

Université de Sherbrooke

Étude de l'équilibre entre les voies métaboliques de l'acide arachidonique dans le myomètre de femmes enceintes à terme.

Par Stéphanie Corriveau

Département de physiologie et biophysique

Département d'obstétrique et gynécologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Février 2011

Membres du jury

Dr Louis Gendron : Directeur du programme

Dr Guylain Boissonneault : Examineur externe

Dr Éric Rousseau : Co-directeur de recherche

Dr Jean-Charles Pasquier : Co-directeur de recherche

©Stéphanie Corriveau / 2011



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-90981-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-90981-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Table des matières

Table des matières	I
Liste des tableaux et figures	III
Liste des symboles et abréviations	V
RÉSUMÉ	VII
INTRODUCTION	
La prématurité	1
De la physiologie à la pathophysiologie de l'accouchement	2
Vision moderne de la prématurité	3
Utérus en fin de grossesse, contraction et relaxation utérine	4
Les tocolytiques comme traitement du travail préterme	9
Les dérivées de l'acide arachidonique	1†
Contexte et but du projet de recherche	14
RÉSULTATS	
Article 1	16
<i>Why eicosanoids could represent a new class of tocolytics on uterine activity in pregnant women</i> Corriveau S., Berthiaume M., Rousseau E. & Pasquier J-C. AJOG, publié octobre 2009	
Introduction	19
Study design	21
Results	24
Comment	29
References	32

Article 2	34
-----------	----

Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors reveal a complementary role of arachidonic acid derivatives
Corriveau S., Berthiaume M., Rousseau E. & Pasquier J-C.
AJOG, publié septembre 2010

Introduction	37
Study design	39
Results	41
Comment	48
References	51

DISCUSSION GÉNÉRALE

Résumé des résultats principaux de l'étude	55
Pertinence du modèle <i>in vitro</i>	56
Population à l'étude	59
Détection des enzymes de la cascade de l'acide arachidonique	60
Effet tocolytique des eicosanoïdes exogènes	62
Effet tocolytique des eicosanoïdes endogènes	63
Équilibre cinétique des voies métaboliques de l'acide arachidonique	66

CONCLUSIONS	70
--------------------	----

PERSPECTIVES	71
---------------------	----

REMERCIEMENTS	72
----------------------	----

ANNEXES	73
----------------	----

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES	74
-----------------------------	----

Liste des tableaux et des figures

Introduction

Figure 1. Les précurseurs obstétricaux des naissances prématurées.	2
Figure 2. Représentation schématique des étapes essentielles de l'accouchement.	3
Figure 3. Vision moderne de la prématurité.	4
Figure 4. Modèle proposé des différents stimuli sur le myomètre et le col durant la grossesse.	5
Figure 5. Couplage pharmaco-mécanique menant à la modulation de la contraction ou relaxation utérine.	8
Figure 6. Voies métaboliques de l'acide arachidonique.	12

Article 1

Tableau 1 : Données démographiques des patientes incluent dans l'étude.	26
Tableau 2 : Effets pharmacologiques de l'inhibition des enzymes sur l'activité contractile utérine.	27
Tableau 3 : Valeurs d'inhibition maximal moyenne (MMI) produit par les eicosanoïdes sur l'activité contractile du myomètre humain.	29
Figure 1. Représentation schématique de la voie métabolique de l'acide arachidonique.	20
Figure 2. Analyse par immunobuvardage des différentes enzymes métaboliques.	25
Figure 3. Effet pharmacologique de l'addition exogène d'acide 8,9-époxyeicosatriénoïque.	28

Article 2

Tableau 1 : Données démographiques des patientes incluent dans l'étude.	41
Tableau 2 : Comparaison de l'effet tocolytique des inhibiteurs de LOX et COX.	45
Figure 1. Diagramme des voies métaboliques de l'acide arachidonique.	38
Figure 2. Analyse par immunobuvardage des différentes fractions subcellulaires utilisant un anticorps contre la 5- ou la 12-lipoxygénase.	43

Figure 3. Effet pharmacologique de l'addition exogène d'inhibiteur de 5- et 12-lipoxygénase sur l'activité contractile spontanée de myomètre humain fraîchement isolé.	44
Figure 4. Effet résultant de l'inhibition de la voie des LOX et des COX sur l'activité contractile utérine spontanée.	47

Discussion générale

Figure 1. Hypothèse du « shunt » métabolique résultant de l'inhibition de la CYP450 ω -hydroxylase.	66
Figure 2. « Shunt » métabolique vers la voie des époxy- et hydroxy-eicosanoïdes.	67
Figure 3. Intégration des voies métaboliques de l'acide arachidonique à l'utérus de femme enceinte à terme.	69

Annexes

Figure 1. Effet pharmacologique de l'addition exogène de leucotriène D4 sur l'activité contractile spontanée de bandelette utérine fraîchement isolée.	74
---	----

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AMPc	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
AUDA	12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid
BK_{Ca}	Canaux potassique calcium et voltage-dépendants
COX	Cyclooxygénase
CYP450	Cytochrome P 450
DAG	Diacylglycérol
DDMS	<i>N</i> -methylsulfonyl-12,12-dibromododec-11-enamide
EET	Acide époxyeicosatriénoïque
HETE	Acide hydroxyeicosatétraoïque
IMC	Indice de masse corporelle
IP₃	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
LOX	Lipoxygénase
MAP	Menace d'accouchement prématurée
MLCK	« Myosin light chain kinase »
MLCP	« Myosin light chain phosphatase »
MS-PPOH	<i>N</i> -methylsulfonyl-6-[2-propangyloxyphenyl] hexanamide
NO	Oxide nitrique
OT	Ocytocine
PGE₂	Prostaglandines E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandines F ₂ alpha
PIP₃	Phosphatidylinositol 1, 4, 5-trisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA₂	Phospholipase A ₂

PLC	Phospholipase C
RCGP	Récepteur couplé aux protéines G
SA	Semaines d'aménorrhée
sEH	Époxyde hydrolase soluble
TXA₂	Thromboxane A₂

Étude de l'équilibre entre les voies métaboliques de l'acide arachidonique (AA) dans le myomètre de femmes enceintes.

Par Stéphanie Corriveau

Département de physiologie et biophysique et département d'obstétrique et gynécologie
Mémoire présenté à la faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du
grade de maître ès science (M.Sc.) en physiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada, J1H 5N4

RÉSUMÉ

Les voies métaboliques de l'acide arachidonique (AA) produisent divers dérivés qui sont impliqués dans le contrôle de la contraction et de la relaxation des muscles lisses. Les métabolites de l'AA sont produits soit par la voie des cyclooxygénases, des lipoxygénases ou celles des cytochromes P450 époxygénase et ω -hydroxylase. À ce jour, aucune étude n'a analysé les effets des eicosanoïdes produits des cytochromes P450 sur le muscle lisse utérin en fin de grossesse. Le but de cette étude est de comparer les effets des différents sous-produits de l'acide arachidonique sur le myomètre gréviste humain en situations physiologiques comme dans le cas du travail prématuré. Plus précisément, les objectifs spécifiques étaient de 1) démontrer l'effet des dérivées de l'AA sur l'activité contractile utérine *in vitro* à partir de tissus utérins de femmes enceintes et 2) d'explorer l'existence d'un équilibre entre les différentes voies métaboliques. Des biopsies utérines ont été réalisées chez des femmes consentantes bénéficiant d'une césarienne élective. Il s'agit d'une étude qui vise à quantifier les effets des eicosanoïdes exogènes sur le myomètre humain en utilisant un modèle *in vitro* et des mesures de tensions isométriques. Des effets tocolytiques partiels avec environ 40% d'inhibition ont été quantifiés lors de l'ajout des eicosanoïdes suivants: le 8,9-EET, le 14,15-EET et le 20-HETE. Les protéines du myomètre, des membranes fœtales et du placenta ont été extraites et analysées par immunobuvardage. Les enzymes de la voie métabolique des EET sont présentes dans les tissus de la sphère utérine. Par la suite, les effets endogènes des EET et du 20-HETE ont été testés de même que ceux des inhibiteurs enzymatiques associés aux différentes voies métaboliques, seuls ou combinés. Par ailleurs, lors de l'utilisation d'inhibiteur, AUDA et DDMS, il a été possible d'observer des effets tocolytiques (20 à 30%) concordant avec un effet produit par les eicosanoïdes endogènes. Dans un second temps, en étudiant la combinaison des inhibiteurs de LOX et de COX favorisant ainsi un éventuel « shunt » métabolique, il a été possible de quantifier un effet tocolytique additif. Les isoformes des lipoxygénases sont présentes dans le tissu de la sphère utérine. Pour conclure, ces résultats innovateurs ont permis de révéler l'importance de la voie des eicosanoïdes dans l'utérus de femmes enceintes à terme. Les enzymes de la voie métabolique de l'acide arachidonique semblent donc être des cibles pharmacologiques intéressantes dans le traitement du travail préterme.

Mots clés: Contraction utérine, dérivés de l'acide arachidonique, eicosanoïdes, inflammation myomètre et tocolytique.

INTRODUCTION

Introduction à la prématurité

Selon le dictionnaire médical *Dorland*, la prématurité signifie l'état d'un enfant né avant terme soit avant la 37^{ième} semaine de grossesse mais viable. Les naissances prématurées sont la principale cause de mortalité périnatale, de maladie ou d'invalidité chez les enfants survivants. En effet, l'incidence de naissances prématurées a augmenté au Canada de 1,2 % de 1981 (6.4 %) à 2000 (7.6 %)[Public Health Agency of Canada, 2003]. En 2004, le taux des naissances avant terme s'élevait à 12.5 % aux États-Unis [Goldenberg *et al.*, 2008; Behrman et Butler, 2007; Martin *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2006]. Les complications d'une naissance prématurée sont nombreuses. Les auteurs rapportent des problèmes respiratoires aigus, gastro-intestinaux, immunologiques, du système nerveux central, de l'audition et de la vision de même que des problèmes à long terme de coordination psychomotrice, de cognition, de vision, d'audition, de comportements sociaux-émotionnels et de croissance [McCormick et Behrman, 2007]. La naissance d'enfants prématurés a une grande implication tant au niveau social qu'économique. Une étude aux États-Unis a déterminé que le coût annuel pour la société est d'au moins 26,2 millions de dollars en 2005 [McCormick et Behrman, 2007].

La prématurité se définit en fonction du temps plus précisément entre la 24^{ième} et la 37^{ième} semaine de grossesse. Avant la 28^{ième} semaine de gestation (SA), il s'agit de prématurité extrême, de 28 à 32 SA de prématurité sévère et de prématurité modérée entre 32 et 37 SA. La prématurité peut également être définie en fonction du type. Les cas de prématurité peuvent être induits à cause d'affections maternelles ou fœtales (éclampsie, diabète, etc) ou spontanés à cause du travail préterme ou d'une rupture spontanée des membranes [Goldenberg *et al.*, 2008; Behrman et Butler, 2007] (Figure 1).

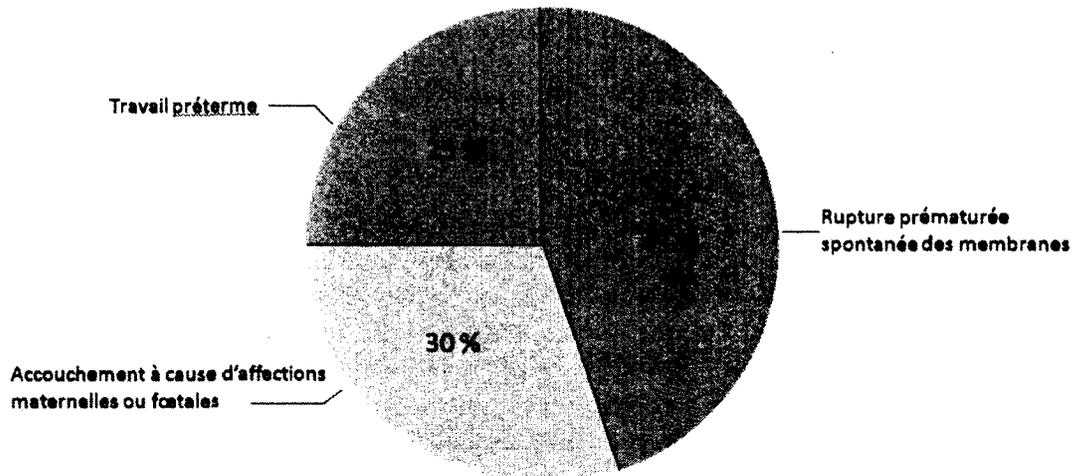


Figure 1. D'après McCormick, M.C., les précurseurs obstétricaux des naissances prématurées [McCormick et Behrman, 2007].

De la physiologie à la pathophysiologie de l'accouchement

L'accouchement se déroule en trois phases essentielles : du début du travail à la dilatation complète (phase 1), de la dilatation complète à l'accouchement (phase 2) et la délivrance (phase 3; Figure 2). La phase 1 comporte deux phases soit la phase de latence et la phase active. Le passage de la phase de latence à la phase active survient après la dilatation du col de 5 cm (Figure 2). La phase active est beaucoup plus linéaire et rapide. Cette phase abolit complètement le col qui devient en continuité parfaite avec le segment inférieur du myomètre permettant ainsi le positionnement et le passage de la tête du bébé. Les contractions jouent un rôle essentiel dans l'accouchement. L'amplitude, la durée de la phase de contraction et de relaxation et la fréquence des contractions utérines de la mère se régularisent progressivement et chacun de ces paramètres augmentent de plus en plus jusqu'à la délivrance, où les contractions atteignent leur amplitude et fréquence maximale. Après la naissance du bébé, l'utérus subit une contracture permettant la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et ce qui évite les hémorragies post-partum [R. Smith, 2007]. Dans la physiologie de la grossesse, trois facteurs sont impliqués tel que la dilatation du col de l'utérus, la rupture des membranes fœtales et le déclenchement du travail. Dans le cas d'une naissance à terme, les trois conditions seront complétées entre 37 et 40 semaines de gestation.

Dans des cas de pathologie (prématurité), le travail et la rupture des membranes peuvent survenir beaucoup plus tôt comme vers 28 semaines, alors qu'un effacement du col peut survenir encore plus tôt vers 19-20 semaines de gestation conduisant ainsi inévitablement à une naissance avant le terme de la grossesse [Romero, 2007]. La physiologie de l'effacement du col et celle qui conduit au déclenchement des contractions utérines rythmiques sont encore très mal comprise.

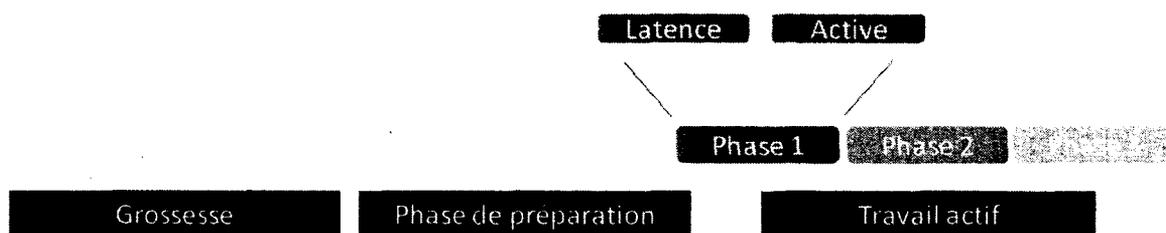


Figure 2. Représentation schématique des étapes essentielles de l'accouchement.

Vision moderne de la prématurité

Plusieurs facteurs peuvent mener aux conditions du travail préterme comme le stress par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, les hémorragies décíduales, la surdistension de l'utérus et l'inflammation. L'inflammation est le facteur le plus fréquent qui pourrait expliquer le déclenchement prématuré, l'amplification et la synchronisation des contractions utérines. Tout d'abord, il peut y avoir la présence de germes pathologiques dans le vagin causant un déséquilibre de la flore vaginale (1), il pourra s'en suivre de l'ascension de ces germes pathologiques (2). Par la suite, il pourrait y avoir excitation chorio-déciduale [Lockwood et Kuczynski, 2001] (3). La résultante pourrait être le raccourcissement du col menant à son effacement, la rupture spontanée des membranes et le travail préterme [Romero et Mazor, 1988] (Figure 3). L'inflammation chorio-déciduale représente 60 % des causes de prématurité spontanée. Cette inflammation cause la libération de plusieurs cytokines inflammatoires comme l'interleukine-1 β et le TNF- α , qui sont connues pour stimuler la production de prostaglandines. La prévention des naissances prématurées devrait d'une part cibler l'inhibition du travail prématuré et d'autre part cibler le traitement de la cause du travail

prématuré, c'est-à-dire l'inflammation. Plusieurs métabolites inflammatoires sont connus pour moduler la contraction utérine tels que les prostaglandines, des dérivés de l'acide arachidonique.

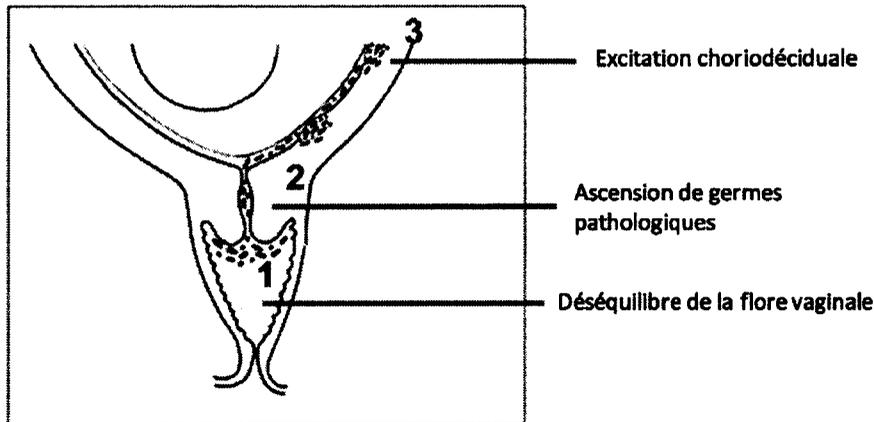


Figure 3. Vision moderne de la prématurité. Au niveau du vagin, de nombreuses bactéries cohabitent avec l'organisme afin de former la flore vaginale, protégeant ainsi des micro-organismes néfastes. Cet équilibre est fragile et lors de variations hormonales comme lors d'une grossesse, il est possible d'observer un déséquilibre de la flore (1). Découlant de ce déséquilibre, il y a une ascension de germes pathologiques (2) conduisant à l'excitation choriodéciduale (3) donnant cours à différentes conséquences telles que la contraction utérine avant terme, la rupture prématurée spontanée des membranes et l'effacement du col.

Utérus en fin de grossesse

Le myomètre est une couche épaisse de fibres musculaires lisses entrecroisées. Au cours de la grossesse, l'utérus subit une augmentation de volume qui est importante. Le myomètre devient hypertrophié. En période non gestante, l'utérus pèse environ 50 g puis passe à 1,5 kg vers la fin de la grossesse et finalement revient à son volume et sa masse initiale en période postnatale, soit quelques jours après l'expulsion du fœtus.

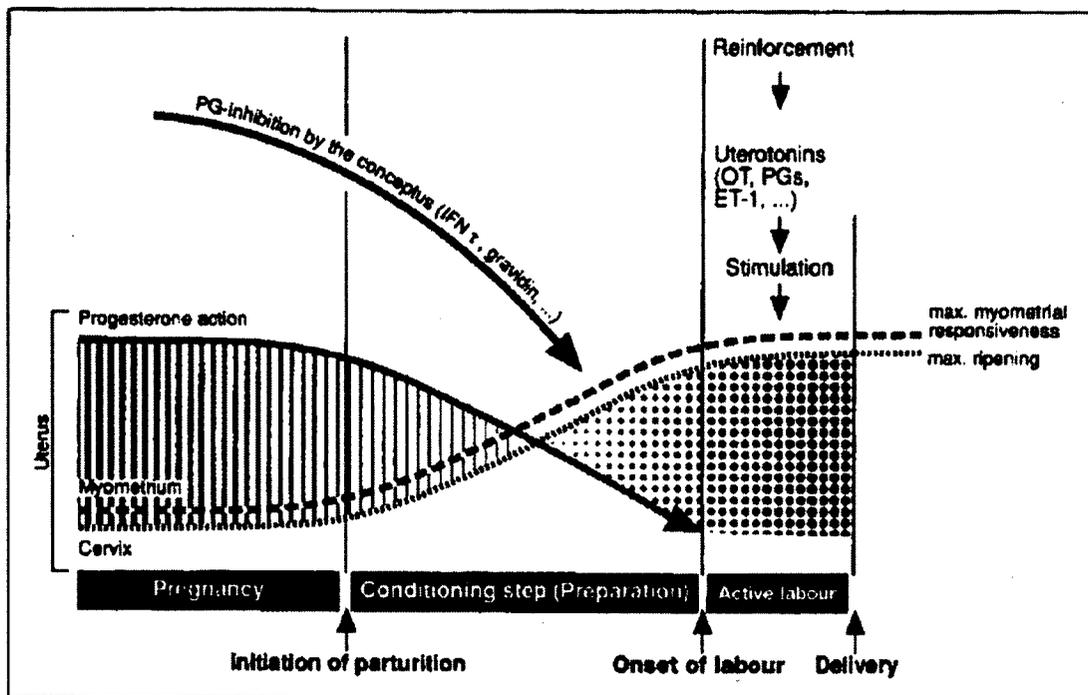


Figure 4. D'après Garfield, R.E., modèle proposé des différents stimuli sur le myomètre et le col durant la grossesse [Garfield *et al.*, 1998].

