

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

Maintien de l'homéostasie oxydative du trophoblaste par la mélatonine dans les grossesses compliquée par un diabète gestationnel mellitus

Mélatonine, stress oxydatif et diabète gestationnel mellitus : y a-t-il un lien?

Par

Andrée-Anne LACASSE

Baccalauréat ès *Sciences Biologiques* (spécialisation en toxicologie de l'environnement)

Mémoire présenté pour obtenir le grade de
Magister Scientiæ, M.Sc.
Maîtrise en sciences expérimentales de la santé

Juillet 2013

© Andrée-Anne LACASSE, 2013

Ce mémoire intitulé

Maintien de l'homéostasie oxydative du trophoblaste par la mélatonine dans les grossesses compliquée par un diabète gestationnel mellitus

présenté par

Andrée-Anne LACASSE

a été évalué par un jury composé de

M. J. Thomas Sanderson, président

Mme. Cathy Vaillancourt, directrice de thèse

M. J. Thomas Sanderson, examinateur interne

M. Éric Asselin, examinateur externe

RÉSUMÉ

Durant la grossesse, les niveaux de pro-oxydant augmentent, par rapport aux femmes non enceintes, mais cette augmentation est palliée par une augmentation des défenses antioxydantes. Le stress oxydatif (déséquilibre entre les pro-oxydants et antioxydants) est impliqué dans de nombreuses complications de la grossesse, telles que le diabète gestationnel méllitus (DGM). L'augmentation du stress oxydatif dans les cas de DGM est entre autres due à la glucotoxicité qui endommage les cellules endothéliales engendrant ainsi un état d'hypoxie/réoxygénation (H/R) au niveau placentaire. La mélatonine, en plus d'être un excellent capteur de radicaux libres, active la synthèse et l'activité des enzymes antioxydantes. Le trophoblaste villositaire placentaire humain produit la mélatonine et exprime ses récepteurs. De nombreuses études proposent que la mélatonine joue un rôle protecteur dans le stade précoce et avancé de diverses maladies dans laquelle la pathogenèse implique des dommages induits par les radicaux libres, dont le DGM et la prééclampsie. Dans ce sens, notre laboratoire a récemment démontré une diminution significative de la production de mélatonine consécutive à la réduction de l'expression et de l'activité de l'aralkylamine N-acétyltransférase (AANAT), l'enzyme limitant sa synthèse, ainsi qu'une diminution de l'expression de ses récepteurs MT1 et MT2 dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie par rapport à ceux de grossesses normotensives. Cependant, le rôle protecteur de la mélatonine dans le trophoblaste villositaire ainsi que dans la pathogenèse du DGM n'a jamais été étudié.

Mes hypothèses de recherche sont : 1) la mélatonine prévient le stress oxydatif induit par de l'H/R; 2) les placentas de grossesse compliquée par un DGM sont caractérisés par une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'une altération du système mélatonine comparée aux placentas de grossesses normales. Les objectifs spécifiques sont : 1) déterminer *in vitro* la capacité de la mélatonine à prévenir le stress oxydatif induit par de l'H/R dans les primocultures de trophoblastes villositaires; 2) comparer le niveau de stress oxydatif et l'expression des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine ainsi que des enzymes AANAT et HIOMT (hydroxyindole O-méthyltransférase) assurant sa synthèse dans les tissus placentaires de DGM par rapport à ceux de grossesses normales.

Les résultats démontrent la capacité de la mélatonine à prévenir le stress oxydatif placentaire et à maintenir l'équilibre pro-oxydant-antioxydant dans le trophoblaste villositaire humain soumis à une H/R. L'expression de l'enzyme limitant de la synthèse de la mélatonine, AANAT, et des récepteurs MT1 et MT2, est significativement réduite dans les placentas de DGM vs ceux de grossesses normales. Ces travaux montrent également une augmentation significative de la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) conjointement à une diminution significative des défenses antioxydantes dans les placentas compliqués par un DGM comparativement à ceux de grossesses normales.

