiquement sur le récepteur de l'IL6 dans les cellules HEK-IL-6R



Une réaction de Bolton-Hunter a été faite afin de vérifier la conjugaison de résidus de type tyrosine à des amines primaires en suivant les instructions du fabricant (n. 27712, Thermo Scientific, Rockford, États-Unis). En bref, le peptide a été dissous dans du tampon modifié (pH 9,0), puis 100 μ l de réactif Bolton-Hunter a été ajouté et la solution a été incubé durant 3 heures. Après incubation, la solution a été dialysée en utilisant le kit de

dialyse PlusOne Mini (GE Healthcare, Piscataway, États-Unis) avec du PBS. Ensuite, 25 µl de peptide, 80 µl de PBS et 25 µl de I125 ont été ajoutés, puis laisser la solution a reposé pendant 15 min. Suite à cela, la réaction a été arrêtée et le mélange a été collecté dans des colonnes de centrifugation C-18 (Thermo scientific, Rockford, USA) pour effectuer des lavages et afin de collecter le peptide marqué à l'iode. Des mesures de radioactivité ont été effectuées pour chaque lot de peptide radioactif en utilisant un compteur gamma (compteur gamma automatique Packard Cobra-II).

Les cellules ont été laissées durant deux passages pour compléter la stabilisation du récepteur sur les cellules HEK-blue IL-6. Avant l'expérience, les milieux ont été modifiés pour permettre une quantité maximale de 500 µl par puits. Ensuite, du HSJ633 froid (10⁻⁴ M) a été ajouté puis les solutions ont reposées afin d'atteindre l'équilibre durant 15 minutes. Ensuite, les cellules ont été traitées avec les HSJ633 marqués (633*) en une quantité permettant d'ajouter 50 000 comptages de CPM par puits et nous avons laissé le mélange reposer pour atteindre l'équilibre en incubant pendant 1,5 heure à température ambiante et en mélangeant de façon constante. Après l'incubation, le milieu a été retiré et 3 lavages avec du PBS ont été effectués. Ensuite, les cellules ont été collectées en ajoutant une solution de NaOH à 1% + Triton X à 1% et recueillies dans des tubes de verre. Tous les échantillons ont été mesurés à l'aide d'un compteur Gamma (compteur gamma automatique Packard Cobra-II).