Vers la fin de la grossesse, l'utérus se prépare à répondre à des stimuli qui mènent à l'augmentation de la contractilité utérine et donc au travail. Les stimuli peuvent être locaux, maternelles, mécaniques ou fœtaux (Figure 4)[Garfield *et al.*, 1998]. Le muscle lisse reçoit des influx du système nerveux autonome sympathique et parasympathique. Il est très sensible à l'influence hormonale (ocytocine) sous laquelle il se contracte lors de l'expulsion du fœtus hors de la mère au terme de sa grossesse. Durant cette période, il doit y avoir la coordination des contractions des cellules du myomètre. Il existe une relation directe entre la contractilité utérine et l'activité électrique des cellules myométriales. L'activité électrique spontanée dans le muscle utérin se traduit par des potentiels d'action intermittents. Le volume de l'utérus (étirement chronique) et l'imprégnation hormonale contribue de façon substantielle à la forme et à la fréquence des potentiels d'actions. Un seul de ces potentiels d'action peut conduire à initier la contraction alors que plusieurs d'entre eux peuvent contribuer au contrôle des activités

contractiles phasiques et répétitives [Garfield et Maner, 2007]. Pour arriver à cette coordination, le myomètre doit donc être plus excitable et plus contractant qu'en phase de préparation ou qu'en phase de latence (Figure 2). L'excitabilité du myomètre se mesure en fréquence et en amplitude des contractions. Lors de l'expulsion, l'amplitude de même que la fréquence des contractions phasiques sera très grande, soit une contraction phasique toute les deux ou trois minutes. Entre deux contractions un tonus de base est maintenu ce qui empêche un retour à la phase antérieure soit la phase de quiescence. Lorsque le passage de la phase de latence à la phase active survient (phase 3; Figure 2), la phase d'activation, qui est régulée par plusieurs hormones, des agents utérotoniques et des lipides inflammatoires, se déclenche. Plusieurs facteurs hormonaux sont responsables de l'initiation et de l'augmentation progressive des contractions utérines dans la phase de travail actif. En effet, il y aura une baisse du taux de progestérone et ainsi une augmentation de la synthèse de prostaglandines (démontrées comme indispensables dans l'initiation de la contraction). Il y aura aussi une augmentation de la sécrétion de l'hormone ocytocine qui ira se lier à son récepteur dont le nombre dans l'utérus a préalablement augmenté pendant la grossesse en partie à cause des niveaux d'œstrogènes [Challis *et al.*, 2000].

Contraction et relaxation des myocytes utérins

Plusieurs groupes de recherche ont démontré, avec du tissu myométrial isolé, par la technique de microélectrodes intracellulaires ou d'électrodes extracellulaires, qu'il y avait une corrélation directe entre l'évènement électrique et la contraction des cellules myométriales suggérant ainsi que l'initiation d'une contraction pourrait être déclenché par des potentiels d'action de nature essentiellement calcique [Wolfs et Rottinghuis, 1970; Wolfs et Rottinghuis, 1970; MARSHALL, 1959]. De plus, la fréquence, l'amplitude et la durée des contractions utérines seraient principalement déterminées par la fréquence d'apparition et le décours des évènements électriques. Lors de potentiels d'action utérins, la phase de dépolarisation est due aux courants entrants de calcium et de

sodium alors que la phase de repolarisation survient lors de l'ouverture des canaux potassiques. Les cellules myométriales sont couplées électriquement entre elles par les « gap junction » composées de protéines, les connexines. Le couplage des cellules entre elles augmente à la fin de la grossesse pour permettre la mise en place d'un syncytium fonctionnel afin de permettre la coordination de contractions utérines efficaces pour l'expulsion du fœtus hors du corps de la mère [Garfield et Maner, 2007]. Bien que le fonctionnement rythmique du myomètre suggérerait la présence de cellules « pacemaker » comme dans le muscle cardiaque, pour l'instant, aucune évidence n'a démontrée la présence d'une telle zone de cellules myométriales. La présence d'une horloge cellulaire pourrait exister pour coordonner cette activité « pacemaker ». En absence de zone de cellules « pacemaker », il est concevable de proposer un oscillateur intracellulaire de calcium, c'est-à-dire, la relâche cyclique de Ca^{2+} [Maltsev *et al.*, 2011].

Cette activité électrique mène aux contractions utérines tout en étant modulée par les différentes molécules pharmacologiques. Selon Nakao K. *et al.*, il est possible d'observer et d'enregistrer des potentiels d'action sur le myomètre de femmes enceintes à terme qui avaient préalablement subi une césarienne élective. Le décours des potentiels d'action peut être modifié par l'ocytocine (effet inotrope et bathmotrope positif), hormone responsable en partie des contractions utérines lors du travail de l'accouchement [Nakao *et al.*, 1997].

Afin de permettre aux myocytes de se contracter et de générer des contractions rythmiques et puissantes pour l'expulsion du bébé, plusieurs protéines sont exprimées. Il peut y avoir trois types de contractions associés aux protéines. Premièrement, l'augmentation des interactions entre les protéines d'actine et de myosine causant la contraction du muscle. Ensuite, l'augmentation de l'excitabilité individuelle des cellules myométriales. Finalement, la promotion de la connectivité intracellulaire qui permet le développement de contractions utérines synchronisées [R. Smith, 2007]. Les sous-unités d'actine dans leur forme globulaire sont polymérisées dans leur forme

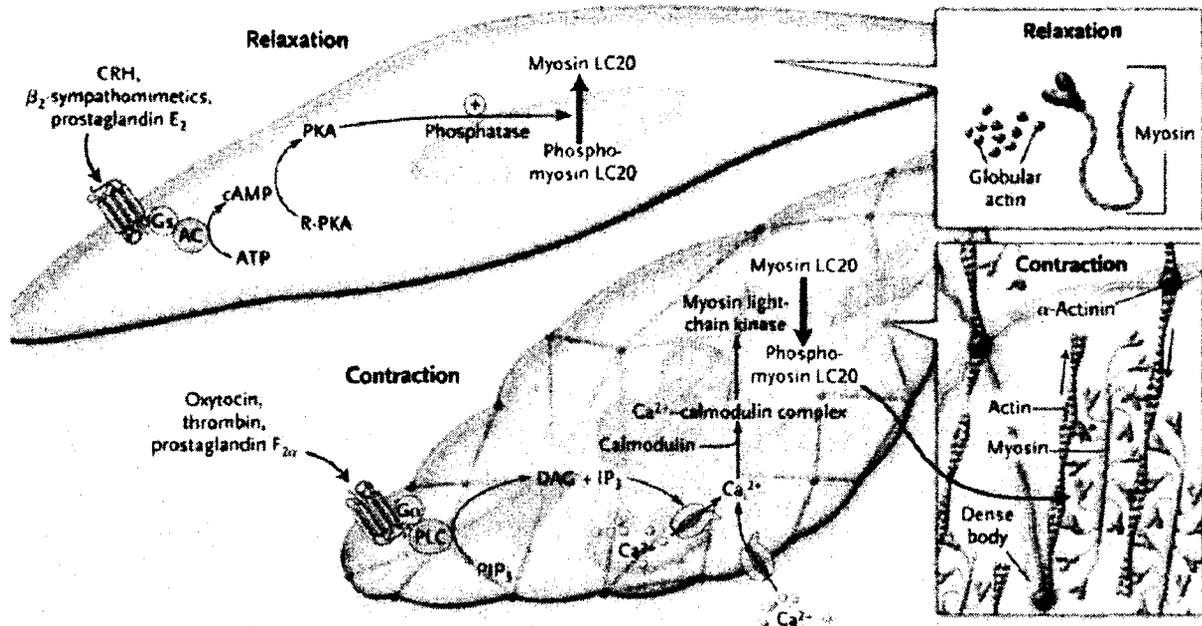


Figure 5. Couplage pharmaco-mécanique menant à la modulation de la contraction ou relaxation utérine [R. Smith, 2007].

filamenteuse afin que ces dernières puissent être attachées au cytosquelette par des points focaux d'adhésion permettant les transferts de tension mécanique [Tang et Anfinogenova, 2008]. D'autre part, les chaînes légères de myosine doivent être phosphorylées par la « myosine light chain kinase » (MLCK). La MLCK est activée par le complexe calcium-calmoduline suite à une augmentation du calcium intracellulaire. Une augmentation de calcium se produit à la suite de la dépolarisation du myocyte et qui permet l'entrée de calcium via les canaux calciques voltage-dépendant et de la libération de calcium des réserves intracellulaires. Cette augmentation transitoire de Ca^{2+} intracellulaire libre active la machinerie contractile de la cellule ce qui favorise l'interaction entre l'actine et la myosine et donc la contraction [R. Smith, 2007]. Une cascade mène à l'activation de la MLCK nécessaire à la phosphorylation de la myosine impliquée dans le mécanisme de contraction.

Par ailleurs, des agents utérotoniques, comme les prostaglandines $F_{2\alpha}$, peuvent se lier à un récepteur de type GPCR couplé à une protéine $G_{\alpha 2}$. L'activation subséquente de la PLC permet la transformation du PIP_2 en DAG et en IP_3 . Ces dernières molécules activent

la relâche des réserves intracellulaires de calcium formant le complexe Ca^{2+} -Calmoduline qui active la MLCK et permet la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (Figure 5). L'activation de la MLCK cause le déclenchement de la contraction [R. Smith, 2007].

La relaxation de la tension musculaire peut se faire grâce à des agents comme la prostaglandine E_2 qui se lie à son récepteur (EP) pour ensuite permettre le couplage à une protéine G_s qui active l'adénylate cyclase permettant l'augmentation de l'AMPc responsable de l'activation de la PKA qui active la « myosine light chain phosphatase » (MLCP) responsable de la déphosphorylation de la « myosine light chain kinase » et permet la séparation de la myosine et de l'actine. Une augmentation du repompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe SERCA est aussi à l'origine de la relaxation de la force musculaire [R. Smith, 2007]. Ce processus qui consomme de l'ATP est exothermique.

Les tocolytiques comme traitement du travail préterme

Selon le dictionnaire médicale *Dorland*, le mot tocolytique signifie suppression de la contraction utérine. Les traitements actuels sur le marché sont limités soit par leurs effets secondaires soit par leur inefficacité [Conde-Agudelo *et al.*, 2011; Papatsonis *et al.*, 2005; Usta *et al.*, 2011; Hearne et Nagey, 2000]. Plusieurs tocolytiques bien connus sont utilisés. Il est possible de citer les β -mimétiques comme la ritodrine. Le mécanisme d'action de ce tocolytique est le suivant, étant donné que les récepteurs β_2 sont présents de façon importante au niveau du muscle lisse utérin, la ritodrine se lie au récepteur β_2 qui est de type GPCR (couplage avec une protéine G_s), il s'en suit une activation de l'adénylate cyclase puis une augmentation de l'AMPc et donc une diminution du calcium libre et une diminution de la phosphorylation de la MLCK résultant ainsi en une inhibition de la contraction utérine [Doret *et al.*, 2002]. Les β -mimétiques sont efficaces pour une période de seulement 48 heures dans le muscle lisse utérin. Par ailleurs, les récepteurs β_2 sont présents dans plusieurs organes

importants donnant cours à des effets secondaires majeurs [Lands *et al.*, 1967; Lands, Luduena *et al.*, 1967; Doret *et al.*, 2002]. La possibilité d'arythmie cardiaque, d'œdème pulmonaire et d'un mauvais contrôle du diabète peuvent apparaître. Le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) est l'antagoniste compétitif pour le calcium qui entre dans les myocytes et qui résulte en une diminution du Ca^{2+} intracellulaire. Aucune évidence n'a démontré un effet tocolytique supérieur à un placebo ni aux autres tocolytiques. De plus, parmi les effets secondaires graves, il est possible de citer la diminution de la respiration du bébé [Mercer *et al.*, 2009]. Les bloqueurs de canaux calciques voltages dépendants de type L, comme la nifédipine, permettent d'inhiber le flux de calcium et donc de diminuer le calcium libre intracellulaire. La nifédipine reste encore parmi les plus efficaces *in vitro* [Doret *et al.*, 2002]. En revanche, en clinique, aucune étude randomisée n'a étudié l'efficacité des bloqueurs de canaux calciques comparativement à un placebo. Les donneurs de NO tels que la nitroglycérine sont connus pour être de puissants vasodilatateurs, mais ils permettent aussi de diminuer les contractions utérines [Buxton, 2004; Momohara *et al.*, 2004]. Ils ont aussi été grandement utilisés sans beaucoup de succès. Peu d'études démontrent la réelle efficacité de cette classe de tocolytique. En fait, l'efficacité clinique du NO a été montrée dans une seule étude qui montrait une absence de prolongation de la grossesse, mais une amélioration du devenir néonatal précoce. Il ne faut pas omettre les antagonistes des récepteurs à l'ocytocine tels que l'Atosiban. [Doret *et al.*, 2003]. L'ocytocine est connue pour être un inducteur puissant de la contraction utérine. Son antagoniste compétitif bloque le récepteur [Friebe-Hoffmann, 2003]. L'efficacité de l'atosiban est similaire aux β -mimétiques, mais les études réalisées ne démontrent pas une efficacité supérieure de l'atosiban comparé au placebo. Les prostaglandines, produits des COX, sont des médiateurs lipidiques puissants impliqués dans l'initiation de la contraction lors du passage de la phase de quiescence à la phase de travail actif [Olson, 2003]. L'inhibiteur de COX a des effets tocolytiques supérieurs au placebo et est plus efficace que les autres tocolytiques sur une période de 48 heures. Au Canada en 2004, le médicament le plus utilisé était l'indométhacine, un inhibiteur non-sélectif de COX qui inhibe la synthèse de prostaglandines mais, qui peut passer la barrière placentaire et peut donc causer des

effets secondaires graves chez le fœtus d'où son utilisation à l'intérieur de 48 heures seulement [Olson *et al.*, 2008]. Le traitement privilégié pour combattre la menace d'accouchement prématuré devrait être l'inhibition de la production des prostaglandines (inhibition des COX par l'indométhacine). Toutefois, il est contre indiqué, car il entraîne des effets secondaires fœtaux hémodynamiques et rénaux, à cause de son passage au travers de la barrière placentaire [ACOG Committee on Practice Bulletins. American College of Obstetricians and Gynecologist, 2003].

À partir d'une approche multidisciplinaire, qui s'intéresse à l'équilibre de la dégradation de l'acide arachidonique (voie des COX, des LOX et des CYP450), nous voulions développer une approche totalement novatrice du traitement du travail préterme en utilisant des molécules anti-inflammatoires [Wisansoonwong *et al.*, 2011].

Les dérivées de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un acide gras essentiel à longue chaîne de type oméga-6 retrouvé dans l'alimentation et dans certaines huiles végétales, symbolisé en biochimie par les nombres 20:4, c'est-à-dire, que l'acide arachidonique est composé de 20 carbones et de quatre doubles liaisons. La production des métabolites biologiquement actifs provient de la relâche de l'acide arachidonique des réserves cellulaires de phospholipides membranaires. Il est présent sous forme estérifié et il est libéré des phospholipides par la phospholipase A₂ pour ensuite être métabolisée par différentes enzymes soit les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les cytochromes P450 époxygénase ou ω -hydroxylase (Figure 5) [Sala *et al.*, 2010].

Les prostaglandines

À partir de l'acide arachidonique libéré des phospholipides membranaires, les cellules sont capables de produire des prostanoides. La présence d'enzyme telle que les cyclooxygénases 1 ou 2 (COX-1 ou COX-2) est nécessaire (Figure 6; partie centrale). Elles

seraient toutes les deux présentes dans les membranes fœtales et dans le myomètre bien que la COX-2 semble être plus exprimée que la COX-1 [Erkinheimo *et al.*, 2000]. Certaines prostaglandines comme la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et TXA_2 sont essentielles aux déclenchements des contractions nécessaires au passage de la phase de quiescence au travail actif. Il a été démontré dans la littérature que leurs taux dans le liquide amniotique en fin de grossesse augmentaient [Kamel, 2010]. Des études *in vitro* ont démontré que l'effet net des prostaglandines augmentait l'activité contractile utérine [Word *et al.*, 1992; Janicek *et al.*, 2007]. Les prostaglandines via GPCR couplé à une protéine G_α permettent l'activation de la PLC qui permet la transformation

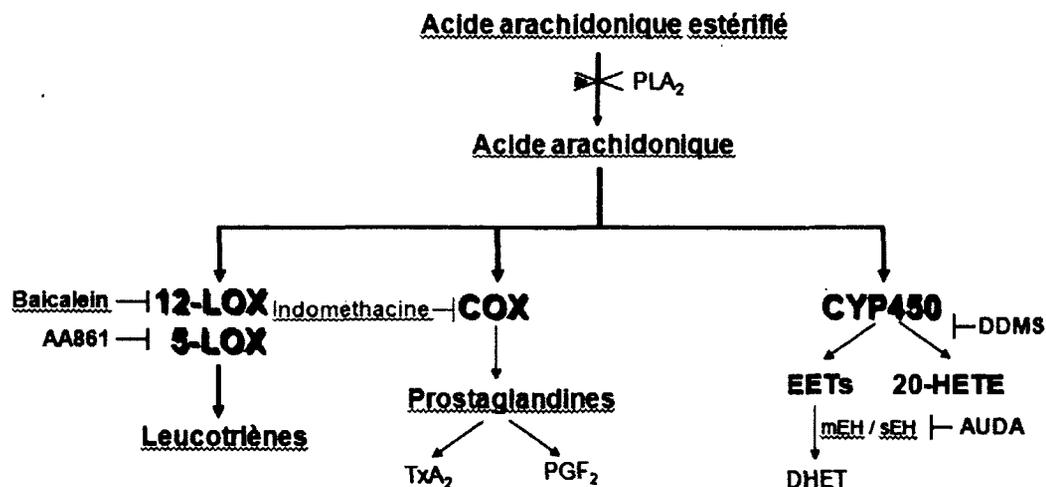


Figure 6. Voies métaboliques de l'acide arachidonique.

du PIP_2 en DAG et en IP_3 . Ces dernières molécules activent la relâche des réserves intracellulaires de calcium ce qui permet la formation du complexe Ca^{2+} -Calmoduline qui active la MLCK et permet la phosphorylation de la chaîne légère de myosine ce qui génère des contractions phasiques (Figure 5) [R. Smith, 2007].

Les leucotriènes

Les leucotriènes ont été démontrées comme ayant des propriétés contractiles sur l'utérus *in vitro* [Lopez Bernal *et al.*, 1989]. Ils sont synthétisés par une succession de

modifications chimiques à partir de l'acide arachidonique par l'action des lipoxgénases (LOX). Les isoformes de lipoxgénases suivantes soit la 5-, la 12- et la 15-lipoxgénase ont été retrouvées dans les tissus de la sphère utérine à différents stades de la grossesse autant chez les femelles babouins que chez la femme (Figure 6; partie gauche)[Canete Soler et Lopez Bernal, 1988; Brown, Slater, Alvi, Elder, Sullivan et Bennett, 1999b; Brown, Slater, Alvi, Elder, Sullivan et Bennett, 1999a]. Les leucotriènes se lient à un récepteur couplé aux protéines G nommé cystéinyl leucotriènes (CysLTs). Il existe deux sous-types de ce récepteur soit le CysLT1 ou le CysLT2 [Singh *et al.*, 2010]. Plusieurs métabolites sont produits par les lipoxgénases comme les LTC₄, LTD₄, LTE₄ et le 5-HETE. De plus, ces médiateurs lipidiques de l'inflammation sont présents lors de la grossesse et ils sont impliqués dans le processus du passage de la phase de quiescence à la phase de travail. Lors de la grossesse, ils ont été détectés dans le liquide amniotique [Bryman *et al.*, 1985]. Le LTC₄ serait la molécule qui aurait le plus d'effet sur l'activité contractile *in vitro* avec le 5-HETE qui semble aussi très augmenté durant la période de travail actif. Par contre, contrairement aux prostaglandines les leucotriènes n'ont pas été démontrées comme des molécules pouvant déclencher des contractions utérines [Bryman *et al.*, 1985].

Les eicosanoïdes

Les nouveaux eicosanoïdes dont il est question dans ce présent travail sont aussi des dérivés de l'acide arachidonique libérés par la phospholipase A₂ à partir des phospholipides membranaires. Ils sont produits par le métabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés (PUFA) par les CYP450 époxygénase et ω -hydroxylase [Falck *et al.*, 2009]. Récemment, nous avons démontré que les régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque (EET) et que les acides hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) sont des agents majeurs dans la modulation de la contraction et de la relaxation des différents muscles lisses, mais aucune étude n'avait testé ces molécules sur l'activité utérine *in vitro* [Rousseau *et al.*, 2007]. Les EET et le 20-HETE sont respectivement produits par les cytochromes P450 (CYP450) époxygénase et ω -hydroxylase. La présence de ces enzymes (CYP450 4A, 2C9 et 2J2), tout comme leurs métabolites respectifs, ont été détectés dans

les tissus intra-utérin de femmes [Schafer *et al.*, 1996; Zhang, Pearson, Matharoo-Ball, Ortori, Warren, Khan et Barrett, 2007a]. Il semblerait que les eicosanoïdes modulerait la contraction utérine soit en interagissant avec un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), non identifié encore, ou qui agirait sur les canaux ioniques en particulier les BK_{ca} comme cela a été rapporté suite à des expériences électrophysiologiques [Morin, Sirois, Echave, Gomes et Rousseau, 2007b; Morin, Sirois, Echave, Gomes et Rousseau, 2007b; Li et Campbell, 1997; Dumoulin *et al.*, 1998]. Étant des modulateurs de la relaxation musculaire lisse dans certains tissus, les CYP450 époxygénase et ω -hydroxylase pourraient représenter des cibles pharmacologiques intéressantes dans le traitement du travail préterme. Toutefois, il reste de nombreuses questions à élucider en ce qui concerne le « crosstalk » entre les différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique c'est-à-dire la voie des COX, des lipoxygénases (LOX) et des CYP450. À ce jour, aucun groupe de recherche n'a étudié l'équilibre ou lors d'une inhibition sélective l'effet de « shunt » vers l'une des branches métaboliques (Figure 6; partie droite).

Contexte et but du projet de recherche

Les traitements actuels sont insatisfaisants et l'incidence des naissances prématurées encourage le besoin d'avoir d'autres molécules tocolytiques. Au Canada, en 2004, le tocolytique le plus utilisé pour le traitement du travail préterme [Hui *et al.*, 2007] restait l'indométhacine à faible dose et pour une courte période de 48 heures ce qui réduit les chances de maintenir l'inhibition des contractions utérines et d'empêcher une naissance prématurée spontanée [Garza *et al.*, 2004]. Il est encore utilisé aujourd'hui, mais il est principalement remplacé par un bloqueur de canaux calciques, la nifédipine, en raison des graves effets secondaires rénal et cardiaque que l'indométhacine causait au fœtus [Rasanen et Jouppila, 1995]. Il devient donc pertinent de trouver une alternative ou une façon de potentialiser les effets de l'indométhacine qui a toujours un intérêt clinique. De plus, durant la grossesse, les mécanismes de transition de la phase quiescente à la phase de travail sont encore mal compris. Suite aux faits établis précédemment, plusieurs

modulateurs de la contraction utérine semblent avoir des rôles importants dont les eicosanoïdes. À ce jour, seul l'importance du métabolisme des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) a été bien étudié au niveau du tissu utérin, et ce, du début de la gestation jusqu'à la fin de la gestation autant chez l'animal que chez la femme [Doret *et al.*, 2002; Erkinheimo *et al.*, 2000; Vane *et al.*, 1998; Gibb, 1998; Hertelendy et Zakar, 2004]. Il semble aussi établi que les leucotriènes auraient une implication dans l'augmentation de l'activité utérine. La voie des cytochromes P450 époxygénase et ω -hydroxylase n'a, à notre connaissance, jamais été encore investiguée. Enfin, les interactions entre ces différentes branches du métabolisme de l'acide arachidonique et l'existence d'un équilibre entre les COX, les LOX et les CYP450 métabolisant l'acide arachidonique restent à explorer.

Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'effet des eicosanoïdes sur le tissu utérin de femmes à terme. Plus précisément, l'effet pharmacologique *in vitro* des eicosanoïdes (8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET et le 20-HETE) ainsi que les inhibiteurs enzymatiques (MSPPOH, AUDA et le DDMS) sur l'activité contractile utérine spontanée. Dans un deuxième temps, l'effet pharmacologique des inhibiteurs enzymatiques des COX et des LOX a été quantifié. Finalement, l'effet d'une double inhibition des voies enzymatiques des COX et des LOX a été réalisé pour voir le potentiel effet additif ou synergique sur l'activité contractile utérine dans le but de traiter le travail préterme. Les objectifs spécifiques de ce travail de recherche étaient de:

- (1) Détecter la présence des enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique par analyse d'immunobuvardage;
- (2) Quantifier l'effet tocolytique des EET et des inhibiteurs enzymatiques spécifiques par des mesures de tension isométrique;
- (3) Observer et quantifier l'effet de l'ajout de deux inhibiteurs enzymatiques spécifiques de la voie métabolique de l'acide arachidonique peuvent favoriser un effet relaxant via la voie des eicosanoïdes.

RÉSULTATS

Article 1

Why eicosanoids could represent a new class of tocolytics on uterine activity in pregnant women

Corriveau Stéphanie, Berthiaume Maryse, Rousseau Éric et Jean-Charles Pasquier

Article publié, American Journal of Obstetrics and Gynecology (AJOG), 2009 oct., volume 201 (4), p. 420-7

Avant propos

Cet article rapporte les effets des dérivés de l'acide arachidonique, spécifiquement les hydroxy- et époxy-eicosanoides sur l'activité contractile utérine spontanée par l'entremise d'un modèle *in vitro* sur les bandelettes utérines dans les bains à organes isolés. Ce travail met l'emphase sur une nouvelle voie de l'acide arachidonique, la voie des CYP450 époxygénase et ω -hydroxylase, présente dans le muscle lisse utérin ce qui n'avait jusqu'à ce jour jamais été démontré.

Ces résultats représentent le début de mes travaux de maîtrise. Tous les résultats publiés dans cet article découlent du recrutement de patientes et d'expérimentations que j'ai réalisé personnellement avec les conseils de l'assistante de recherche du Dr Jean-Charles Pasquier, Mme Maryse Berthiaume et dont les implications et les conclusions ont été discutées avec les Drs Jean-Charles Pasquier et Éric Rousseau.

ABSTRACT

Objective: To assess the effects of exogenous eicosanoids on spontaneous uterine contractile activity. **Study design:** Eight uterine biopsies were performed from women undergoing elective caesarean. Tension measurements were performed *in vitro* on myometrial strips. Contractile activities were quantified by calculating area under the curve. The effects of eicosanoids and specific enzyme inhibitors were assessed. Fractions from various uterine tissues were analyzed by Western blot. **Results:** Obtained data demonstrate the presence in some tested tissues of CYP-450 epoxygenase and soluble epoxide hydrolase (sEH), which respectively produce and degrade EET-regioisomers. Inhibition of sEH with AUDA or ω -hydroxylase with DDMS resulted in a tocolytic effect, while MS-PPOH, an epoxygenase inhibitor, had no effect. Exogenous EET displayed significant tocolytic effects on spontaneous contractile activities. **Conclusion:** Epoxy- and hydroxy-eicosanoids represent new bioactive, arachidonic acid by-products with *in vitro* tocolytic activities. These findings suggest that CYP-450 isozymes may represent relevant pharmacological targets under physio-pathological conditions.

Keywords: epoxy-eicosatrienoic acid, tocolytics, uterine contractile activity, CYP-450 2J2, epoxygenase, soluble Epoxide Hydrolase.

Abbreviations:

Epoxyeicosatrienoic acid (EET), arachidonic acid (AA), cytochrome P-450 (CYP-450), soluble epoxide hydrolase (sEH), N-methylsulfonyl-6-[2-propargyloxyphenyl] hexanamide (MS-PPOH), 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid (AUDA), N-methylsulfonyl-12,12-dibromododec-11-enamide (DDMS).

INTRODUCTION

Preterm birth is the principal cause of perinatal mortality, disease and disability in surviving children. Its incidence in Canada has increased by 20 % from 1981 (6.4 %) to 2000 (7.6 %) (1). In the USA, 10 % of all babies are born preterm (2). The exact mechanism responsible for the transition from uterine quiescence during pregnancy to active contractions in labor remains unknown. Hence, a better understanding of factors involved in this mechanism may assist in the prevention of preterm birth (3). A number of modulators may be involved in this process; for instance in other smooth muscle tissues, epoxy-eicosanoids have been reported to induce anti-inflammatory and relaxing effects (4, 5).

Eicosanoids are bioactive lipids synthesized from arachidonic acid (AA), a polyunsaturated fatty acid (PUFA) found in Sn2 position of various phospholipids in the cell membrane. AA is released upon activation of phospholipase A₂ (PLA₂), and subsequently metabolized by lipoxygenases (LOX), cyclooxygenase (COX) or cytochrome P-450 isoforms (CYP-450). For example, epoxygenase CYP and ω -hydroxylase are directly involved in the production of epoxy-eicosatrienoic acids (EET) and hydroxyl-eicosatetraenoic acids (HETE) respectively, both of which represent a new generation of eicosanoids (6) (Figure 1). Eicosanoids can modulate contractile activities from various smooth muscle tissues, such as vascular, bronchial and vesicle wall muscle. Tonus variations in these tissues have been observed in various mammalian species, including rat, guinea pig and humans (6, 7). In human pulmonary artery and bronchial smooth muscles, Morin *et al* have recently reported the relaxing effects of EET regioisomers and 20-HETE (7). Moreover, EET displays significant anti-inflammatory effects in lung tissues (5).

To our knowledge, there are no reported studies on the mode of action of eicosanoids on human uterine tissues. Recently, we have studied the *in vitro* effect of these

eicosanoids on isolated pregnant rat uteruses and demonstrated a tocolytic effect of eicosanoids such as 8,9-EET, 11,12-EET and 20-HETE. Moreover, enzymes which produce or degrade EET have been detected in uterine tissues of pregnant rats (8).

To date, the putative role for this new class of smooth muscle modulators has not been studied in human pregnant myometrium. The aim of the present *in vitro* experimental work was to assess the putative tocolytic effect of eicosanoids on human pregnant myometrium at term. Complementary approaches were used to perform i) detection of AA metabolizing enzymes by specific antibodies using the classical Western blot technique and ii) tension measurements on human pregnant myometrium strips. Herein, we report the first evidence that EET and 20-HETE induce concentration-dependent tocolytic effects.

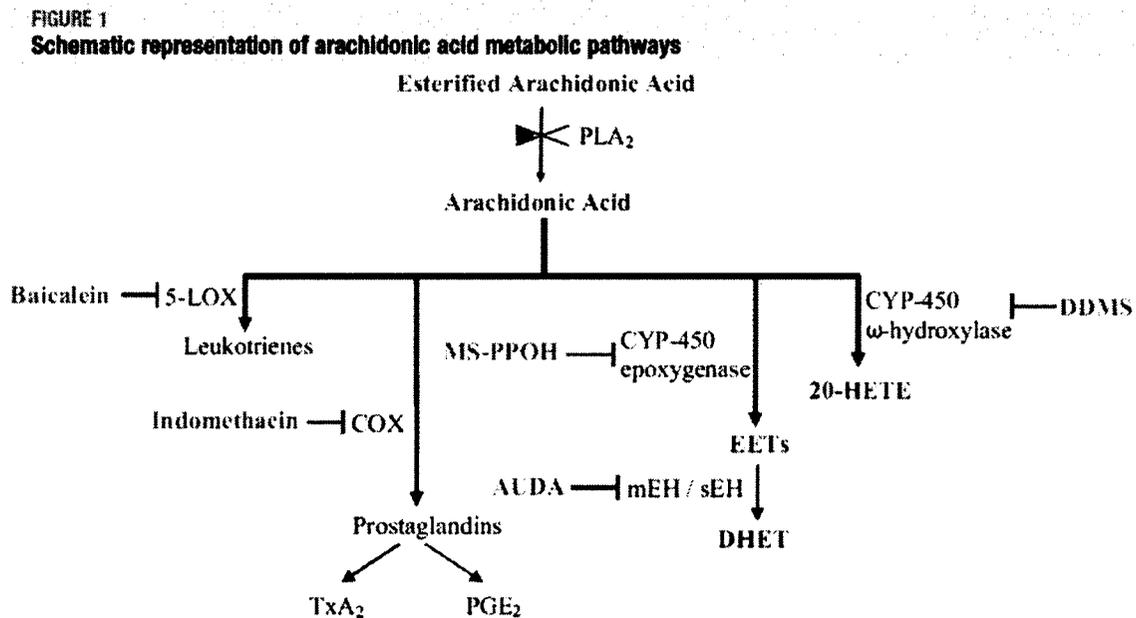


FIGURE 1. Schematic representation of arachidonic acid metabolic pathways. *PLA₂*, Phospholipase A₂, *5-LOX*, 5-Lipoxygenase, *COX*, cyclooxygenase, *TxA₂*, Thromboxane A₂, *PGE₂*, Prostaglandin E₂, *mEH/sEH*, microsomal Epoxide Hydrolase and soluble Epoxide Hydrolase, *EETs*, epoxy-eicosatrienoic acid regioisomers *DHET*, di-hydroxyl derivatives of EET compounds, *20-HETE*, 20-hydroxyl-eicosatetraenoic acid, *CYP-450*, Cytochrome P450.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and tissue collection. Myometrial biopsies were obtained from eight women at term gestation undergoing primary cesarean section before labor. Informed consent was obtained prior to the procedure. The study was approved by our institutional Ethics Committee for research on human subjects (project # 08-035). Demographic data included maternal age, ethnicity, parity, BMI and indications for caesarean section. During the procedure, immediately after delivery of the baby, biopsies were excised from the upper lip of the lower uterine segment incision in the midline, i.e. the upper portion of the lower uterine segment. Retrieval of samples was performed before maternal injection of Oxytocin. Once collected, all tissue biopsies were placed in Krebs' physiological solution at pH 7.4 containing the following: 4.7mM potassium chloride, 118mM sodium chloride, 1.2mM magnesium sulphate, 2.5mM calcium chloride, 1.2mM potassium phosphate, 25mM sodium bicarbonate and 11.1mM glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tissues were stored at 4°C and used within 24 hours of collection.

Isolated organ bath experiments. Longitudinal myometrial strips (measuring approximately $2 \times 2 \times 10$ mm) were dissected free of uterine decidua and serosa and mounted for isometric recording under 2 g of resting tension in a parallel organ bath system as previously described (9, 10). The tissue baths contained 10 ml of Krebs' solution maintained at 37°C, pH 7.4, and were gassed continuously with a mixture of 95% oxygen / 5% carbon dioxide. Myometrial strips were allowed to equilibrate for at least 2 hours, after which a 30-minute period was allowed in order to achieve spontaneous phasic contractions. Passive and active tensions were assessed using transducer systems (Radnoti Glass Tech., Monrovia, CA) coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) for facilitating data acquisition and analysis.

The enzymatic inhibitors, AUDA, DDMS, MS-PPOH, were then added in the tissue bath at concentrations of 1 μ M (AUDA) or 10 μ M (DDMS and MS-PPOH). Exogenous eicosanoids 8,9-EET, 14,15-EET or 20-HETE were also added separately to the tissue bath, in a cumulative manner at concentrations of 1 and 3 μ M at 30-minute intervals. Two sets of control experiments were performed as follows: Control 1, strips exposed to Krebs'solution only for up to 3 hours; Control 2, strips exposed to Krebs and vehicle (ethanol). The area under the curves (AUC) for isometric tension studies was calculated using a force-time integral based on raw recordings from independent myometrial strips. The effect of pharmacological agents and the respective controls were assessed by calculation of AUC for each 30 minutes interval and expressed as a percentage of the AUC obtained in the 30 minutes period before addition of pharmacological agents. The inhibitory effects of the pharmacological agents were corrected for the reduction in the contractile activity observed in the vehicle control (Control 2) such that the provided mean maximum inhibition values (MMI) represent net inhibition.

Microsomal and cytosolic fraction. All experimental procedures were performed on ice at 4°C. The tissues were weighed and placed in a solution of 0.3 M sucrose, 20 mM K-HEPES pH 7.4, 3 mM K-EGTA to which was added a protease inhibitor containing 50 μ M Pefabloc, 1 μ M Pepstatins, 1 μ M Leupeptins, 2 mM DTT and 1.2 TIU aprotinin. Tissues were then sliced and homogenized with a Polytron homogenizer for 3 x 30 seconds. Ensuing homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes. Supernatants were filtered through two layers of cotton cheese cloth and subsequently centrifuged at 38,000 rpm for 80 minutes. The cytosolic fraction (supernatant 1) was retained while the pellet was suspended and gently homogenized in 300 to 500 μ l of solution A containing 0.4 mM KCl and 100 mM MgCl₂ at pH 7.4. A third centrifugation was performed at 14,500 rpm for 10 minutes. Supernatant 2 was retained and the pellet was re-suspended in 300 to 500 μ l of solution A and homogenized. Aliquots of 50 to 200 μ l were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by the Folin-Ciocalteu method.

SDS-PAGE and Western blot analysis. Proteins were solubilized in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer containing 1% 2-mercaptoethanol. Electrophoretic protein separation was carried out on a 10 % gel with 20 µg of protein per lane. Prestained markers were used for molecular weight estimation. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes at 70 V for 2 hours at 4°C. Membranes were blocked overnight with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween at 4°C. Blots were incubated 2 hours with either rabbit antiserum raised against s-EH (From Dr B. Hammock, UCD, USA), CYP450 2J2 (Cayman Chemical, MI, USA) or CYP450 2C9 (Abcam, MA, USA) proteins. After washing, the membranes were incubated in a solution containing peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG1 antiserum (Amersham, QC, Can). Enhanced chemi-luminescence kit (Roche, QC, Can) was used to detect protein labeling.

Drugs and chemical reagents. 8,9-EET, 14,15-EET and 20-HETE were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), dissolved in 100 % ethanol (EtOH) and stored as 936 µM stock solutions. DDMS was also obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) and stored as 10 mM stock solution. MS-PPOH and AUDA were respectively obtained from the laboratories of Dr J. Falck and Dr B. Hammock in the United-States and stored as 10 mM stock solutions. Final bath concentration of EtOH was 0.3 %, for which simultaneous controls were run as outlined above. Fresh Krebs' solution was prepared daily.

Data analysis and statistics. Contractile activities were quantified by calculating the area under the curve over 20-minute periods using Sigma Plot 8.0 (SPSS-Science, Chicago, IL). Statistical analyses were performed using the Student paired t test and the Mann-

Whitney–Wilcoxon nonparametric test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

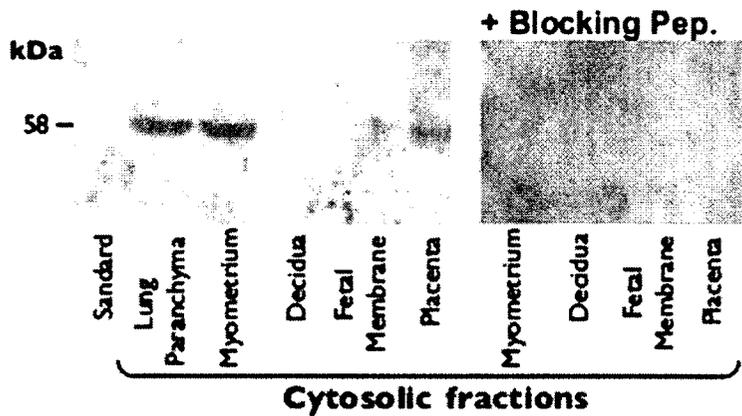
RESULTS

Myometrial biopsies were obtained from a total of 8 women who underwent cesarean delivery between 37 and 40 weeks of gestation (median age: 38 weeks of gestation). Clinical characteristics are presented in Table 1. Indications for a cesarean section included previous long and difficult delivery ($n = 1$), placenta previa ($n = 2$) and breech position ($n = 5$). The mean maternal age at delivery was 27.5 years (range 18-34).

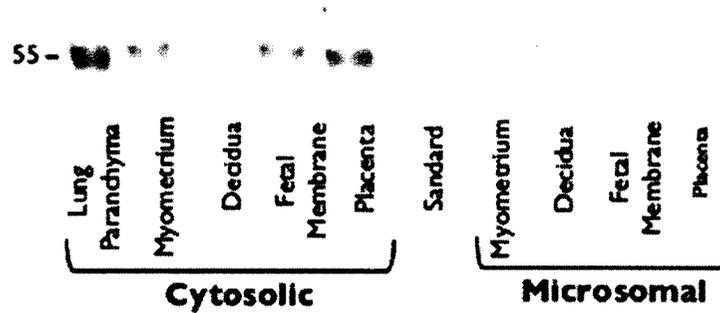
Subcellular fractions (cytosolic and microsomal) were prepared from myometrium, decidua, fetal membranes and placenta from which protein contents were separated on SDS PAGE prior to Western blot analysis. Figure 2A reveals specific immuno-staining of a protein band at 58 kDa with the anti-sEH antibody. This band was mainly detected in the cytosolic fraction from myometrium and placenta. Immuno-reactivity was not detected in the cytosol from fetal membranes and decidua (Figure 2A). As positive control, we detected sEH in the cytosolic fraction of the lung parenchyma (6).

FIGURE 2
Western blot analysis of different metabolic enzymes

A Anti sEH



B Anti CYP450 2J2



C Anti CYP450 2C9

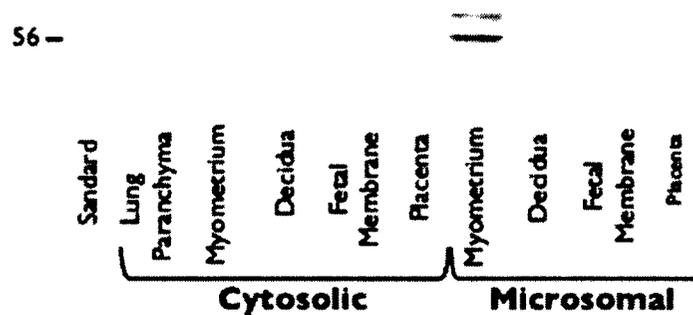


FIGURE 2. Western blot analysis of different subcellular fractions using antibodies against sEH, CYP450-2J2 and CYP450-2C9. A) Cytosolic fractions from Myometrium, Endometrium (decidua), Fetal membranes and Placenta were probed with an anti-sEH, primary antibody (left panel) and with the same antibody in the presence of blocking peptide (right panel). B) Cytosolic and microsomal fractions were probed with an anti-CYP450-2J2 antibody. C) Cytosolic and microsomal fractions were probed with an anti-CYP450-2C9 antibody.

TABLE 1
Demographic data of patients
(n = 8) who were involved
in this study

Variable	Patients, %
Maternal age, y	
<30	75.0
≥30	25.0
Ethnicity	
White	87.5
Other	12.5
Parity	
Nulliparous	50.0
Multiparous	50.0
Body mass Index, kg/m²	
<20	25.0
20-25	62.5
>25	12.5
Indications for cesarean delivery	
Pregnancy complication ^a	38.0
Breech presentation	62.0

^a Pregnancy complications include: placenta previa and previous long and difficult childbirth.
Corriveau. Epoxyeicosanoids display tocolytic effects. Am J Obstet Gynecol 2009.

Hence, to verify the specificity of the antibody against sEH, we used a blocking peptide. Under these conditions, the immunoreactivity was lost (Figure 2A, right panel). Using a primary antibody raised against CYP450-2J2, an immunoreactive band was consistently detected at 55 kDa. This band was detected in all tested cytosolic samples excepted for decidua (Figure 2B). Again, cytosolic fraction of lung parenchyma was used as a positive control (11). The presence or absence of the CYP450-2C9 –another epoxygenase isoform– was also assessed in cytosolic and microsomal fractions. This isoform was only detected in the microsomal fraction from the myometrium as reported in Figure 2C. Given the presence of epoxygenase isoforms and the sEH in the pregnant uterus, myometrium-associated tissues are likely to produce eicosanoids, such as EET, as well as metabolize these compounds into DHET

(Figure 1).

Thus, in the second phase of the study, eicosanoids were tested for their tocolytic effects. No significant difference in relaxing effect was observed between vehicle control and time control ($p = 0.310$; $p = 1.00$). Specific inhibitors of enzymes producing or degrading the eicosanoids of interest (EET and 20-HETE) were then tested: MS-PPOH (an inhibitor of CYP450-epoxygenase), DDMS (an inhibitor of ω -hydroxylase) and AUDA (a sEH inhibitor). The inhibitors were added to the isolated organ bath at micromolar concentrations and found to reduce uterine spontaneous contractions. DDMS and AUDA

induced an inhibitory effect on spontaneous contractions in human myometrium *in vitro* (Table 2). Tocolytic effects reaching 24.87 % and 17.04 % were observed for DDMS and AUDA respectively, while MS-PPOH had no effect on the contractile activity of gravid uterine tissue.