En conclusion, la présente étude a permis de démontrer (1) que le système mélatonine est exprimé dans le placenta à tous les trimestres de la grossesse et est altéré dans les placentas de grossesses compliquées par un GDM comparés à ceux de grossesses normales; (2) une augmentation des marqueurs de stress oxydatif et une diminution des enzymes antioxydantes dans les placentas de GDM comparés à ceux de grossesses normales; et (3) que la mélatonine exerce une action protectrice contre le stress oxydatif induit par l'H/R dans le trophoblaste villositaire en primoculture. Ces travaux suggèrent que la mélatonine joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie oxydative du trophoblaste villositaire et qu'une altération du système mélatonine associé à une augmentation du stress oxydatif est impliquée dans la physiopathogenèse du DGM. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux cerner le rôle thérapeutique et diagnostique potentiel de la mélatonine dans le DGM.

Mots clés : mélatonine / récepteur de la mélatonine / antioxydant / placenta / trophoblaste villositaire / syncytiotrophoblaste / hypoxie/réoxygénation/ stress oxydatif / diabète gestationnel méllitus

Il faut avoir beaucoup étudié pour en savoir peu.

Montesquieu

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Cathy Vaillancourt, pour m'avoir confié ce projet de recherche novateur et d'une grande pertinence. Je la remercie également pour son support, ses bons conseils et pour ses encouragements et ce dès mon premier stage lors du baccalauréat.

Je désire également remercier les professeurs Éric Asselin et J. Thomas Sanderson d'avoir accepté de siéger sur le jury de ce mémoire de maîtrise.

Je voudrais remercier tout particulièrement Dave Lanoix qui a été un mentor incroyable depuis mon tout premier stage de baccalauréat et avec qui j'ai le bonheur de maintenant partager ma vie. Il a su me transmettre un immense savoir et m'épauler dans les plus grandes difficultés. Merci de ta patience, tes conseils et tous ces moments de folie ☺

Un merci particulier à tous mes collègues de laboratoire pour vos conseils, votre support et l'ambiance du laboratoire. Un petit clin d'œil aux vendredis fous ☺

Merci à la professeure Julie Lafond de l'UQÀM pour sa contribution à la portion de ce projet touchant au diabète gestationnel mellitus.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET SIGLES	x
LE PLACENTA HUMAIN	2
Développement du placenta humain.....	3
Syncytialisation du trophoblaste vilieux	4
Homéostasie du trophoblaste vilieux	6
LE STRESS OXYDATIF	7
Les espèces réactives oxygénées (ROS)	8
Génération des ROS	8
Voies de signalisation des ROS	9
Les défenses antioxydantes	10
Les enzymes antioxydantes	10
Les capteurs de radicaux libres	11
Le trophoblaste vilieux et le stress oxydatif.....	12
Le stress oxydatif dans les grossesses normales	12
Le stress oxydatif dans les grossesses pathologiques	12
L'hypoxie/réoxygénation (H/R)	13
LA MÉLATONINE.....	14
Synthèse de la mélatonine	14
Les récepteurs de la mélatonine	15
Rôles de la mélatonine	16

Action antioxydante de la mélatonine	17
Récepteur indépendant.....	17
Récepteur dépendant.....	18
La mélatonine et la grossesse	18
LE DIABÈTE GESTATIONNEL MELLITUS (DGM)	19
Le stress oxydatif dans le DGM	20
La mélatonine et le diabète.....	21
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS.....	23
CHAPITRE 1: LINKING THE ALTERATION OF PLACENTAL MELATONIN TO THE LOSS OF THE OXIDATIVE HOMEOSTASIS IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS	27
Contribution de l'étudiant.....	28
CHAPITRE 2 : MELATONIN: THE WATCHDOG OF VILLOUS TROPHOBLAST HOMEOSTASIS AGAINST HYPOXIA/REOXYGENATION-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS	65
Résumé du manuscrit en français	66
Contribution de l'étudiant.....	66
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	85
CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES.....	93
ANNEXE 1 – RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES:	95
BIBLIOGRAPHIE.....	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs régulant la différenciation biochimique et morphologique du trophoblaste villositaire.....	6
---	---

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la villosité chorale à l'interface foeto-maternel.....	3
Figure 2 : Voies de différenciation du trophoblaste humain.....	4
Figure 3 : Différenciation morphologique et biochimique du trophoblaste villex	5
Figure 4 : Renouveaulement du trophoblaste villex.....	7
Figure 5 : Formation des espèces réactives oxygénées par la xanthine oxydase.....	9
Figure6 : Boucle d'action des enzymes antioxydantes contre les radicaux libres.....	11
Figure7 : Enzymes impliquées dans la synthèse de la mélatonine.....	15
Figure 8 : Cascade antioxydative de la mélatonine.....	17