TABLE 2
Pharmacologic effects of enzyme inhibitors
on uterine contractile activity

Inhibitors	n	Mean maximal inhibition (% ± SEM)	P value
10 μmol/L N-methylsulfonyl-6-[2-propargyloxyphenyl] hexanamide (MS-PPOH)	12	-2.27 ± 13.33	.982
1 μmol/L 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid (AUDA)	12	17.04 ± 5.62	.006
10 μmol/L N-methylsulfonyl-12,12-dibromododec-11-enamide (DDMS)	12	24.87 ± 7.02	.003

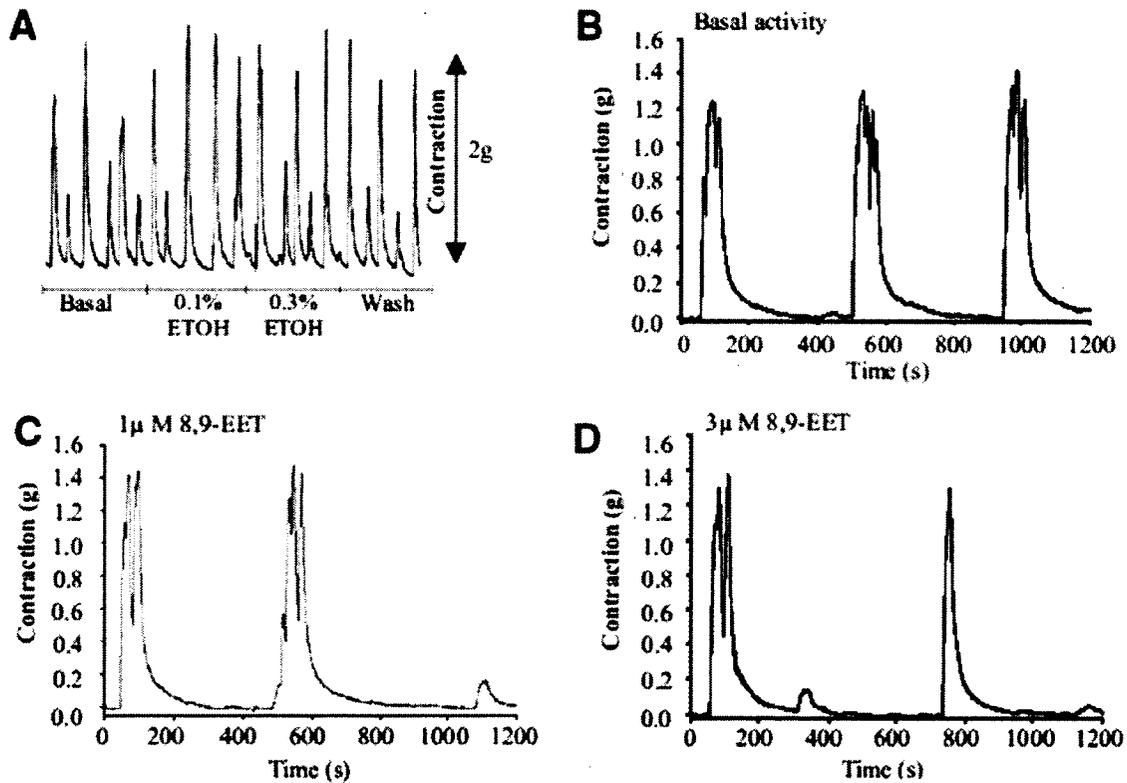
Effect of N-methylsulfonyl-6-[2-propargyloxyphenyl] hexanamide (a cytochrome P-450 epoxigenase inhibitor), 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid, and N-methylsulfonyl-12,12-dibromododec-11-enamide (a cytochrome P-450 ω-hydroxylase inhibitor) on myometrium contractile activity. Values are given as the net relaxing effect (percentage values are given as the overall relaxing effect of the enzymatic inhibitor minus the mean effect that was observed in the presence of vehicle on control strips).

Corriveau. Epoxyeicosanoids display tocolytic effects. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

Since the inhibition of eicosanoid degradation resulted in relaxing effects, we further tested the effect of two exogenous EET regioisomers (8,9-EET and 14,15-EET) on myometrial strips. Both substances were chosen because of their tocolytic activities previously detected in the rat uterus on day 19 of gestation (8). Typical recordings of the contractile activity from human myometrial strips are shown in Figures 3. Control recordings revealed a rhythmic activity with a 280-second periodicity (Figure 3A) and contractile events up to 2 g. Figures 3B through D show typical contractile events on an extended time scale in basal activity and upon eicosanoid addition. Upon addition of 3 μM 8,9-EET, the frequency as well as duration of the phasic contractions were slightly reduced (Figure 3D). Both control and resulting activities were quantified as the area under the curve (AUC) for 20-minute intervals and expressed as the percentage of changes for AUC, for all three substances tested at two exogenous concentrations (Table 3). Mean maximum inhibition (MMI) of 28.30 ± 4.84 (p <0.001) and 41.02 ± 6.50 (p

<0.001) were obtained for 1 and 3 μM 8,9-EET, respectively; MMI of 10.31 ± 5.19 ($p = 0.033$) and 35.04 ± 6.62 ($p < 0.001$) were detected for 1 and 3 μM 14,15-EET while identical concentrations of 20-HETE yielded MMI of 7.40 ± 13.51 ($p = 0.49$) and 33.39 ± 8.53 ($p = 0.005$) respectively. However, the effect of 20-HETE was only statistically significant at a concentration of 3 μM . These data further confirm the tocolytic effects of the eicosanoids tested.

FIGURE 3
Pharmacologic effect of exogenous addition
of 8,9-epoxyecosatrienoic acid (EET)



A, Typical recording of rhythmic contractile activity in the absence and the presence of the vehicle (100% ethanol [ETOH]: 0.1 and 0.3%). **B**, Recording over a 20-minute period of basal activity. **C**, On addition of 1 $\mu\text{mol/L}$ 8,9-EET and **D**, 3 $\mu\text{mol/L}$ 8,9-EET in the physiologic bath solution. 8,9-EET additions resulted in lower contraction frequency of the spontaneous activities.

Corriveau. Epoxyeicosanoids display tocolytic effects. Am J Obstet Gynecol 2009.

TABLE 3

Mean maximal inhibition (MMI) values produced by eicosanoids on human myometrium contractile activities

Eicosanoid	Concentration	MMI (% ± SEM)	P value
8,9-Epoxyeicosatrienoic acid	1 μmol/L	28.3 ± 4.89	< .001
	3 μmol/L	41.03 ± 6.50	< .001
14,15-Epoxyeicosatrienoic acid	1 μmol/L	10.31 ± 5.19	.034
	3 μmol/L	35.04 ± 6.55	.001
20-Hydroxyeicosatetraenoic acid	1 μmol/L	7.40 ± 13.51	.486
	3 μmol/L	32.39 ± 8.73	.008

Values are given as the relative tocolytic effects that were induced by the eicosanoid.

Corriveau. Epoxyeicosanoids display tocolytic effects. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

COMMENT

In the present study, we investigated the ability of two EET regioisomers and a congener 20-HETE to modulate the contractile activity recorded from human gravid myometrium. This is the first report directly assessing the pharmacological and mechanical effects of these eicosanoids on the human uterus. Since both EETs displayed concentration-dependent tocolytic effects, it could be hypothesized that these biochemical agents could modulate either spontaneous cell membrane excitation (delayed triggering of action potential), efficiency of contraction or electro-mechanical coupling, which usually involve Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from internal stores in uterine smooth muscle cells (12). In other smooth muscle tissues such as arteries and bronchi, the relaxing effects of EET have been linked to the activation of BK_{Ca} channels, as well as a decrease in myofilament Ca^{2+} sensitivity (13), this reduction in sensitivity being recently reported to be associated with a decrease in CPI-17 protein phosphorylation (5). Thus, we propose that eicosanoids, such as 8,9- and 14,15-EET, may play a key regulatory role in the fine tuning of human gravid myometrium.

Enzymological profile. Our data reveal the presence, in most tissues tested, of three immune-reactive bands at 55, 56 and 58 kDa, corresponding respectively to CYP450 epoxygenase-2J2, 2C9 and soluble epoxide hydrolase. The presence of these enzymes in human gravid myometrium at term strongly suggests the production and degradation of endogenous epoxy-eicosanoids in these tissues. In addition, a tocolytic effect was also quantified following inhibition of sEH by AUDA. This effect could be explained by a reduced endogenous degradation of EET, increased intracellular concentration and enhanced modulating effect on spontaneous contractile activity. These results are consistent with an increased half-life of the bioactive compounds and their extended effects, hence suggesting the likelihood of an endogenous production of EET in the myometrium of pregnant women. Indeed, endogenous EET have been shown to be present in this type of smooth muscle during pregnancy (14, 15).

Use of pharmacological tools. sEH inhibition by AUDA was less potent than ω -hydroxylase inhibition by DDMS (Table 2) suggesting that the inhibition of ω -hydroxylase facilitates the production of epoxy-eicosanoids from endogenous AA. Thus, a reduced production of endogenous 20-HETE may also facilitate or shift the formation of endogenous EET from a common pool of AA (Figure 1). This effect of DDMS may indeed reflect the effect of endogenous EET production. The interpretation of this result could be in question since addition of exogenous 20-HETE induced a tocolytic effect at higher concentrations. However, a net increase of 30 to 40 % in MMI was quantified upon exogenous addition of EET regioisomers (1-3 μ M of either 8,9-EET or 14,15-EET). We have also observed that the 8,9-EET was more potent than 20-HETE (Table 3). Moreover, endogenous production of 8,9-EET was reported to be the more abundant regioisomer in human intrauterine tissues (15). These concentration-dependent tocolytic effects further support our working hypothesis and are consistent with previous results reported in pregnant rat myometrium under identical experimental conditions (8).

Alternative pathways. The prostaglandin (PG) pathway does not appear to be directly involved in the balance between the above eicosanoids (20-HETE / EET), since PG molecules are known to increase the contractile activity of human gravid myometrium at term (16). However, the use of COX inhibitors reduces PG synthesis from free AA and thus likely facilitates the endogenous production of eicosanoids due to the well-described shunt effect (6).

In conclusion, epoxy- and hydroxy-eicosanoids represent novel, arachidonic acid-derived, bioactive compounds displaying tocolytic activities in human pregnant myometrium. Findings also suggest that soluble epoxide hydrolases may represent relevant pharmacological targets under patho-physiological-conditions. Forthcoming studies will be needed to better understand the exact mode of action of eicosanoids on human uterine fibers. For instance, it would be of interest to assess these pathways under patho-physiological conditions as well as assess the effects and modes of action of epoxy-eicosanoids in an animal model *in vivo*, prior to any clinical investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. John R. Falck for the gift of MS-PPOH and DDMS, Dr B. Hammock for the gift of AUDA and specific sEH antibody, as well as Mr. Pierre Pothier for critical review of the manuscript. This work was supported by the Fondation des Étoiles grant to JCP. S.C. was recipient of a summer studentship from the FRSQ. E.R. is a member of the Respiratory Health Network of the FRSQ.

REFERENCES

1. Public Health Agency of Canada. Canadian perinatal health report. 2003.
2. Garfield ER, Shi SQ, Maner LW. Electrical control of and assessment of uterin contractility. In: Jean-Pierre Savineau, editor. Trivandrum, India: Transworld Research Network; 2007. p.551-82.
3. Lopez Bernal A. The regulation of uterine relaxation. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(3):340-7.
4. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science.* 1999; 285(5431):1276-9.
5. Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: Putative role of CPI-17. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 38(2):192-201.
6. Rousseau E, Morin C, Hallé C, Monet-Boucher V, Otis C. EETs and 20-HETE modulate smooth muscle reactivity and other metabolic processes. In: *New frontiers in smooth muscle biology and physiology.* Jean-Pierre Savineau; 2007. p.291-308.
7. Morin C, Rousseau E. Effects of 5-oxo-EET and 14,15-EET on reactivity and Ca²⁺ sensitivity in guinea pig bronchi. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007; 82(1-4):30-41.
8. Girard I, Berthiaume M, Corriveau S, Rousseau E, Pasquier JC. Are eicosanoids a new class of tocolytics in pregnant rat myometrium? *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197(6):s128.
9. Doheny HC, Lynch CM, Smith TJ, Morrison JJ. Functional coupling of {beta}3-adrenoceptors and large conductance calcium-activated potassium channels in human uterine myocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 /10/1; 90(10):5786-96.

10. Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, Smith TJ, Morrison JJ. Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195(2):504-9.
11. Jacobs ER and Zeldin DC. The lung HETEs (and EETs) up. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol*. 2001; 280(1):H1-10
12. Kawarabayashi T, Kishikawa T, Sugimori H. Effect of oxytocin on spontaneous electrical and mechanical activities in pregnant human myometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 155(3):671-6.
13. Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. Functional effects of 20-HETE on human bronchi: Hyperpolarization and relaxation due to BKCa channel activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293(4):L1037-44.
14. Patel L, Sullivan MH, Elder MG. Production of epoxygenase metabolite by human reproductive tissues. *Prostaglandins*. 1989; 38(6):615-24.
15. Zhang JH, Pearson T, Matharoo-Ball B, Ortori CA, Warren AY, Khan R, et al. Quantitative profiling of epoxyeicosatrienoic, hydroxyeicosatetraenoic, and dihydroxyeicosatetraenoic acids in human intrauterine tissues using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2007; 365(1):40-51.
16. Juchau MR, Namkung MJ, Rettie AE. P-450 cytochromes in the human placenta: Oxidations of xenobiotics and endogenous steroids. *Thromphoblast Res*. 1987; 2:235-63.

Article 2

Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors reveal a complementary role of arachidonic acid derivatives

Corriveau Stéphanie, Berthiaume Maryse, Rousseau Éric et Jean-Charles Pasquier

Article publié, American Journal of Obstetrics and Gynaecology (AJOG), 2010 sept., volume 203 (3), p. 266-273

Avant propos

Ce travail étudie l'équilibre entre la voie des lipoxgénases et la voie des cycloxygénases dans le myomètre de femme enceinte à terme par l'intermédiaire du modèle *in vitro* appliquée dans le projet précédent.

Ce travail représente la suite logique de mon projet de maîtrise afin d'étudier les effets des dérivés de l'acide arachidonique dans le myomètre utérin chez la femme enceinte à terme. J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations et améliorées les protocoles tirées de la littérature, sous l'assistance de Mme Maryse Berthiaume. Les implications et les conclusions ont été discutées avec les Dr Éric Rousseau et Jean-Charles Pasquier.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to assess the involvement of lipoxygenase (LOX) metabolic pathways in uterine tissues from pregnant women as well as the combined inhibition of LOX and cyclooxygenase (COX) on contractile activity. **Study design:** Uterine biopsies were performed, from consenting women undergoing elective caesarean sections at term (N=24). Western blot analysis and isometric tension measurements were performed *in vitro* on fresh human myometrial strips. Concentration-response curves to AA861 and baicalein (5- and 12-LOX inhibitors respectively) were performed. The combined effects of baicalein and indomethacin were also assessed. Contractile activities were quantified by calculating both amplitude and area under the curve over 20 minute periods. **Results:** 5- and 12-LOX were present in all tested tissues. Addition of AA861 or Baicalein resulted in tocolytic effects ($p < 0.05$). Finally, the combined inhibition of both COX and 12-LOX pathways resulted in additive tocolytic effects. **Conclusion:** 5- and 12-lipoxygenase pathways modulate human myometrium contractility.

Keywords: 5-LOX, 12-LOX, Indomethacin, tocolytics, uterine contractile activity.

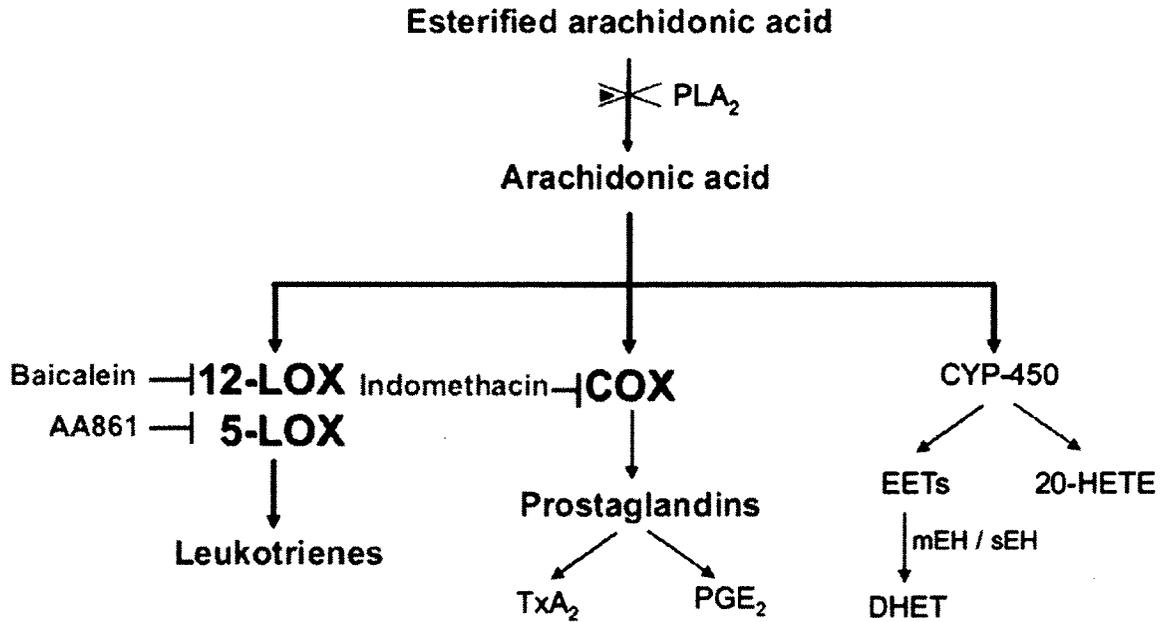
Abbreviations: Epoxyeicosatrienoic acid (EET), arachidonic acid (AA), Lipoxygenase (LOX), cyclooxygenase (COX).

INTRODUCTION

Preterm birth is a growing problem in all developed countries with spontaneous preterm birth representing half of cases ^{1, 2, 3}. The most important treatment for preterm labor is tocolytic drugs, although their efficacy is very limited. Current treatments can only prolong pregnancy for no more than 48 hours ^{4,5}.

Numerous studies have assessed the role of arachidonic acid metabolites on myometrium contractile activity during pregnancy. At the present time, it is well known that prostaglandins (PG) have important effects on the contractile activity of the mammalian myometrium as well as a key role in parturition ^{6, 7, 8, 9}. In 2004, indomethacin, a COX inhibitor, was considered as the most commonly-used drug for the treatment of preterm labor in Canada¹⁰. A second pathway has also been recently described within the arachidonic acid metabolic pathway, namely the epoxy-eicosanoid pathway. Indeed, studies have demonstrated the presence of the CYP-450 enzymes that produces EETs and 20-HETE in the myometrium which have been depicted as having putative tocolytic properties ^{11,12,13}. Finally, a third pathway involves the leukotriene branch of arachidonic acid metabolism, as illustrated in Figure 1.

FIGURE 1
Diagram of arachidonic acid metabolic pathways



PLA₂, phospholipase A₂; *TxA₂*, thromboxane A₂; *PGE₂*, prostaglandin E₂; *mEH*, microsomal epoxide hydrolase; *sEH*, soluble epoxide hydrolase; *DHET*, dihydroxyl derivatives of EETs; *CYP-450*, cytochrome P450.

Corriveau. 5- and 12-LOX pathways modulate human myometrium contractility. Am J Obstet Gynecol 2010.

Leukotrienes are synthesized by stepwise chemical modifications of arachidonic acid by the action of lipoxygenases (LOX). The presence of the 5-, 12- and 15- LOX isoforms has been detected in uterine tissue at different stages of pregnancy in baboons and in humans^{14,15,16}. The human amnion, chorion, deciduas and placenta synthesize various compounds such as hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and leukotrienes (LTs) which may be involved in the onset of labor^{17,18,16}. Since leukotrienes (LTC₄, LTD₄) increase uterine contractile activity, it has been proposed that LOX inhibitors could display tocolytic effects¹⁹⁻²¹ and consequently be of potential interest as pharmacological agents in the treatment of preterm labor.

However, no study has addressed the effects of LOX inhibitors on human uterine contractile activity. The aim of this present work was to investigate the involvement of leukotriene metabolic pathways in uterine tissues from pregnant women as well as the effect of the combined addition of COX and LOX inhibitors on spontaneous uterine contractile activity.

MATERIALS AND METHODS

Study population. Patients admitted for an elective cesarean section were asked to participate in the study. All patients have a low transverse hysterotomy incision. The study was approved by our institutional Ethics Committee for research on human subjects (project # 09-040; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00939744) and all volunteers gave written informed consent. The inclusion criteria were (1) a gestational age between 37^{0/7} and 40^{0/7} weeks of gestation, (2) a singleton gestation, (3) no labor and (4) a signed informed consent. Women were excluded if presence of infections (chorioamionitis, HIV, genital herpes, hepatitis B and C) or vaginal bleeding after the third trimester. Medical data were obtained from the patients' medical files.

Sample collection. During the C-section, immediately after delivery of the baby but prior to maternal injection of Oxytocin, all biopsies of myometrium were excised from the upper lip of the lower uterine segment incision in the midline. Placenta biopsies (1 cm³) were sampled immediately after removal in periphery on the maternal face and the membranes were sampled free of placenta, in a systematic manner by the same investigator. Once collected, all tissue biopsies were placed in Krebs-Heinseleit physiological salt solution (Krebs) of the following composition (mmol/l): 4.7 potassium chloride, 118 sodium chloride, 1.2 magnesium sulfate, 2.5 calcium chloride, 1.2 potassium phosphate, 25 sodium bicarbonate and 11.1 glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at pH 7.4. Tissues were stored at 4°C and used within 24 hours of collection or were rapidly rinsed before snap freezing in liquid N₂ and subsequently stored at -80°C until analysis.

Western blot analysis. Subcellular fractions (cytosolic and microsomal) were prepared from myometrium, fetal membranes and placenta and separated on SDS PAGE as previously described¹¹. For Western blot analysis, membranes were blocked for 2 hours

with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween at room temperature. Blots were incubated overnight at 4 °C with rabbit antiserum raised against either 5-LOX or 12-LOX proteins (Abcam, MA, USA). After washing, the membranes were incubated in a solution containing peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG antiserum (Amersham, QC, Can). Enhanced chemi-luminescence kit (Roche, QC, Can) was used to detect protein labeling.

Isolated organ bath experiments. Longitudinal myometrial strips (measuring approximately 2 × 2 × 10 mm) were dissected, cleansed of adherent myometrial tissue and mounted for isometric recording under 2 g of resting tension in an organ bath system as previously described^{22,23}. The tissue baths contained 10 ml of Krebs solution maintained at 37°C, pH 7.4, and were continuously gassed with a mixture of 95 % oxygen / 5 % carbon dioxide. Myometrial strips were allowed to equilibrate for at least 2 hours, after which a 30-minute period was allotted to achieve spontaneous phasic contractions. Passive and active tensions were assessed using transducer systems (Radnoti Glass Tech., Monrovia, CA) coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) for facilitating data acquisition and analysis¹¹.

Drugs and chemical reagents. AA861(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), baicalein (Cayman Chemical, MI, USA) and indomethacin (Cayman Chemical, MI, USA) were dissolved in 100 % ethanol (EtOH) and stored as 10 mM stock solutions. Final bath concentration of EtOH never exceeded 0.3 %. Exogenous inhibitors were added separately to the tissue bath or in a cumulative manner at increasing concentrations (10 nM to 10 µM) in 30-minute intervals. Two sets of control experiments were performed as follows: in control 1 (time), strips were exposed to Krebs solution only for up to 6 hours; in control 2, strips were exposed to Krebs solution and vehicle (ethanol). Fresh Krebs solution was prepared daily.

TABLE 1
Demographic data of patients
included in the study

Variable	Number of patients (n = 24)
Maternal age, y	
<20	1 (4.16%)
20–35	18 (75.0%)
≥35	5 (20.8%)
Ethnicity	
	Caucasian (100%)
Parity	
Nulliparous	4 (16.7%)
Multiparous	20 (83.7%)
BMI, kg/m²	
<20	3 (12.5%)
20–25	8 (33.3%)
>25	13 (54.16%)
Indications for cesarean section	
Pregnancy complications ^a	3 (12.5%)
Breech presentation	9 (37.5%)
Previous cesarean section	12 (50%)

BMI, body mass index.

^a Pregnancy complications include placenta previa and a previous long and difficult delivery.

Corriveau. 5- and 12-Lipoxygenase pathways modulate human myometrium contractility. *Am J Obstet Gynecol* 2010.

Data analysis and statistics. The amplitude and area under the curves (AUC) for isometric tension studies were calculated on raw recordings from independent myometrial strips. The effect of pharmacological agents and respective controls were assessed by calculation of AUC for each 30 min interval. Values were normalized as a percentage of the AUC obtained in the 30-min basal activity period and were corrected for the reduction in contractile activity observed with the vehicle (Control 2) such that the provided mean maximum inhibition values (MMI) represent net inhibition. Contractile activities were quantified by calculating the amplitude and the area under the curve for each experimental conditions using Sigma Plot 11.0 (SPSS-Science, Chicago, IL). Data were not normally distributed and were therefore analyzed with nonparametric tests. The Wilcoxon signed rank test was used for paired results and the Mann-Whitney test for

unpaired results. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Study population. The study group comprised 24 healthy white Caucasian pregnant women with a mean age of 30.2 years (range 19 to 44; Table 1). Participants underwent cesarean delivery between 37^{0/7} and 40^{0/7} weeks of gestation (mean age: 38^{6/7} weeks of

gestation) with a mean BMI of 26.5 (range 17 to 47). Indications for a cesarean section included previous C-sections (n = 12), placenta previa (n = 3) and breech position (n = 9). The majority of pregnant women were non-smoking (83%).

Western blot analysis of uterine tissues. In this study, only 5- and 12-LOX protein isoforms have been quantified because a previous study had shown that 5- and 12-LOX mRNA were the most important transcripts in baboon¹⁴. Using a primary antibody raised against 5-LOX, an immunoreactive band was consistently detected at 78 kDa (Figure 2A). This band was predominantly detected in the microsomal fraction from myometrium, fetal membranes and placenta. The molecular weight standard protein was used as negative control whereas the positive control was detected (data not shown). Figure 2 B reveals specific immuno-staining of a protein band at 73 kDa with the 12-LOX antibody. This band was detected in all tested cytosolic and microsomal samples. These results hence demonstrate the presence of both 5- and 12-LOX isoforms in uterine tissues and particularly in the myometrium.

FIGURE 2
Western blot analysis of the different subcellular
fractions using either 5- or 12-LOX antibodies

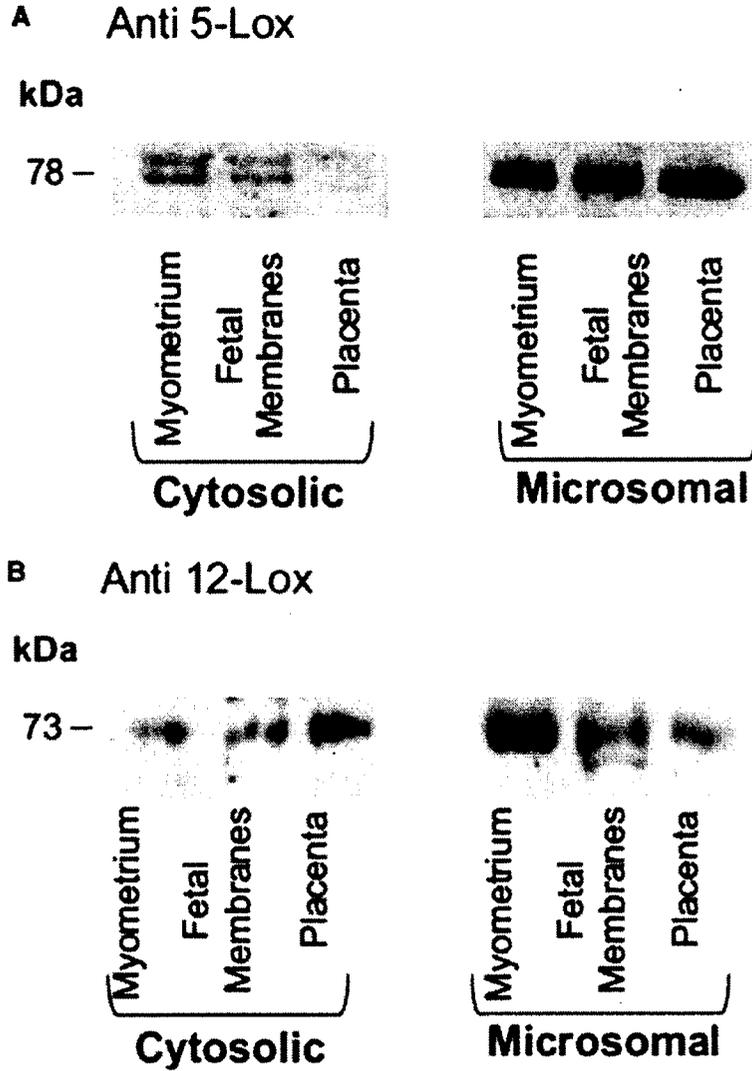


FIGURE 2. Western blot analysis of the different subcellular fractions using either 5- or 12- LOX antibodies. A) Cytosolic and microsomal fractions from Myometrium, Fetal membranes (chorion and amnion) and Placenta were probed with 5-LOX primary antibody. An immunoreactive 78 kDa band was detected in all tested tissues compared to the positive control (not shown). B) Cytosolic and microsomal fractions probed with the 12-LOX antibody. An immunoreactive band at 73 kDa was detected in all tested tissues and subcellular fractions.

FIGURE 3
Pharmacological effects of exogenous addition of 5- and 12-LOX inhibitors on spontaneous contractile activity of freshly isolated human myometrium

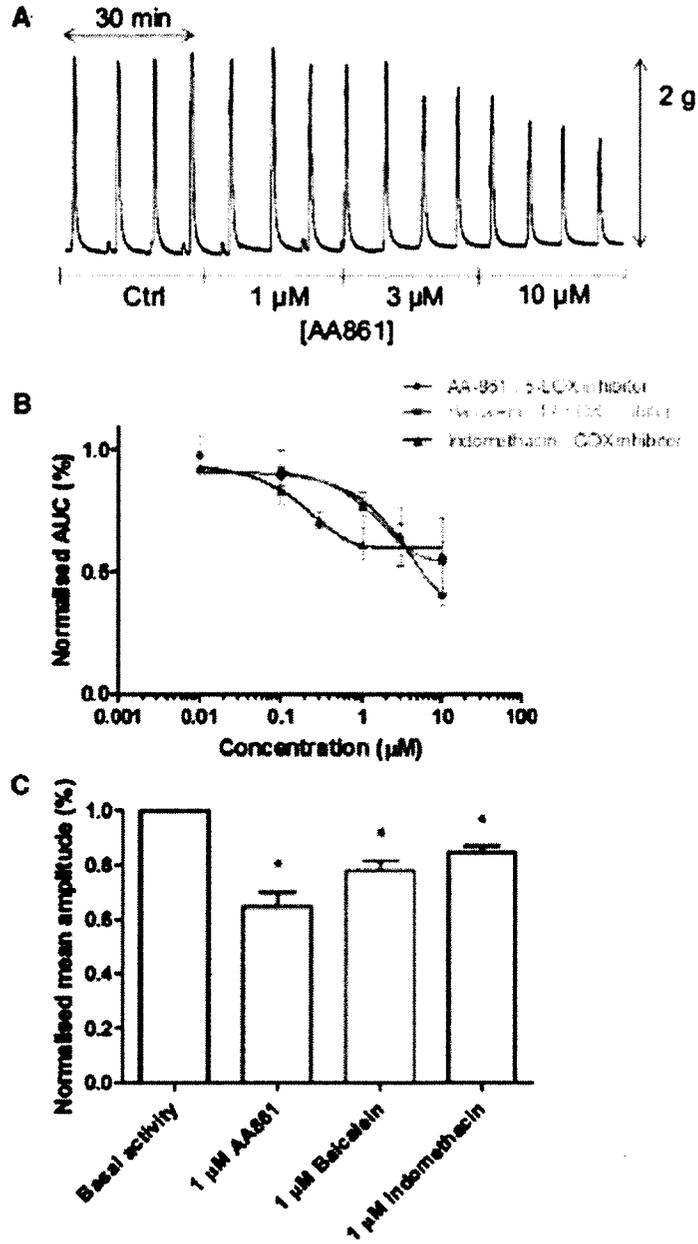


FIGURE 3. Pharmacological effects of exogenous addition of 5- and 12-LOX inhibitors on spontaneous contractile activity of freshly isolated human myometrium. A) Typical recording of the basal rhythmic contractile activity followed by exogenous additions of AA861 (5-LOX inhibitor) over 30-min periods. B) Cumulative concentration-response curve (CCRC) to LOX and COX inhibitors on spontaneous contractile activities in human myometrium strips (n=8 for each compound). C) Modification of maximal amplitude of pregnant uterus contractions by LOX and COX inhibitors.

Mechanical effects of LOX and COX inhibitors. In the second phase of the study, LOX and COX inhibitors were tested and their relative effects compared. Control recordings revealed rhythmic activities with a frequency of 9 contractions per hour and contractile amplitudes of up to 2 g (Figure 3A). No significant inhibitory effect was observed when comparing the area under the curve (AUC) between time control and ethanol control ($p = 1.00$; $p = 0.310$; data not shown). Inhibitors were added to the isolated organ bath at 10 nM to 10 μ M concentrations. There was no significant effect of AA861, baicalein or indomethacin on resting tone. Figure 3A displays contractile activities after a control period (30 minutes) and cumulative additions of AA861 (1 to 10 μ M). All three inhibitors displayed similar cumulative concentration-response curves (CCRC; Figure 3B). Indeed, a significant decrease in AUC was observed from 1 μ M to 10 μ M for both AA861 and baicalein while indomethacin produced a significant decrease in AUC from 0.1 μ M onward. Data quantification of the AUC demonstrated tocolytic effects reaching 24.43 %, 36.85 % and 38.25 % for 3 μ M AA861, baicalein and indomethacin respectively (Table 2). Hence, baicalein and indomethacin displayed similar potency (AA861 vs. indomethacin, $p = 0.84$; baicalein vs. indomethacin, $p = 0.90$), hence demonstrating tocolytic effects for both LOX and COX inhibitors.

TABLE 2
Comparative tocolytic effects of LOX and COX inhibitors

Conc. Variable	AA861			Baicalein			Indomethacin		
	n	MMI (%) \pm SEM	P value	n	MMI (%) \pm SEM	P value	n	MMI (%) \pm SEM	P value
0.1 μ M	6	10.78 \pm 0.04	.06	6	9.10 \pm 0.08	.06	12	16.65 \pm 0.05	.02
1 μ M	8	23.29 \pm 0.03	.01	8	23.35 \pm 0.06	.01	12	38.24 \pm 0.07	.003
10 μ M	6	59.57 \pm 0.07	.01	8	45.71 \pm 0.08	.01	4	42.99 \pm 0.16	.003

Effect of baicalein (12-LOX inhibitor), AA861 (5-LOX inhibitor), and indomethacin (COX inhibitor) on spontaneous myometrium contractile activity. Values are given as the net inhibitory effect (percentage values are given as the overall effect of enzymatic inhibitors minus the mean effect observed in the presence of vehicle on control strips). Values indicated MMI (%) \pm SEM. A signed rank test was used as statistical test for the P values reported in this table.
 Conc.: concentration; COX: cyclooxygenase; LOX: lipoxygenase; MMI: mean maximum inhibition values; SEM: standard error of the mean.
 Corriveau. 5- and 12-LOX pathways modulate human myometrium contractility. *Am J Obstet Gynecol* 2010.

The effects on amplitude were further quantified at 1 μ M for each inhibitor (Figure 3C). The mean amplitude did not vary between groups during the control period (0.9658 g \pm 0.0724 g), whereas mean normalized amplitude was decreased upon addition of AA861 (36.50 % \pm 5.29 %), baicalein (22.29 % \pm 3.77 %) and indomethacin (15.48 % \pm 2.57 %),

respectively. However, the inhibition of the maximal amplitude of uterine contractions appeared to be more important with the use of AA861.

Concomitant inhibition of COX and LOX pathways. As the inhibition of leukotriene formation resulted in inhibitory effects, we further assessed the combined effect of LOX and COX inhibitors on myometrial strips. Concentration of LOX and COX inhibitors were chosen in consideration of their respective IC_{25} on AUC as previously determined: 3 μ M AA861, 3 μ M baicalein and 0.3 μ M indomethacin. As can be seen in Figure 4A, there was no additive effect of the addition of indomethacin and AA861. On the other hand, an additive tocolytic effect was observed following the combined addition of indomethacin and baicalein (Figure 4B).

FIGURE 4
Resulting effect from the inhibition of LOX and COX pathways
on spontaneous myometrium contractile activities

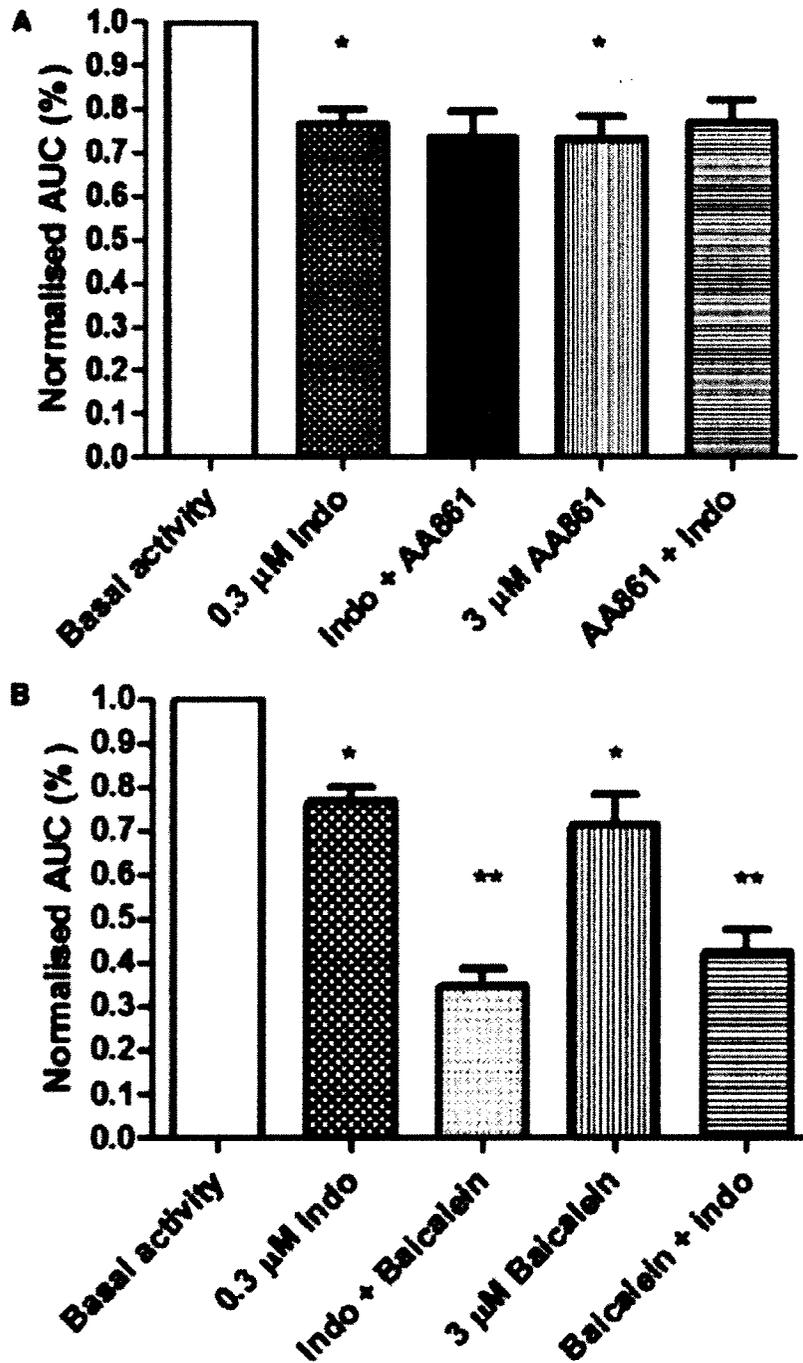


FIGURE 4. Resulting effect from the inhibition of LOX and COX pathways on spontaneous myometrium contractile activities. A) Combined effects of 0.3 µM indomethacin and 3 µM AA861 (n=12). B) Combined effects of 0.3 µM indomethacin and 3 µM baicalein (n=12). * p < 0.05 ** p < 0.01

COMMENT

Principal findings of the study. The present study enabled to demonstrate the presence of two lipoxygenase isoforms in uterine associated tissues. More specifically, results show that both 5- and 12-LOX were associated with subcellular fractions and that specific inhibition of these isoforms resulted in a decrease in the area under the curve with a major effect on mean amplitude of uterine phasic contractions. This study also assessed for the first time the combined effect of the COX inhibitor, indomethacin, and the 12-LOX inhibitor, baicalein, and revealed a consistent additive tocolytic effect.

Population. There is significant variation in the BMI of the women included in the present study. On the other hand, because of the small sample size, regression analysis was not possible according to this limitation. Nulliparity (16.7 %) may also play a role on the effectiveness of these agents. Moreover, it would be of interest to further assess the effects of LOX inhibitors under pathophysiological conditions (preterm labor, hypertonic).

Detection of LOX isoforms. The presence of 5- and 12-LOX in associated uterine tissues suggests an endogenous production of leukotrienes and 12-HpETE derivatives in the myometrium of pregnant women, whereas fetal membranes and placenta could represent an additional location for LOX isoforms and leukotriene signaling¹⁴. The presence of these enzymes in all tested tissues underlines the importance of decidual-placental integrity and also supports a putative cross-talk between the various uterine leaflets (decidua, fetal membranes and placenta)^{24, 25,26}. Thus, it would be of prime interest to assess LOX expression in uterine tissues under various conditions such as labor, preterm labor as well as post-term.

Tocolytic effect of LOX inhibitors. The decrease in amplitude was found to be greater with the 5-LOX inhibitor (AA861) than with the COX inhibitor (indomethacin). The amplitude of the contractile signal results from a larger amplitude and faster kinetics of Ca^{2+} signals, either through Ca^{2+} entry (calcium current - I_{Ca}) or Ca^{2+} release from intracellular stores²⁷. This is also related to the interactions of acto-myosin cross-bridges due to MLCK activation upon Ca-CaM complex formation. According to their effects on contractile activities, LOX inhibitors could reduce either calcium signaling or contractile protein interaction which may explain the important reduction in the amplitude of spontaneous contractions with AA861^{8,28,29}. Hence, both LOX and COX inhibitors showed concentration-dependent tocolytic effects on spontaneous contractile activities which confirm that both pathways synthesize uterotonic agents^{21,30}.

Crosstalk between LOX and COX pathways. The combined addition of indomethacin and AA861 (5-LOX inhibitor) had only a partial tocolytic effect, regardless of the order in which the compounds were added. This unexpected result could be explained by different mechanisms, the first being a weaker relative contribution of 5-LOX metabolites (Leukotrienes, 5-HETE) compared to 12-LOX metabolites (12-HpETE). Specifically, the 5-LOX inhibitor (AA861) minimizes the production of leukotrienes which are known to produce tonic responses on uterine contractile activities at the end of pregnancy¹⁶. Moreover, 5-LOX is the key enzyme involved in leukotriene biosynthesis and catalyzes the initial steps in the conversion of arachidonic acid to these biologically-active lipid mediators, which are known to exert pro-inflammatory effects *in vivo*^{31, 32}. Increasing evidence suggests that parturition has many of the hallmarks of an inflammatory reaction³³. However, in the present study, there was no evidence indicating a *status inflammatus* in the pregnant women population. Alternatively, this result could also be explained by nonspecific effects of the inhibitor, although AA861 is one of the most specific inhibitors available on the market.

In contrast, the combined addition of indomethacin and baicalein (12-LOX inhibitor) induced additive tocolytic effects. This latter effect could result from a metabolic shunt toward another arachidonic acid pathway. For instance, LOX and COX pathway inhibition could facilitate the epoxy-eicosanoids pathway (see Figure 1). An increase in bioavailability of epoxy-eicosanoids would thus result in a tocolytic effect as previously demonstrated¹¹.

LOX activation is known to be under the control of a 5-LOX activating protein (FLAP)¹⁵. Thus, it would also be of interest to study the putative effect of FLAP inhibitors on the spontaneous contractile activities in pregnant women.