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET SIGLES

AANAT	Aralkylamine N-acétyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFMK	N ¹ -acétyl-N ² -formyle-5-méthoxykynuramine
AMK	N ¹ -acétyl-5-méthoxykynuramine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
CAT	Catalase
CTBev	Cytotrophoblaste extravilleux
CTBv	Cytotrophoblaste villeux
Cu	Cuivre
DGM	Diabète gestationnel mellitus
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases
FADH ₂	Flavine adenine dinucléotide
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydée
H/R	Hypoxie/réoxygénation
hCG	Hormone gonadotrophine chorionique

HIF-1	Facteurs induits par l'hypoxie 1
HIOMT	Hydroxyindole O-méthyltransférase
HO [•]	Radical hydroxyle
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
hPL	Hormone lactogène placentaire
IMC	Indice de masse corporelle
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mn	Manganèse
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO [•]	Monoxyde d'azote
ONOO ⁻	Peroxynitrite
O ₂ ^{•-}	Radical superoxyde
•O-O•	Singulet d'oxygène
OXPHOS	Phosphorylation oxydative mitochondrial
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PLC-β	Phospholipase C-β
PPIA	Peptidylprolyl isomérase A
Ref1	Facteur rédox 1 (<i>Redox factor 1</i>)
RCIU	Restriction de croissance intra-utérine
RNS	Espèce réactive azoté (<i>Reactive nitrogene species</i>)
ROS	Espèce réactive oxygéné (<i>Reactive oxygen species</i>)

RT-qPCR Transcription inverse-Réaction en chaîne par polymérase quantitative

SAPK Stress-activated protein kinases

SOD Superoxyde dismutase

ROO[•] Radical peroxyde

ROR Retinoic acid receptor-related orphan

RZR Retinoid Z receptor

STB Syncytiotrophoblaste

UV Ultraviolet

XDH Xanthine déshydrogénase

XO Xanthine oxydase

YWHAZ 14-3-3 protéine zeta/delta

Zn Zinc

Maintien de l'homéostasie oxydative du trophoblaste par la mélatonine dans les grossesses compliquées par un diabète gestationnel mellitus

Synthèse

LE PLACENTA HUMAIN

Chez les mammifères, le placenta est un organe transitoire ayant de multiples fonctions indispensables au développement fœtal et à l'adaptation de la physiologie maternelle à la grossesse. Notamment, c'est lui qui assure le transport fœto-maternel des substances nutritives et de l'oxygène vers le fœtus. Il permet également l'élimination des déchets excrétés par le fœtus, ainsi que de certaines substances toxiques provenant de la mère (Alsat *et al.*, 1999, Malassiné *et al.*, 2000). Le placenta humain protège le fœtus contre le rejet par le système immunitaire de sa mère. Il est également un organe endocrine c'est-à-dire qu'il produit ses propres hormones peptidiques et stéroïdiennes. Le placenta humain est de type hémomonochorial, ce qui le distingue de celui des autres mammifères par une intense invasion du trophoblaste extravilleux dans la décidue et le myomètre maternels (Tastsaris *et al.*, 2006). Le trophoblaste (du grec *trophe*= nourriture + *blastos*= germe) est l'épithélium qui recouvre le placenta et qui forme la villosité chorale. Cette villosité est la pièce maîtresse de cette particularité unique à l'espèce humaine et assure la grande majorité des fonctions placentaires (Alsat *et al.*, 1999). La villosité chorale est soit ancrée dans l'utérus maternel et appelée villosité crampon, soit flottante dans l'espace intervilloux (villosité flottante) (**Fig. 1**).