In conclusion, the present work highlights the implication of LOX pathways in pregnant women myometrium. Despite the fact that the respective contribution of all three arachidonic acid pathways is difficult to demonstrate, we nonetheless demonstrate an additive effect between LOX and COX inhibitors which suggest a putative metabolic “shunt” toward the CYP450 epoxygenase pathway. These results further underscore the need for improved tocometric and obstetrical diagnostics for a better understanding of contractile pathophysiology in order to optimize pharmacological management such as the use of tocolytic drugs during preterm labor.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Mr. Pierre Pothier for critical review of the manuscript. This work was supported by the FRSQ grant to JCP. S.C. was a recipient of a Masters studentship from the Stars Foundation. E.R. is a member of the Respiratory Health Network of the FRSQ: <http://rsr.chus.qc.ca>.

REFERENCES

1. Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG*. 2003 Apr;110 Suppl 20:30-3.
2. West SL, Yawn BP, Thorp JM, Korhonen MJ, Savitz DA, Guess HA. Tocolytic therapy for preterm labour: Assessing its potential for reducing preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001 Jul;15(3):243-51.
3. Public Health Agency of Canada. Canadian perinatal health report. 2003.
4. Hearne AE, Nagey DA. Therapeutic agents in preterm labor: Tocolytic agents. *Clin Obstet Gynecol*. 2000 Dec;43(4):787-801.
5. Olson DM, Christiaens I, Gracie S, Yamamoto Y, Mitchell BF. Emerging tocolytics: Challenges in designing and testing drugs to delay preterm delivery and prolong pregnancy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2008 Dec;13(4):695-707.
6. Fischer DP, Hutchinson JA, Farrar D, O'Donovan PJ, Woodward DF, Marshall KM. Loss of prostaglandin F2alpha, but not thromboxane, responsiveness in pregnant human myometrium during labour. *J Endocrinol*. 2008 Apr;197(1):171-9.
7. Terry KK, Lebel WS, Riccardi KA, Grasser WA, Thompson DD, Paralkar VM. Effects of gestational age on prostaglandin EP receptor expression and functional involvement during in vitro contraction of the guinea pig uterus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Jan;78(1):3-10.
8. Hertelendy F, Zakar T. Prostaglandins and the myometrium and cervix. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004 Feb;70(2):207-22.
9. Gibb W. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med*. 1998 Jun;30(3):235-41.

10. Hui D, Liu G, Kavuma E, Hewson SA, McKay D, Hannah ME. Preterm labour and birth: A survey of clinical practice regarding use of tocolytics, antenatal corticosteroids, and progesterone. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007 Feb;29(2):117-30.
11. Corriveau S, Berthiaume M, Rousseau E, Pasquier JC. Why eicosanoids could represent a new class of tocolytics on uterine activity in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Oct;201(4):420.e1,420.e7.
12. Pearson T, Warren AY, Barrett DA, Khan RN. Detection of EETs and HETE-generating cytochrome P-450 enzymes and the effects of their metabolites on myometrial and vascular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Sep;297(3):E647-56.
13. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S52-6.
14. Smith GC, Wu WX, Nathanielsz PW. Lipoxygenase gene expression in baboon intrauterine tissues in late pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod.* 2001 Jun;7(6):587-94.
15. Brown NL, Slater DM, Alvi SA, Elder MG, Sullivan MH, Bennett PR. Expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human fetal membranes throughout pregnancy and at term. *Mol Hum Reprod.* 1999 Jul;5(7):668-74.
16. Walsh SW. Evidence for 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) and leukotriene C4(LTC4) in the onset of labor. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;622:341-54.
17. Zhang JH, Pearson T, Matharoo-Ball B, Ortori CA, Warren AY, Khan R, et al. Quantitative profiling of epoxyeicosatrienoic, hydroxyeicosatetraenoic, and dihydroxyeicosatetraenoic acids in human intrauterine tissues using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2007 Jun 1;365(1):40-51.

18. Romero R, Emamian M, Wan M, Grzybowski C, Hobbins JC, Mitchell MD. Increased concentrations of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in amniotic fluid during parturition. *Obstet Gynecol.* 1987 Dec;70(6):849-51.
19. Weichman BM, Tucker SS. Contraction of guinea pig uterus by synthetic leukotrienes. *Prostaglandins.* 1982 Aug;24(2):245-53.
20. Ledwozyw A, Kadziolka A. Effects of nifedipine and verapamil on cysteinyl leukotriene-induced contractions of the sheep uterus. *Pol Arch Weter.* 1989;29(1-2):189-200.
21. Bryman I, Hammarstrom S, Lindblom B, Norstrom A, Wikland M, Wiqvist N. Leukotrienes and myometrial activity of the term pregnant uterus. *Prostaglandins.* 1985 Dec;30(6):907-13.
22. Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, Smith TJ, Morrison JJ. Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(2):504-9.
23. Doheny HC, Lynch CM, Smith TJ, Morrison JJ. Functional coupling of β_3 -adrenoceptors and large conductance calcium-activated potassium channels in human uterine myocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 /10/1;90(10):5786-96.
24. Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE. TRPV4 forms a novel Ca^{2+} signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res.* 2005 Dec 9;97(12):1270-9.
25. Faber BM, Metz SA, Chegini N. Immunolocalization of eicosanoid enzymes and growth factors in human myometrium and fetoplacental tissues in failed labor inductions. *Obstet Gynecol.* 1996 Aug;88(2):174-9.
26. Schafer WR, Zahradnik HP, Arbogast E, Wetzka B, Werner K, Breckwoldt M. Arachidonate metabolism in human placenta, fetal membranes, decidua and

myometrium: Lipoxygenase and cytochrome P450 metabolites as main products in HPLC profiles. *Placenta*. 1996 May;17(4):231-8.

27. Wray S, Burdyga T, Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):397-407.

28. Di Capite J, Shirley A, Nelson C, Bates G, Parekh AB. Intercellular Ca²⁺ wave propagation involving positive feedback between CRAC channels and cysteinyl leukotrienes. *FASEB J*. 2009 Mar;23(3):894-905.

29. Snetkov VA, Hapgood KJ, McVicker CG, Lee TH, Ward JP. Mechanisms of leukotriene D₄-induced constriction in human small bronchioles. *Br J Pharmacol*. 2001 May;133(2):243-52.

30. Fischer DP, Hutchinson JA, Farrar D, O'Donovan PJ, Woodward DF, Marshall KM. Loss of prostaglandin F₂α, but not thromboxane, responsiveness in pregnant human myometrium during labour. *J Endocrinol*. 2008 Apr;197(1):171-9.

31. Samuelsson B. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983 May 6;220(4597):568-75.

32. Samuelsson B. Leukotrienes: A new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1983;11:1-13.

33. Smith R. Parturition. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):271-83.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Résumé des résultats principaux de l'étude

Dans ce mémoire, j'ai démontré que les dérivés de l'acide arachidonique sont des modulateurs de la contraction utérine et qu'il existerait un équilibre entre les différentes voies métaboliques de ce précurseur (AA) qui génère des substances ayant des effets paracrines, autocrines et éventuellement intracrines.

Au niveau enzymatique, la présence des différentes enzymes qui métabolisent l'acide arachidonique en EET (CYP450-2J2 et CYP450-2C9) et qui les dégradent (sEH) dans les tissus de la sphère utérine telles que le myomètre, les membranes fœtales et le placenta ont été identifiées. Nous avons également détecté la présence de la 5- et de la 12-Lipoxygénase dans le myomètre, dans les membranes fœtales et dans le placenta.

Lors des analyses fonctionnelles *in vitro* nous avons démontré que les eicosanoïdes diminuent l'amplitude et la durée des contractions utérines. Les EET, le 20-HETE représentent donc de nouveaux modulateurs de la contraction utérine. La voie des COX avait déjà été explorée et il avait été montré que les prostaglandines sont impliquées dans le déclenchement des contractions utérines. Les leukotriènes peuvent augmenter l'activité contractile utérine dans l'utérus animal et d'humain [Bryman *et al.*, 1985; Romero *et al.*, 1987; Ledwozyw et Kadziolka, 1989a] ce qui a été confirmé par nos résultats à la suite de l'ajout exogène de LTD₄. En utilisant des inhibiteurs enzymatiques de la voie des nouveaux eicosanoïdes qui permettent d'augmenter la biodisponibilité des eicosanoïdes endogènes, nous avons quantifié une réduction de l'activité contractile utérine. En conséquence, il est possible d'affirmer qu'une nouvelle voie métabolique et de signalisation cellulaire a été mise en évidence dans le muscle lisse utérin. La voie des eicosanoïdes est donc une des trois voies métaboliques de l'acide arachidonique qui est présente dans le muscle lisse utérin à la fin de la grossesse et elle pourrait être impliquée dans la modulation de la contraction utérine essentielle à l'expulsion du fœtus donc dans le travail. De plus, nous avons démontré qu'en inhibant les voies métaboliques des LOX dont leurs métabolites ont la propriété d'augmenter l'activité

contractile utérine, il est possible d'obtenir des effets tocolytiques gradés. À la fin de ce mémoire, les trois voies métaboliques de l'acide arachidonique sont documentées. À l'issue des premiers résultats, nous avons testés les inhibiteurs en association pour étudier l'équilibre entre ces différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique. L'utilisation combinée d'inhibiteurs de COX (indométhacine) et de 12-LOX (baicalein) a démontré un effet tocolytique additif. Ces effets tocolytiques seraient principalement dus à une diminution de l'amplitude des contractions et ils seraient probablement dus au « shunt » métabolique vers la voie de signalisation des époxy- et des hydroxy-eicosanoïdes.

Pertinence du modèle *in vitro*.

Modèle

Le modèle *in vitro* utilisé dans ce travail est un modèle classique, utilisé depuis plusieurs années afin d'enregistrer et d'analyser les contractions utérines [MARSHALL, 1959; Rowland et Reinke, 1969]. Ce modèle permet l'enregistrement de plusieurs bandelettes utérines en parallèle provenant d'une même biopsie par l'intermédiaire de jauges de contrainte et d'un logiciel d'enregistrement et de traitement de données. Une des forces de cette étude est l'analyse complète des paramètres contractiles soit l'amplitude, la durée (temps au pic; durée à 90 % de relaxation) et la fréquence. En contraste, l'analyse de l'aire sous la courbe est la valeur la plus intégrative de cette étude puisque que ce paramètre permet de mettre en évidence la résultante des autres paramètres énoncés précédemment. Les valeurs d'aire sous la courbe normalisées sont classiquement utilisées pour quantifier les activités contractiles.

Originalité de la fibre utérine

Les fibres utérines de femmes enceintes à terme ont été montées dans des bains à organe isolé. Les fibres utérines ont la particularité de se contracter de façon spontanée et rythmique après une période de latence d'environ 50 minutes. Cette période de

latence *in vitro* est l'intervalle de temps entre le montage de la fibre et le début de l'activité contractile spontanée. En plus, la fibre utérine est stimulable par l'ocytocine pour induire les contractions *in vitro* plus rapidement. Les contractions utérines enregistrées sont très puissantes. Ainsi, les bandelettes doivent être finement disséquées (10 x 2 x 2 mm) pour éviter que les enregistrements saturent et qu'il y ait perte de signal, bien que la sensibilité de la jauge de contrainte puisse être adaptée. En effet, nous avons observé une activité contractile de base qui correspond à environ une contraction tous les cinq minutes. Cette activité peut être maintenue pendant plus de 6 heures. L'activité contractile utérine est observée de manière spontanée et représente ainsi à petite échelle ce qui se passe lors de l'accouchement à la fin de la grossesse chez la femme en travail. La contraction présente une phase de contraction rapide puis une phase de relaxation suivie d'une période de quiescence à haut tonus. L'apparition de contractions utérines survient pendant la période d'équilibration des tissus. En effet, les bandelettes proviennent de femmes contrôles qui ont subi une césarienne électorale, c'est-à-dire qui n'avait aucune contraction rythmique initialement sur la table d'opération. On peut se demander pourquoi et comment les bandelettes se contractent de façon rythmique. Pendant cette période d'équilibration, des lavages des tissus ont été réalisés et ont éliminés toutes les molécules qui ont une tension de surface comme l'albumine, les glycolipides et d'autres. Cette perte de composés biochimiques dus aux lavages pourrait être une hypothèse expliquant en partie le phénomène de contractions spontanées. Les lavages permettraient d'éliminer des agents hormonaux ayant un effet sur l'utérus et ainsi de lever une inhibition ce qui faciliterait le déclenchement des contractions qui devaient exister chez les patientes qui n'étaient pas en travail lors de leurs césariennes. Dans les bains d'organe isolé, aucun « cocktail » hormonal n'est présent pour permettre de maintenir cette inhibition. Plusieurs hormones sont connues pour maintenir l'inhibition utérine lors de la phase de quiescence et ce taux hormonal va diminuer lors du passage de la phase de quiescence à la phase de préparation jusqu'à la phase de travail actif. Il est possible de penser que l'initiation de ces contractions est probablement due à une modification du couplage pharmaco-mécanique comme plusieurs études l'ont démontrées [Garfield *et al.*, 1998]. Toutefois, la résultante de ces

contractions pourrait aussi provenir d'une activité électrique, c'est-à-dire, des potentiels d'action calciques s'apparentant à ceux des cellules « pacemaker » du muscle cardiaque. Dans le cœur, il a été mis en évidence qu'il y avait une région « pacemaker » qui assurait l'initiation de l'activité électrique afin de déclencher la contraction répétitive. Cependant, dans l'utérus il n'y a aucun fait établi sur l'existence d'une ou de plusieurs régions qui permettent le déclenchement et la mise en phase des contractions des cellules utérines par une activité électrique propagée. Celle-ci faciliterait l'efficacité des contractions rythmiques pendant le travail conduisant à l'expulsion du fœtus hors du corps de la mère. Par contre, certaines études démontrent bien l'existence de potentiels d'action responsables du déclenchement de la contraction utérine dans le myomètre humain [Nakao *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1990].

Intérêt pharmacologique du modèle

Peu d'étude ont été réalisées sur des modèles utérins humains ce qui représente une autre force de cette étude. De plus, peu d'études se sont attardées à la physiopathologie du travail prématuré. Ce projet était donc d'une grande pertinence scientifique, pharmacologique et biomédicale pour l'obstétrique. La proximité du département de maternité et du laboratoire de recherche fait en sorte que les résultats sont optimaux. De plus, la polyvalence du projet de recherche permet l'intégration de la recherche clinique avec la recherche fondamentale. Ce modèle de recherche offre la possibilité de la mise en culture pour utiliser les prélèvements de tissus humains dans un intervalle de temps supérieur à 24 heures. Par contre, dans le cas du tissu utérin, la mise en culture des bandelettes s'est avéré un échec. Dans cette étude, le modèle *in vitro* a été mis au point pour mimer la physiologie du travail en fin de grossesse. D'une part, peu d'études avaient révélé la présence de la voie des CYP450 époxygénase ou ω -hydroxylase. Un groupe de recherche avait détecté la présence des enzymes [Pearson *et al.*, 2009] et un autre groupe avait effectué une quantification de la présence endogène des epoxy- et hydroxy-eicosanoïdes [Schafer *et al.*, 1996; Zhang, Pearson, Matharoo-Ball, Ortori, Warren, Khan et Barrett, 2007a]. L'utilisation d'un modèle animal *in vivo* aurait été « prématurée », car aucun groupe de recherche n'avait démontré les effets des

eicosanoïdes au niveau du muscle lisse de l'utérus autant animal qu'humain alors qu'on sait que les eicosanoïdes peuvent avoir des effets sur la relaxation d'autres types de muscles lisses. Si on prend les tissus vasculaires, les tissus pulmonaires, le système rénal ou bien le système gastro-intestinal, les époxy-eicosanoïdes ont des effets anti-inflammatoires et relaxants [Rousseau *et al.*, 2007]. Une expertise des effets eicosanoïdes et de leur présence enzymatique sur les autres tissus précède ce travail. De plus, des tests préliminaires réalisés pendant mes stages durant le baccalauréat sur un modèle *in vitro* de rat a permis d'avoir une première idée des effets de ces molécules peu connues pour leur mode d'action au niveau utérin [Girard *et al.*, 2007]. Nous avons donc été les premiers à étudier les effets des eicosanoïdes de nouvelle génération sur l'activité contractile utérine chez la femme enceinte à terme et à en faire une quantification pharmaco-mécanique et biochimique sur les fibres utérines. D'autre part, l'utilisation de tissus provenant de femmes enceintes au terme de leur grossesse fait en sorte que les résultats sont potentiellement applicables à ce qui se passe en situation clinique.

Population à l'étude.

La cohorte à l'étude a été déterminée pour limiter le nombre de prélèvements de tissus humains tout en étant capable d'avoir une puissance statistique raisonnable (puissance de 80%) et des résultats significatifs ($p < 0.05$). Cette cohorte comporte 32 femmes subissant une césarienne électorale au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. La maternité comporte environ 2800 accouchements/an. C'est un centre tertiaire, c'est-à-dire qu'il possède une maternité de référence avec la possibilité d'accueillir des transferts *in utero* pour rapprocher les bébés de la réanimation néonatale.

La totalité des obstétriciens-chirurgiens ont accepté de participer aux prélèvements de la biopsie utérine. Le taux de recrutement des femmes enceintes était de 78 % pour cette étude sans risque pour les patientes. Les principales raisons du refus des femmes étaient l'implication psychologique de la prise d'une biopsie utérine et l'ajout d'un stress supplémentaire à celui de devoir subir une césarienne.

Il existe une variabilité inter-individu dans la réactivité biochimique et pharmacologique des tissus provenant de différentes patientes. En effet, l'analyse de la dispersion des données révèle que l'âge des patientes, de même que leur indice de masse corporelle (IMC) est relativement faible compte tenu des variabilités inter-individu. Comme chaque fibre est son propre contrôle, il est possible de limiter la variabilité inter-individuelle. Une étude récente a démontré que l'amplitude des contractions utérines obtenues spontanément peut être différentes, mais que la réactivité pharmacologique ne semble pas être affectée quand une normalisation de l'aire sous la courbe de l'activité basale par rapport à l'aire sur la courbe à la suite de l'ajout exogène d'une drogue est réalisée [Chiossi *et al.*, 2010].

Détection des enzymes de la cascade de l'acide arachidonique

Dans la première partie de notre étude, il était important de s'assurer de la présence des enzymes qui métabolisent l'acide arachidonique et qui induisent la production des métabolites bioactifs par les tissus d'intérêt. Les tissus d'intérêt sont le placenta, le myomètre, l'endomètre qui est adjacent au myomètre et les membranes fœtales qui comprennent le chorion et l'amnion. Ces tissus ont chacun un rôle qui leur est propre pendant la grossesse mais qui les rendent tous essentiels.

Plusieurs enzymes ont été détectés par analyse d'immunobuvardage afin de démontrer la présence des trois voies métabolique de l'acide arachidonique. Il s'agissait de détecter la présence des enzymes qui produisent et qui dégradent les EET soit les CYP450-époxygénase (CYP450-2J2 ou CYP450-2C9) et l'époxyde hydrolase soluble (sEH), respectivement. Les enzymes qui produisent les leucotriènes ont aussi été détectés pour corroborer les résultats que certains groupes de recherche avaient obtenus sur la présence de la 5- et de la 12-LOX dans les tissus de la sphère utérine. La 15-LOX n'a pas été sujette à la détection puisque son intérêt durant la grossesse semblait beaucoup plus faible que les deux autres isoformes selon les groupes de recherche qui avaient quantifiés l'expression des ces dernières [Brown, Slater, Alvi, Elder, Sullivan et Bennett,

1999a; G. C. Smith *et al.*, 2001]. Le rôle de la 15-LOX pourrait être reconsidéré dans les cas de cancer de l'endomètre puisque les métabolites sont connus pour être impliqués dans d'autres cancers [Cimen *et al.*, 2009]. La COX-1 et la COX-2 qui métabolisent les prostaglandines, n'ont pas été sujettes à une détection immunologique dans cette étude parce que plusieurs études avaient déjà démontré la présence et l'expression de la COX-1 et de la COX-2 dans le muscle utérin humain [Erkinheimo *et al.*, 2000; Vane *et al.*, 1998]. La présence des enzymes suivantes : CYP450-2J2, CYP450-2C9, sEH, la 5- et la 12-LOX a été détecté dans tous les tissus de la sphère utérine. Les enzymes de la voie métabolique sont donc présentes autant dans le placenta que dans le myomètre ou dans les membranes fœtales.

Enzyme de la voie des époxy-eicosanoïdes

Les résultats des analyses immunologiques subséquentes concordent bien avec ce qui a été récemment rapporté dans la littérature. D'autres groupes de recherche ont démontré la présence des enzymes de la voie des époxy-eicosanoïdes, mais ils ont aussi quantifié la présence des métabolites endogènes [Zhang, Pearson, Matharoo-Ball, Ortori, Warren, Khan et Barrett, 2007a; Pearson *et al.*, 2009]. Dans plusieurs autres muscles lisses, la présence de ces enzymes, qui produisent des métabolites bioactifs modulant la contraction et la relaxation des muscles, a été démontré [Rousseau *et al.*, 2007]. Il est possible de noter la présence d'un doublet de bandes immunoréactives avec l'anticorps contre la CYP450 2C9 qui peut être expliqué par un manque de spécificité de l'anticorps [Vriens *et al.*, 2005].

Enzyme de la voie des leucotriènes

La 5-LOX est l'enzyme qui est à l'origine de la production des leucotriènes (5-HPETE, LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄). Elle est présente dans toutes les fractions microsomales étudiées, c'est-à-dire, les fractions dérivées du myomètre, des membranes fœtales et du placenta. Par contre, un faible immuno-marquage est détecté dans les fractions cytosoliques dérivées du myomètre et des membranes fœtales. Des résultats similaires sont observés pour la 12-LOX. La présence des enzymes produisant les leucotriènes,

autant dans le myomètre que dans les autres tissus de la sphère utérine, suggère que ces substances participent à la communication paracrine entre les tissus. La présence de ces enzymes dans le muscle lisse utérin était attendue [Brown, Slater, Alvi, Elder, Sullivan et Bennett, 1999a; G. C. Smith *et al.*, 2001].

Le fait que les enzymes soient présentes et biologiquement actives, autant dans le myomètre que dans les autres tissus de la sphère utérine, suggère une communication croisée probable entre les différents tissus du fait de la production de ces lipides qui sont des médiateurs de l'inflammation. Il peut exister une dérégulation de l'expression de ces enzymes, qui seraient impliquées dans certaines pathologies de la contraction utérine telle que la dystocie contractile.

Effets tocolytiques des eicosanoïdes et leucotriènes exogènes.