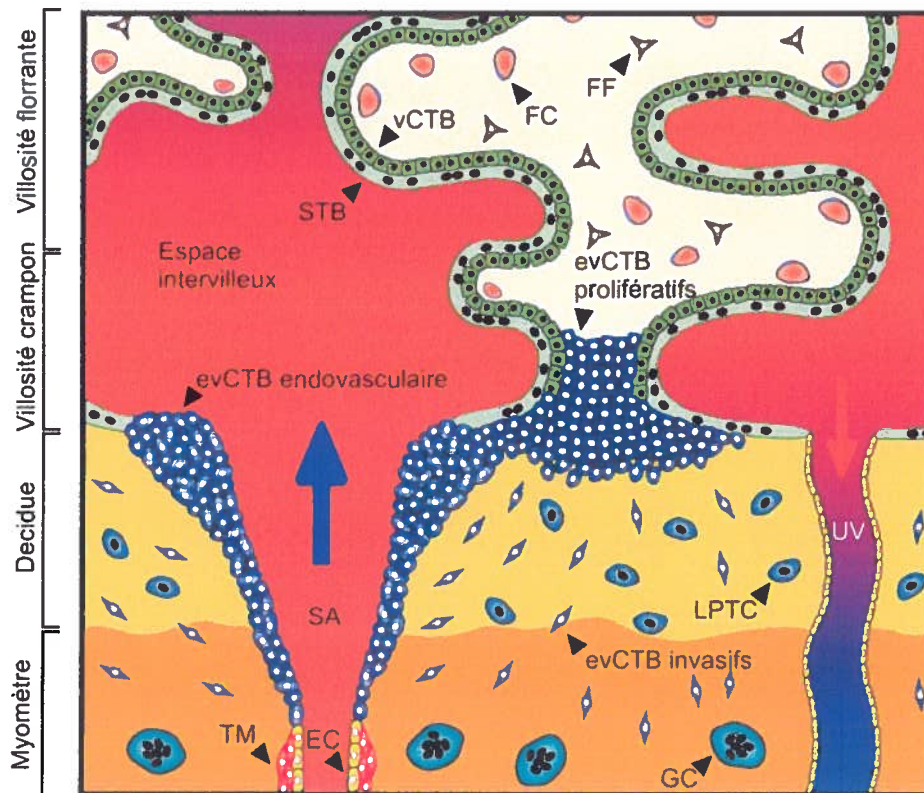


Figure 1 : Représentation schématique de la villosité chorale à l'interface fœto-maternelle. La villosité flottante est en contact direct avec le sang maternel situé dans l'espace intervilloux. La villosité flottante est composée des cytotrophoblastes villositaires (vCTB) et du syncytiotrophoblaste (STB). La villosité crampon est composée d'une population hétérogène de cytotrophoblastes extravilloux (evCTB) et des cellules géantes trophoblastiques (GC). EC : cellule endothéliale; FC : capillaire fœtal; FF : fibroblaste fœtal; LPTC : grande cellule polygonale trophoblastique; SA : artère spiralée utérine; TM : tunique musculaire; UV : veine utérine. Modifié de (D. Lanoix et al., 2012b).

Développement du placenta humain

Le développement de la villosité chorale débute 13 jours après la conception dans la grossesse normale. Le centre des villosités choriales est composé du stroma fœtal alors que l'épithélium externe est formé par le trophoblaste. Le trophoblaste extravilloux est présent dans les villosités crampons qui permettent l'implantation ainsi que le maintien de la grossesse durant le premier trimestre alors que le trophoblaste villositaire est présent dans les villosités flottantes qui contrôlent la croissance placentaire et les échanges transplacentaires (Benirschke *et al.*, 2006) (Fig. 2).