Effet des eicosanoïdes exogènes

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons démontré des effets tocolytiques des eicosanoïdes testés de 30 à 40 % suite à l'ajout exogène des différents composés tels que le 20-HETE, le 8,9-EET et le 14,15-EET à différentes concentrations. L'effet tocolytique suite à l'ajout de 1 μM de 8,9-EET est statistiquement comparable à l'effet produit par 1 μM d'indométhacine, le tocolytique de référence ($p > 0,05$). Le choix des concentrations avait été établi en fonction des études préliminaires réalisées sur 30 rates gestantes Sprague Dawley. Cette étude a démontré que les eicosanoïdes utilisés ont des effets tocolytiques sur l'utérus de rate [Girard *et al.*, 2007]. D'autres articles scientifiques avaient démontrés les propriétés relaxantes des eicosanoïdes sur d'autres types de muscles lisses [Pfister *et al.*, 2010][Dumoulin *et al.*, 1998]. Par contre, aucune équipe n'avait testé l'effet des eicosanoïdes par la technique de bains d'organe isolé sur l'activité contractile utérine chez la femme. Lors des analyses pharmaco-mécaniques, nous avons démontré que le 8,9-EET avait aussi des effets sur la fréquence, et qu'il était possible en présence exogène d'eicosanoïdes d'observer une diminution significative de la fréquence des contractions par heure. Ces résultats sont très innovateurs puisque nous sommes parmi les premiers groupes de recherche à démontrer d'une part la

présence de la voie des nouveaux eicosanoïdes dans l'utérus des femmes au terme de leur grossesse, mais aussi l'implication de ces métabolites sur la modulation de la contraction utérine.

Une revue de littérature montre que le mécanisme d'action des époxy-eicosanoïdes n'est pas complètement élucidé. Dans plusieurs types de muscles lisses, le mécanisme d'action des époxy-eicosanoïdes passerait par l'activation des BK_{Ca} que ce soit au niveau des coronaires [Li et Campbell, 1997] ou des bronches [Benoit *et al.*, 2001; Morin, Sirois, Echave, Gomes et Rousseau, 2007a; Morin et Rousseau, 2007; Morin *et al.*, 2008].

Effet des leucotriènes exogènes

Il a été montré que les leucotriènes peuvent augmenter l'activité contractile utérine dans l'utérus animal et humain sans pour autant être capables d'initier les contractions utérines comme le font les prostaglandines [Bryman *et al.*, 1985; Romero *et al.*, 1987; Ledwozyw et Kadziolka, 1989a]. Nous avons confirmé cette augmentation de l'activité contractile par des résultats supplémentaires qui n'ont pas encore été publiés et qui sont présentés en annexe (annexe 1). Suite à l'ajout exogène de LTD₄, des effets jusqu'à 80 % supérieur à l'activité contractile de base ont été quantifiés.

Effets tocolytiques des eicosanoïdes endogènes.

À ce stade du travail, il est possible de résumer et de noter que i) les enzymes de la voie métabolique de l'acide arachidonique sont présentes dans tous les tissus testés; ii) un effet tocolytique pour les EET a été quantifié sur l'activité contractile utérine.

Deux types de résultats ont pu être obtenus en explorant les effets des eicosanoïdes endogènes : des résultats attendus et des résultats paradoxaux. Lors de l'ajout d'un inhibiteur de la production des régioisomères des EET, le MS-PPOH, aucun effet n'a été observé ce qui correspond bien au résultat attendu. L'hypothèse initiale suggérait que

les époxy-eicosanoïdes étaient des modulateurs positifs de la relaxation du muscle utérin. Du fait que l'on ne connaisse pas encore la contribution relative des différentes voies de l'acide arachidonique dans les tissus de la sphère utérine, il est possible de proposer que la résultante de l'inhibition de la production des EET n'ait pas d'effet net autant sur l'activité contractile basale que sur le tonus de base. Cet effet attendu peut être expliqué par différents arguments. D'une part, les prostaglandines et les leucotriènes ont chacun un effet résultant qui augmente l'activité contractile et d'autre part, le 20-HETE qui supprime partiellement l'activité contractile utérine spontanée a un effet relaxant.

L'inhibition de l'époxyde hydrolase soluble permet d'augmenter la biodisponibilité des EET, qui ont une courte demi-vie, permettant ainsi aux eicosanoïdes endogènes de moduler le déroulement des contractions utérines. Lorsqu'on ajoute les inhibiteurs de l'époxyde hydrolase soluble, un effet tocolytique d'environ 20 % est mesuré. Ceci suggère que l'effet observé serait dû à une activité endogène des époxy-eicosanoïdes, dont le temps de demi-vie serait rallongé. Lors de l'inhibition de leur dégradation, la biodisponibilité des eicosanoïdes peut être augmentée [Catella *et al.*, 1990]. Ces résultats une fois de plus concordent avec la littérature puisque un groupe de recherche a quantifié la présence endogène de différents époxy- et hydroxy-eicosanoïdes [Zhang, Pearson, Matharoo-Ball, Ortori, Warren, Khan et Barrett, 2007b]. Ceux que nous avons testés de façon exogène sont aussi présents de manière endogène. Toutefois, il ne faut pas omettre que lors de l'inhibition de la sEH, il pourrait aussi y avoir une partie de l'effet qui serait dû aux hydroxy-eicosanoïdes (20-HETE) qui ont eux aussi des propriétés tocolytiques partielles. Il semblerait que les eicosanoïdes moduleraient la contraction utérine soit en interagissant avec un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) qui agirait sur les canaux ioniques en particulier les BK_{Ca}, soit en interagissant directement avec les canaux BK_{Ca} comme cela a été rapporté à plusieurs reprises suite à des expériences de patch clamp ou après reconstitution des canaux BK_{Ca} dans les bicouches lipidiques planes [Li et Campbell, 1997; Dumoulin *et al.*, 1998; Morin, Sirois, Echave, Gomes et Rousseau, 2007a; Morin et Rousseau, 2007; Morin, Sirois, Echave, Gomes et Rousseau, 2007c].

Dans cette partie, nous présentons un résultat qui apparait, à première vue, non concordant avec les résultats des effets tocolytiques des eicosanoïdes exogènes. Nous rappelons que le 20-HETE est capable de produire un effet tocolytique. Lors de l'inhibition de la CYP450 ω -hydroxylase par le DDMS, un inhibiteur spécifique, un effet tocolytique est également quantifié alors qu'on aurait plutôt attendu peu ou pas d'effet relaxant. Cet effet paradoxal pourrait s'expliquer par un « shunt » métabolique plausible vers la voie des époxy-eicosanoïdes. Plusieurs arguments peuvent soutenir cette hypothèse : i) les EET présentent des effets tocolytiques plus importants et significatifs que le 20-HETE, ii) sachant que le 20-HETE peut être métabolisé via les COX, l'inhibition de sa production diminue la contractilité. Il est peu probable que l'effet « shunt » se fasse au dépend de la voie des COX et des LOX. En effet, dans la littérature, la voie des LOX et des COX produisent des métabolites qui sont connus pour provoquer une contracture ou augmenter l'activité contractile utérine. Si le « shunt » augmentait la production de ces voies un effet contracturant aurait été observé. L'effet paradoxal observé est la résultante du passage probable par la seule autre voie biochimique relaxante soit celle des CYP450 époxygénases qui produit les époxy-eicosanoïdes qui ont un rôle tocolytique tel que démontré dans notre étude (Figure 1)[Corriveau *et al.*, 2009]. Bien que les différents inhibiteurs enzymatiques utilisés sont spécifiques à faible concentration [Fang *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2005], il aurait été intéressant de vérifier la spécificité d'action des inhibiteurs sur les enzymes ciblés (CYP450 et sEH). Toutefois, les biopsies proviennent de femmes ce qui représente un facteur limitant quant à la modulation de l'expression des enzymes. De plus, l'utilisation d'un autre tissu exprimant peu ou pas les différentes isoformes comme la décidua n'aurait pu être utilisé en raison de son manque de tonus et de contractilité. Une autre approche stratégique pourrait être l'inhibition par siRNA afin d'éliminer les effets endogènes des eicosanoïdes.

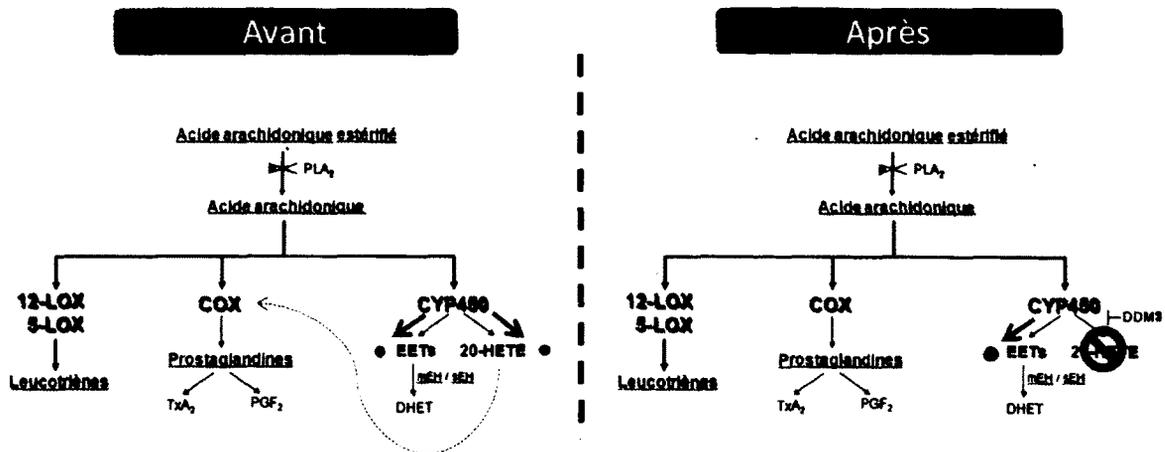


Figure 1. Hypothèse du « shunt » métabolique résultant de l'inhibition de la CYP450 ω -hydroxylase.

Équilibre cinétique entre les voies métaboliques de l'acide arachidonique.

Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche plus large qui a pour but de tester deux à deux des inhibiteurs enzymatiques des ramifications du métabolisme de l'acide arachidonique. Sur le plan clinique, l'épuisement de l'utilisation de l'inhibition des COX, de même que la présence des enzymes des trois voies métaboliques, nous incitent à nous pencher sur l'équilibre. En effet, la voie des COX est une voie qui a été bien étudiée autant au niveau animal qu'humain [Word *et al.*, 1992; Janicek *et al.*, 2007; Fischer, Hutchinson, Farrar, O'Donovan, Woodward et Marshall, 2008a]. Les prostaglandines ont rapidement été reconnues comme des lipides capables d'initier en partie le déclenchement des contractions de même que leur maintien. Dans cette étude, seule l'indométhacine a été testée comme inhibiteur non-sélectif des COX puisqu'il est reconnu dans la littérature médicale comme tocolytique de référence [Hui *et al.*, 2007]. Une courbe concentration-réponse avec des concentrations sélectionnées selon les données disponibles dans la littérature a permis de confirmer une IC_{25} essentielle dans l'utilisation combinée de l'inhibiteur de COX avec les autres inhibiteurs enzymatiques.

Par la suite, les inhibiteurs de LOX ont été testés seul afin de révéler des courbes concentrations-réponses. Ces courbes étaient similaires, sans différence significative, à

celle de l'indométhacine, le tocolytique de référence. Les inhibiteurs de LOX ont aussi démontré à la suite de l'analyse des paramètres contractiles que leurs effets tocolytiques passaient principalement par une diminution de l'amplitude des contractions utérines contrairement aux eicosanoïdes qui démontraient aussi des effets sur la durée et la fréquence des contractions classiques. L'efficacité des inhibiteurs de LOX n'est pas différente de celle de l'indométhacine ($p > 0,05$) ce qui suggère une éventuelle utilisation clinique de ces inhibiteurs à des concentrations similaires à celles utilisées pour l'indométhacine. Toutefois, les effets secondaires possibles pour les inhibiteurs de LOX ne sont pas connus, à ce jour, chez la femme enceinte. La voie des LOX pourrait être exacerbée dans les cas d'inflammation de la sphère utérine ou dans les inflammations systémiques rencontrées régulièrement dans la pratique obstétricale.

Lors de l'utilisation combinée des inhibiteurs de 12-LOX et de COX et donc en inhibant ces deux voies pro-contracturantes, il a été possible de quantifier un effet tocolytique additif, ce qui suggère un déplacement de l'équilibre biochimique vers la voie des CYP450-époxygénase et ω -hydroxylase qui produisent les époxy- et les hydroxy-eicosanoïdes qui eux ont démontré des effets tocolytiques (Figure 2).

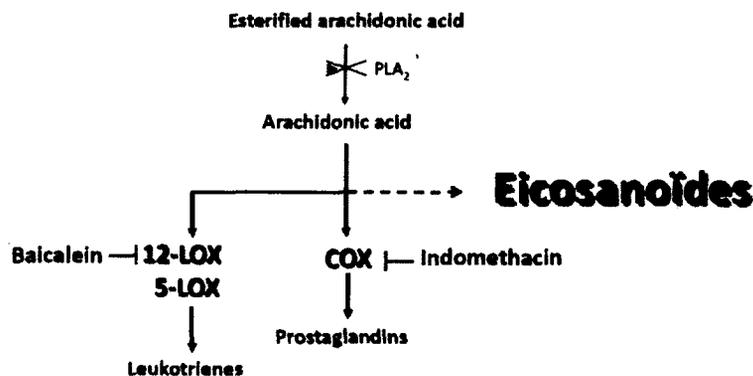


Figure 2. « Shunt » métabolique vers la voie des époxy- et hydroxy-eicosanoïdes.

Les résultats obtenus soulignent un effet additif entre la baicalein, inhibiteur de 12-LOX, et l'indométhacine. Un groupe de recherche avait déjà démontré, en utilisant un inhibiteur de COX sélectif, un « shunt » métabolique entre les voies métaboliques de

l'acide arachidonique dans le foie de souris [Liu *et al.*, 2010]. En revanche, l'AA861, inhibiteur de 5-LOX, en combinaison avec l'indométhacine n'a pas d'effet additif. Ces résultats ont été obtenus quelque soit l'ordre d'ajout des différents inhibiteurs de LOX ou de COX. Les voies des LOX semblent avoir, a priori, des poids relatif similaires alors qu'en association avec l'indométhacine, la baicalein a un effet tocolytique majoré (additif) qui pourrait être du à la dégradation d'un métabolite produit par l'autre voie (5-LOX) ou à un surplus d'acide arachidonique métabolisé par les CYP450 qui sont connus pour avoir des effets tocolytiques. Un retour partiel et reproductible, est observable après le lavage des inhibiteurs ce qui atteste que les drogues utilisées ont des effets réversibles. La réversibilité de l'action des inhibiteurs enzymatiques pourrait être un avantage pour une utilisation clinique éventuelle. Lors de l'ajout individuel des inhibiteurs, il a été possible d'observer que l'effet passait principalement par une diminution de l'amplitude des contractions. L'analyse des paramètres de la contraction utérine suggèrent une meilleure prise en charge des pathologies cliniques comme en condition d'hypertonie ou l'amplitude de la contraction devrait être diminuée afin d'éviter les effets néfastes de la contraction sur le fœtus. Une meilleure compréhension du mode d'action de ces outils pharmacologiques et de leurs produits permettrait au monde de l'obstétrique moderne l'utilisation des molécules les plus appropriées dans le cas de pathologies spécifiques. L'utilisation de l'indométhacine et de la baicalein a un effet tocolytique additif dont le mécanisme commun passerait par la voie des eicosanoïdes et dont l'utilisation clinique dans le traitement du travail préterme serait envisageable. D'une part, pour minimiser l'inflammation et d'autre part pour ralentir la mise en route du travail.

L'ensemble de ce travail et les données accumulées permettent d'affirmer qu'il y a la présence des trois voies métaboliques dans l'utérus de femmes enceintes à terme (Figure 3). De plus, l'hypothèse de l'existence d'un équilibre entre les voies métaboliques de l'acide arachidonique est renforcée.

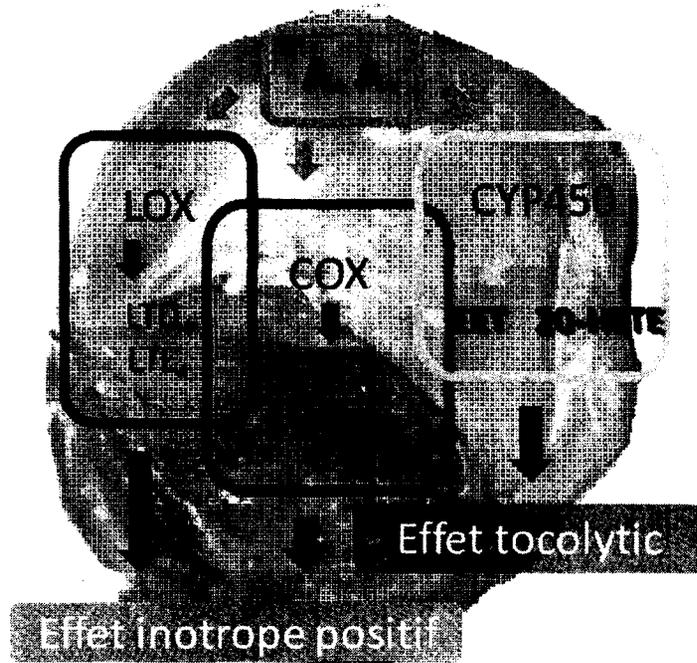


Figure 3. Voies métaboliques de l'acide arachidonique dans l'utérus de femme enceinte à terme : interrelation.

CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous avons démontré l'existence d'une troisième voie non canonique du métabolisme de l'acide arachidonique dans l'utérus de femmes enceintes à terme. De plus, nous avons mis en évidence que les époxy- et les hydroxy-eicosanoïdes étaient des composés bioactifs qui représentent de nouveaux modulateurs négatifs de la contraction utérine, car *in vitro* ils ont des propriétés tocolytiques marquées sur l'activité contractile du myomètre de femmes. Les résultats présentés dans les deux articles de ce mémoire suggèrent que les enzymes du métabolisme des EET tels que l'époxyde hydrolase soluble (sEH) augmenterait la biodisponibilité des régioisomères des EET, alors que l'inhibition de la CYP450 ω -hydroxylase minimiserait la voie du 20-HETE. En conséquence, les enzymes intracellulaires pourraient devenir de bonnes cibles pharmacologiques dans le traitement du travail préterme, en favorisant la voie des époxy-eicosanoïdes qui se sont révélées des tocolytiques partielles avec un effet réversible. Cette propriété en fait des agents biochimiques endogènes susceptibles d'être manipulés pour prévenir ou abolir la mise en route du travail spontanée précoce.

Notre présente étude a également permis de mettre en évidence la contribution de la voie des LOX, comme une voie inotrope positive du métabolisme de l'acide arachidonique, en plus de la voie des prostanoïdes qui elle était connue dans l'utérus de femmes.

Nous avons débuté l'étude de l'équilibre entre les différentes voies de l'acide arachidonique. Des effets tocolytiques additifs ont été quantifiés entre la voie des COX et des LOX et ils ont permis de démontrer que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques favorise un « shunt » métabolique vers les eicosanoïdes qui ont des rôles inhibiteurs nouvellement établies sur la contraction utérine. De plus, comme l'effet de l'utilisation des inhibiteurs de COX et de LOX est principalement via la diminution de l'amplitude des contractions, ces inhibiteurs pourraient permettre un meilleur traitement des différentes pathologies contractiles de la grossesse et donc une meilleure prise en charge du travail avant terme en vue d'accouchement sécuritaire pour la mère et son bébé.

PERSPECTIVES

Nous avons réalisés plusieurs types d'expériences qui ont permis de valider les effets tocolytiques des eicosanoïdes tout en démontrant la présence des enzymes dans le tissu utérin de femmes enceintes en condition dite normale soit au terme de leur grossesse. Il serait intéressant de déterminer si les eicosanoïdes conservent leurs propriétés de modulateurs sur les contractions utérines de tissus provenant de femmes en condition pathologique tel que d'utérus préterme, en travail, post-terme ou en hypertonie. D'une part, le recrutement de patientes en condition physiopathologique permettrait de confirmer si les eicosanoïdes ou leurs enzymes pourraient représenter une bonne cible pharmacologique. D'autre part, comme peu d'études démontrent le fonctionnement même des contractions utérines, la quantification des propriétés tocolytiques sur des utérus pathologiques permettraient d'approfondir notre compréhension de la modulation de la contraction utérine. Au contraire, il serait intéressant de prélever des biopsies d'utérus dystociques afin de d'investiguer des traitements pharmacologiques qui permettraient d'initier la contraction qui pourrait peut-être résulter d'une production ou d'une synthèse plus forte en époxy-eicosanoïdes ce qui serait en partie responsable d'un muscle utérin peu ou pas fonctionnel.

Les inhibiteurs de sEH pourraient être une des solutions au traitement pharmacologique du travail préterme et ils pourraient éventuellement réduire le taux de morbidité et de mortalité associé au travail préterme et à la prématurité en général. Il serait donc intéressant d'utiliser un modèle *in vivo* sur les rates à terme ou qui ont un travail prématuré et de vérifier l'effet des époxy-eicosanoïdes sur le déclenchement des contractions utérines à terme ou avant terme.

De plus, l'utilisation combinée d'un inhibiteur de COX et de LOX a un effet tocolytique additif. Il serait donc intéressant d'étudier au niveau clinique la combinaison d'un antagoniste des récepteurs aux leucotriènes et un inhibiteur non-spécifique de COX.

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements à mes directeurs de recherche, le Dr. Jean-Charles Pasquier et le Dr. Éric Rousseau pour m'avoir accepté comme étudiante à la maîtrise. Je les remercie pour l'encadrement académique, scientifique autant pour le versant fondamental que clinique dont j'ai pu bénéficier tout au long de ma formation me permettant de réaliser ce projet. Je tiens aussi à les remercier pour leur disponibilité, les discussions scientifiques et leur confiance pendant les années de ma maîtrise. Mes directeurs m'ont permis de m'épanouir en m'ayant offert des opportunités enrichissantes et inoubliables autant sur des plans professionnels que personnels.

Je tiens à remercier Mme Maryse Berthiaume, assistante de recherche pour Dr Jean-Charles Pasquier, pour les judicieux conseils techniques et éthiques qu'elle m'a transmis pendant les deux dernières années. Je remercie aussi les autres membres de l'équipe de recherche pour les échanges fructueux. Un merci tout particulier aux obstétriciens et gynécologues du CHUS qui ont contribué aux prélèvements des biopsies utérines.

Je remercie le Dr. Louis Gendron et le Dr. Guylain Boissonneault pour le temps et l'attention accordés à la lecture et l'évaluation de ce mémoire.

Je remercie également les organismes subventionnaires qui ont contribué au financement de mon projet de recherche, soit le FRSQ et la fondation des étoiles.

Finalement, je voudrais remercier ma famille et particulièrement mes parents, M. Michel Corriveau et Mme Brigitte Monast pour leurs soutiens moral et financier durant mes études universitaires, pour leur confiance et leurs encouragements à poursuivre mes passions.

ANNEXES

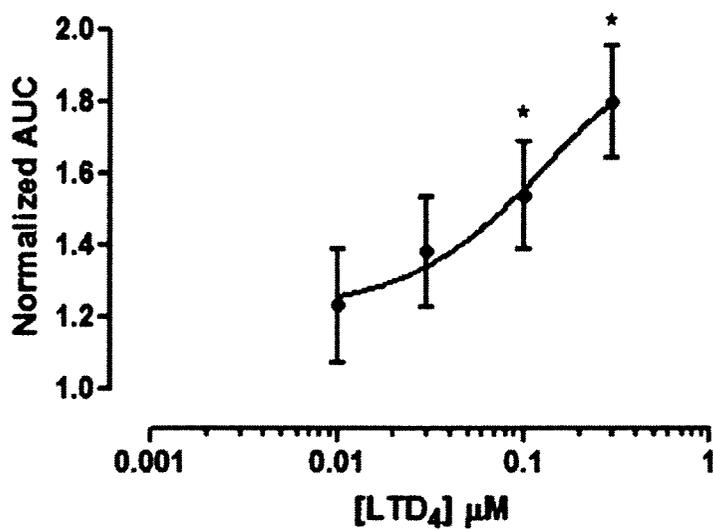


Figure 1. Effet pharmacologique de l'addition exogène de leucotriène D4 sur l'activité contractile spontanée de bandelettes utérines fraîchement isolées. Courbe concentration-réponse réalisée pour une gamme de concentrations de 0.01 à 0.3 μM de LTD4 (n=12). *p<0.05

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

- ACOG Committee on Practice Bulletins. American College of Obstetricians and Gynecologist (2003). ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologist. Number 43, May 2003. Management of preterm labor. *Obstetrics and gynecology*, volume 101, numéro 5 Pt 1, p. 1039-1047.
- Behrman, R. E. et Butler, A. S. (2007). *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention.*, Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes édition. National Academies Press, Washington (DC),
- Benoit, C., Renaudon, B., Salvail, D. et Rousseau, E. (2001). EETs relax airway smooth muscle via an EpDHF effect: BK(Ca) channel activation and hyperpolarization. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, volume 280, numéro 5, p. L965-73.
- Brown, N. L., Slater, D. M., Alvi, S. A., Elder, M. G., Sullivan, M. H. et Bennett, P. R. (1999a). Expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human fetal membranes throughout pregnancy and at term. *Molecular human reproduction*, volume 5, numéro 7, p. 668-674.
- Bryman, I., Hammarstrom, S., Lindblom, B., Norstrom, A., Wikland, M. et Winqvist, N. (1985). Leukotrienes and myometrial activity of the term pregnant uterus. *Prostaglandins*, volume 30, numéro 6, p. 907-913.
- Buxton, I. L. (2004). Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Molecular pharmacology*, volume 65, numéro 5, p. 1051-1059.
- Canete Soler, R. et Lopez Bernal, A. (1988). A comparison of leukotriene and prostaglandin binding to human myometrium. *Eicosanoids*, volume 1, numéro 2, p. 79-84.
- Catella, F., Lawson, J. A., Fitzgerald, D. J. et FitzGerald, G. A. (1990). Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 87, numéro 15, p. 5893-5897.
- Challis, J. R. G., Matthews, S. G., Gibb, W. et Lye, S. J. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine reviews*, volume 21, numéro 5, p. 514-550.

- Chiossi, G., Costantine, M. M., Betancourt, A., Hankins, G. D., Longo, M., Saade, G. R. et Bytautiene, E. (2010). Effect of maternal body mass index on in vitro response to tocolytics in term myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, volume 203, numéro 3, p. 261.e1-261.e5.
- Cimen, I., Tuncay, S. et Banerjee, S. (2009). 15-Lipoxygenase-1 expression suppresses the invasive properties of colorectal carcinoma cell lines HCT-116 and HT-29. *Cancer science*, volume 100, numéro 12, p. 2283-2291.
- Conde-Agudelo, A., Romero, R. et Kusanovic, J. P. (2011). Nifedipine in the management of preterm labor: a systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, volume 204, numéro 2, p. 134.e1-134.20.
- Corriveau, S., Berthiaume, M., Rousseau, E. et Pasquier, J. C. (2009). Why eicosanoids could represent a new class of tocolytics on uterine activity in pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, volume 201, numéro 4, p. 420.e1-420.e7.
- Di Capite, J., Shirley, A., Nelson, C., Bates, G. et Parekh, A. B. (2009). Intercellular Ca²⁺ wave propagation involving positive feedback between CRAC channels and cysteinyl leukotrienes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, volume 23, numéro 3, p. 894-905.
- Doheny, H. C., Lynch, C. M., Smith, T. J. et Morrison, J. J. (2005). Functional Coupling of β_3 -Adrenoceptors and Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Human Uterine Myocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, volume 90, numéro 10, p. 5786-5796.
- Doret, M., Mellier, G., Benchaib, M., Piacenza, J. M., Gharib, C. et Pasquier, J. C. (2002). In vitro study of tocolytic effect of rofecoxib, a specific cyclo-oxygenase 2 inhibitor. Comparison and combination with other tocolytic agents. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, volume 109, numéro 9, p. 983-988.
- Doret, M., Mellier, G., Gaucherand, P., Saade, G. R., Benchaib, M., Frutoso, J. et Pasquier, J. C. (2003). The in vitro effect of dual combinations of ritodrine, nicardipine and atosiban on contractility of pregnant rat myometrium. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, volume 110, numéro 8, p. 731-734.
- Dumoulin, M., Salvail, D., Gaudreault, S. B., Cadieux, A. et Rousseau, E. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted K_{Ca} channels. *The American Journal of Physiology*, volume 275, numéro 3 Pt 1, p. L423-31.

- Earley, S., Heppner, T. J., Nelson, M. T. et Brayden, J. E. (2005). TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circulation research*, volume 97, numéro 12, p. 1270-1279.
- Erkinheimo, T. L., Saukkonen, K., Narko, K., Jalkanen, J., Ylikorkala, O. et Ristimäki, A. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, volume 85, numéro 9, p. 3468-3475.
- Faber, B. M., Metz, S. A. et Chegini, N. (1996). Immunolocalization of eicosanoid enzymes and growth factors in human myometrium and fetoplacental tissues in failed labor inductions. *Obstetrics and gynecology*, volume 88, numéro 2, p. 174-179.
- Falck, J. R., Kodela, R., Manne, R., Atcha, K. R., Puli, N., Dubasi, N., Manthathi, V. L., Capdevila, J. H., Yi, X. Y., Goldman, D. H., Morisseau, C., Hammock, B. D. et Campbell, W. B. (2009). 14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic acid (14,15-EET) surrogates containing epoxide bioisosteres: influence upon vascular relaxation and soluble epoxide hydrolase inhibition. *Journal of medicinal chemistry*, volume 52, numéro 16, p. 5069-5075.
- Fang, X., Hu, S., Watanabe, T., Weintraub, N. L., Snyder, G. D., Yao, J., Liu, Y., Shyy, J. Y., Hammock, B. D. et Spector, A. A. (2005). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by substituted urea-derived soluble epoxide hydrolase inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, volume 314, numéro 1, p. 260-270.
- Fang, X., Weintraub, N. L., McCaw, R. B., Hu, S., Harmon, S. D., Rice, J. B., Hammock, B. D. et Spector, A. A. (2004). Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, volume 287, numéro 6, p. H2412-20.
- Fischer, D. P., Hutchinson, J. A., Farrar, D., O'Donovan, P. J., Woodward, D. F. et Marshall, K. M. (2008a). Loss of prostaglandin F₂alpha, but not thromboxane, responsiveness in pregnant human myometrium during labour. *The Journal of endocrinology*, volume 197, numéro 1, p. 171-179.
- Friebe-Hoffmann, U. (2003). The oxytocin signal cascade during premature labor. *Zentralblatt fur Gynakologie*, volume 125, numéro 5, p. 162-166.
- Garfield, R. E. et Maner, W. L. (2007). Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Seminars in cell & developmental biology*, volume 18, numéro 3, p. 289-295.

- Garfield, R. E., Saade, G., Buhimschi, C., Buhimschi, I., Shi, L., Shi, S. Q. et Chwalisz, K. (1998). Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human reproduction update*, volume 4, numéro 5, p. 673-695.
- Garza, J., Clayton, N., Kaviani, A., Maher, T. J. et Fauza, D. (2004). In situ inhibition of uterine activity by indomethacin: possible relevance to preterm labor prevention after fetal surgery. *Journal of pediatric surgery*, volume 39, numéro 8, p. 1173-1175.
- Gibb, W. (1998). The role of prostaglandins in human parturition. *Annals of Medicine*, volume 30, numéro 3, p. 235-241.
- Girard, I., Berthiaume, M., Corriveau, S., Rousseau, E. et Pasquier, J. C. (2007). Are eicosanoids a new class of tocolytics in pregnant rat myometrium? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, volume 197, numéro 6, p. s128.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D. et Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, volume 371, numéro 9606, p. 75-84.
- Hearne, A. E. et Nagey, D. A. (2000). Therapeutic agents in preterm labor: tocolytic agents. *Clinical obstetrics and gynecology*, volume 43, numéro 4, p. 787-801.
- Hertelendy, F. et Zakar, T. (2004). Prostaglandins and the myometrium and cervix. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, volume 70, numéro 2, p. 207-222.
- Hui, D., Liu, G., Kavuma, E., Hewson, S. A., McKay, D. et Hannah, M. E. (2007). Preterm labour and birth: a survey of clinical practice regarding use of tocolytics, antenatal corticosteroids, and progesterone. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*, volume 29, numéro 2, p. 117-130.
- Inoue, Y., Nakao, K., Okabe, K., Izumi, H., Kanda, S., Kitamura, K. et Kuriyama, H. (1990). Some electrical properties of human pregnant myometrium. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, volume 162, numéro 4, p. 1090-1098.
- Janicek, F., Franova, S., Nosalova, G. et Visnovsky, J. (2007). In vitro contractile response of human myometrium to oxytocin, PGF2alpha, bradykinin and ET-1. *Bratislavske lekarske listy*, volume 108, numéro 4-5, p. 174-178.
- Kamel, R. M. (2010). The onset of human parturition. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, volume 281, numéro 6, p. 975-982.

- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P. et Brown, T. G., Jr (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, volume 214, numéro 5088, p. 597-598.
- Lands, A. M., Luduena, F. P. et Buzzo, H. J. (1967). Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sciences*, volume 6, numéro 21, p. 2241-2249.
- Ledwozyw, A. et Kadziolka, A. (1989a). Effect of cysteinyl leukotrienes on uterine strips from pregnant and non-pregnant swine. *Polskie archiwum weterynaryjne*, volume 29, numéro 3-4, p. 79-92.
- Ledwozyw, A. et Kadziolka, A. (1989b). Effects of nifedipine and verapamil on cysteinyl leukotriene-induced contractions of the sheep uterus. *Polskie archiwum weterynaryjne*, volume 29, numéro 1-2, p. 189-200.
- Li, P. L. et Campbell, W. B. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circulation research*, volume 80, numéro 6, p. 877-884.
- Liu, J. Y., Yang, J., Inceoglu, B., Qiu, H., Ulu, A., Hwang, S. H., Chiamvimonvat, N. et Hammock, B. D. (2010). Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochemical pharmacology*, volume 79, numéro 6, p. 880-887.
- Lockwood, C. J. et Kuczynski, E. (2001). Risk stratification and pathological mechanisms in preterm delivery. *Paediatric and perinatal epidemiology*, volume 15 Suppl 2, p. 78-89.
- Lopez Bernal, A., Canete Soler, R. et Turnbull, A. C. (1989). Are leukotrienes involved in human uterine contractility? *British journal of obstetrics and gynaecology*, volume 96, numéro 5, p. 568-573.
- Maltsev, A. V., Maltsev, V. A., Mikheev, M., Maltseva, L. A., Sirenko, S. G., Lakatta, E. G. et Stern, M. D. (2011). Synchronization of stochastic Ca²⁺(+) release units creates a rhythmic Ca²⁺(+) clock in cardiac pacemaker cells. *Biophysical journal*, volume 100, numéro 2, p. 271-283.
- MARSHALL, J. M. (1959). Effects of estrogen and progesterone on single uterine muscle fibers in the rat. *The American Journal of Physiology*, volume 197, p. 935-942.
- Martin, J. A., Hamilton, B. E., Sutton, P. D., Ventura, S. J., Menacker, F. et Kirmeyer, S. (2006). Births: final data for 2004. *National vital statistics reports : from the*

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, volume 55, numéro 1, p. 1-101.

Martin, J. A., Hamilton, B. E., Sutton, P. D., Ventura, S. J., Menacker, F., Kirmeyer, S., Munson, M. L. et Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics National Vital Statistics System (2007). Births: final data for 2005. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, volume 56, numéro 6, p. 1-103.

McCormick, M. C. et Behrman, R. E. (2007). The quiet epidemic of premature birth: commentary on a recent Institute of Medicine report. *Ambulatory pediatrics : the official journal of the Ambulatory Pediatric Association*, volume 7, numéro 1, p. 8-9.

Mercer, B. M., Merlino, A. A. et Society for Maternal-Fetal Medicine (2009). Magnesium sulfate for preterm labor and preterm birth. *Obstetrics and gynecology*, volume 114, numéro 3, p. 650-668.

Momohara, Y., Sakamoto, S., Obayashi, S., Aso, T., Goto, M. et Azuma, H. (2004). Roles of endogenous nitric oxide synthase inhibitors and endothelin-1 for regulating myometrial contractions during gestation in the rat. *Molecular human reproduction*, volume 10, numéro 7, p. 505-512.

Morin, C. et Rousseau, E. (2007). Effects of 5-oxo-EET and 14,15-EET on reactivity and Ca²⁺ sensitivity in guinea pig bronchi. *Prostaglandins & other lipid mediators*, volume 82, numéro 1-4, p. 30-41.

Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Gomes, M. M. et Rousseau, E. (2007a). Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BKCa channel activation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, volume 293, numéro 4, p. L1037-44.

Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Gomes, M. M. et Rousseau, E. (2007b). Relaxing effects of 5-oxo-EET on human bronchi involve BK Ca channel activation. *Prostaglandins & other lipid mediators*, volume 83, numéro 4, p. 311-319.

Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Gomes, M. M. et Rousseau, E. (2008). EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: putative role of CPI-17. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, volume 38, numéro 2, p. 192-201.

Moutquin, J. M. (2003). Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, volume 110 Suppl 20, p. 30-33.

- Moynihhan, A. T., Hehir, M. P., Glavey, S. V., Smith, T. J. et Morrison, J. J. (2006). Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, volume 195, numéro 2, p. 504-509.
- Nakao, K., Inoue, Y., Okabe, K., Kawarabayashi, T. et Kitamura, K. (1997). Oxytocin enhances action potentials in pregnant human myometrium--a study with microelectrodes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, volume 177, numéro 1, p. 222-228.
- Olson, D. M. (2003). The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, volume 17, numéro 5, p. 717-730.
- Olson, D. M., Christiaens, I., Gracie, S., Yamamoto, Y. et Mitchell, B. F. (2008). Emerging tocolytics: challenges in designing and testing drugs to delay preterm delivery and prolong pregnancy. *Expert opinion on emerging drugs*, volume 13, numéro 4, p. 695-707.
- Papatsonis, D., Flenady, V., Cole, S. et Liley, H. (2005). Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, volume (3), numéro 3, p. CD004452.
- Pearson, T., Warren, A. Y., Barrett, D. A. et Khan, R. N. (2009). Detection of EETs and HETE-generating cytochrome P-450 enzymes and the effects of their metabolites on myometrial and vascular function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, volume 297, numéro 3, p. E647-56.
- Pfister, S. L., Gauthier, K. M. et Campbell, W. B. (2010). Vascular pharmacology of epoxyeicosatrienoic acids. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, volume 60, p. 27-59.
- Public Health Agency of Canada (2003). *Canadian Perinatal Health Report*
- Rasanen, J. et Jouppila, P. (1995). Fetal cardiac function and ductus arteriosus during indomethacin and sulindac therapy for threatened preterm labor: a randomized study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, volume 173, numéro 1, p. 20-25.
- Romero, R. (2007). Prevention of spontaneous preterm birth: the role of sonographic cervical length in identifying patients who may benefit from progesterone treatment. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, volume 30, numéro 5, p. 675-686.

- Romero, R., Emamian, M., Wan, M., Grzyboski, C., Hobbins, J. C. et Mitchell, M. D. (1987). Increased concentrations of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in amniotic fluid during parturition. *Obstetrics and gynecology*, volume 70, numéro 6, p. 849-851.
- Romero, R. et Mazor, M. (1988). Infection and preterm labor. *Clinical obstetrics and gynecology*, volume 31, numéro 3, p. 553-584.
- Rousseau, E., Morin, C., Hallé, C., Monet-Boucher, V. et Otis, C. (2007). EETs and 20-HETE modulate smooth muscle reactivity and other metabolic processes. Dans *New Frontiers in Smooth Muscle Biology and Physiology*. Jean-Pierre Savineau, p. 291-308.
- Rowland, C. A. et Reinke, D. A. (1969). Muscle layer contractile activity of the in vitro rabbit uterus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, volume 130, numéro 3, p. 898-902.
- Sala, A., Folco, G. et Murphy, R. C. (2010). Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacological reports : PR*, volume 62, numéro 3, p. 503-510.
- Samuelsson, B. (1983a). Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, volume 11, p. 1-13.
- Samuelsson, B. (1983b). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, volume 220, numéro 4597, p. 568-575.
- Schafer, W. R., Zahradnik, H. P., Arbogast, E., Wetzka, B., Werner, K. et Breckwoldt, M. (1996). Arachidonate metabolism in human placenta, fetal membranes, decidua and myometrium: lipoxygenase and cytochrome P450 metabolites as main products in HPLC profiles. *Placenta*, volume 17, numéro 4, p. 231-238.
- Singh, R. K., Gupta, S., Dastidar, S. et Ray, A. (2010). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology*, volume 85, numéro 6, p. 336-349.
- Smith, G. C., Wu, W. X. et Nathanielsz, P. W. (2001). Lipoxygenase gene expression in baboon intrauterine tissues in late pregnancy and parturition. *Molecular human reproduction*, volume 7, numéro 6, p. 587-594.
- Smith, R. (2007). Parturition. *The New England journal of medicine*, volume 356, numéro 3, p. 271-283.

- Snetkov, V. A., Hapgood, K. J., McVicker, C. G., Lee, T. H. et Ward, J. P. (2001). Mechanisms of leukotriene D4-induced constriction in human small bronchioles. *British journal of pharmacology*, volume 133, numéro 2, p. 243-252.
- Spector, A. A. (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of lipid research*, volume 50 Suppl, p. S52-6.
- Tang, D. D. et Anfinogenova, Y. (2008). Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, volume 13, numéro 2, p. 130-140.
- Terry, K. K., Lebel, W. S., Riccardi, K. A., Grasser, W. A., Thompson, D. D. et Paralkar, V. M. (2008). Effects of gestational age on prostaglandin EP receptor expression and functional involvement during in vitro contraction of the guinea pig uterus. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, volume 78, numéro 1, p. 3-10.
- Usta, I. M., Khalil, A. et Nassar, A. H. (2011). Oxytocin antagonists for the management of preterm birth: a review. *American Journal of Perinatology*, volume 28, numéro 6, p. 449-460.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S. et Botting, R. M. (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, volume 38, p. 97-120.
- Vriens, J., Owsianik, G., Fisslthaler, B., Suzuki, M., Janssens, A., Voets, T., Morisseau, C., Hammock, B. D., Fleming, I., Busse, R. et Nilius, B. (2005). Modulation of the Ca₂ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circulation research*, volume 97, numéro 9, p. 908-915.
- Walsh, S. W. (1991). Evidence for 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) and leukotriene C₄(LTC₄) in the onset of labor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, volume 622, p. 341-354.
- Weichman, B. M. et Tucker, S. S. (1982). Contraction of guinea pig uterus by synthetic leukotrienes. *Prostaglandins*, volume 24, numéro 2, p. 245-253.
- West, S. L., Yawn, B. P., Thorp, J. M., Korhonen, M. J., Savitz, D. A. et Guess, H. A. (2001). Tocolytic therapy for preterm labour: assessing its potential for reducing preterm delivery. *Paediatric and perinatal epidemiology*, volume 15, numéro 3, p. 243-251.
- Wisanskoonwong, P., Fahy, K. et Hastie, C. (2011). The effectiveness of medical interventions aimed at preventing preterm birth: A literature review. *Women and birth : journal of the Australian College of Midwives*,

- Wolfs, G. et Rottinghuis, H. (1970).** Electrical and mechanical activity of the human uterus during labour. *Archiv fur Gynakologie*, volume 208, numéro 4, p. 373-385.
- Word, R. A., Kamm, K. E. et Casey, M. L. (1992).** Contractile effects of prostaglandins, oxytocin, and endothelin-1 in human myometrium in vitro: refractoriness of myometrial tissue of pregnant women to prostaglandins E2 and F2 alpha. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, volume 75, numéro 4, p. 1027-1032.
- Wray, S., Burdyga, T. et Noble, K. (2005).** Calcium signalling in smooth muscle. *Cell calcium*, volume 38, numéro 3-4, p. 397-407.
- Zhang, J. H., Pearson, T., Matharoo-Ball, B., Ortori, C. A., Warren, A. Y., Khan, R. et Barrett, D. A. (2007a).** Quantitative profiling of epoxyeicosatrienoic, hydroxyeicosatetraenoic, and dihydroxyeicosatetraenoic acids in human intrauterine tissues using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, volume 365, numéro 1, p. 40-51.