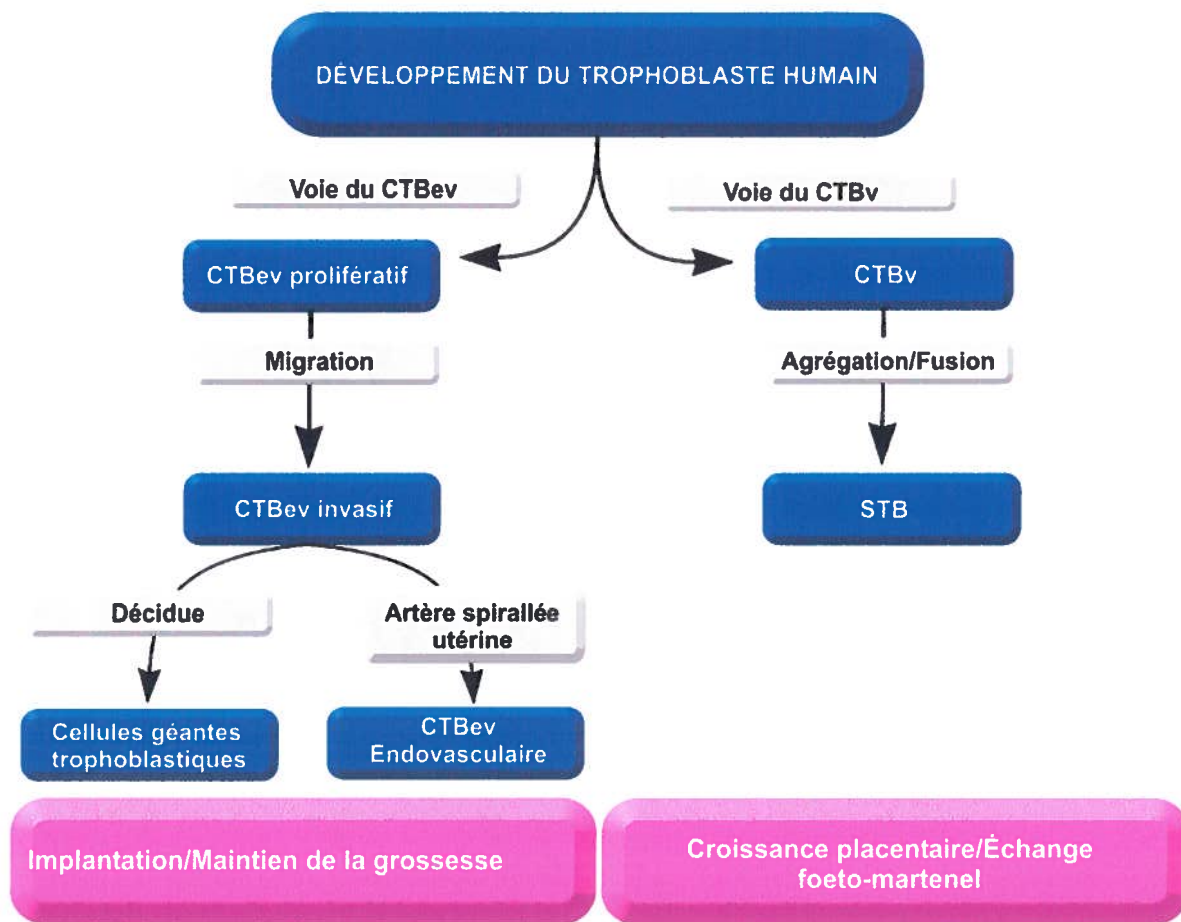


Figure 2 : Voies de différenciation du trophoblaste humain. CTBev : cytotrophoblaste extravilleux; STB : syncytiotrophoblaste; CTBv : cytotrophoblaste vilieux. Créée par Andrée-Anne Lacasse.

Syncytialisation du trophoblaste vilieux

La différenciation du trophoblaste vilieux est un processus biologique complexe se produisant autant *in vivo* qu'*in vitro*. Malgré son rôle essentiel dans la grossesse et le développement fœtal, les mécanismes qui contrôlent la différenciation du trophoblaste vilieux restent mal compris. Le trophoblaste vilieux est constitué des cellules souches cytotrophoblastiques prolifératives qui sortent du cycle cellulaire pour se différencier de façon terminale en syncytiotrophoblaste (STB). Le STB (plurinuéclé) est formé par la fusion des cytotrophoblaste vilieux (CTBv, mononucléé) sous-jacents (Black *et al.*, 2004, Vaillancourt *et al.*, 2009) (**Fig. 2**). La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation des CTBv en STB a largement bénéficié de la capacité d'isoler, de purifier et de maintenir ces cellules en culture (Kliman *et al.*, 1986). La différenciation du CTBv est caractérisée par des paramètres

morphologiques et biochimiques (**Fig. 3**). La différenciation morphologiquement est caractérisée par la fusion des CTBv en un STB. La différenciation biochimique est caractérisée par l'activation de certains gènes exprimés spécifiquement dans le STB et codant pour des hormones sécrétées, telles que l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) et l'hormone lactogène placentaire (hPL). *In vitro*, la présence de sérum est nécessaire pour une différenciation morphologique et biologique complète du CTBv. En effet, les CTBv une fois isolés et maintenus dans des conditions sans sérum ne peuvent s'agréger ou fusionner et montre un faible degré de différenciation spontané (Morrish *et al.*, 1987). Des études ont démontré qu'*in vitro*, la différenciation des CTBv en STB peut être induite ou inhibée par différents facteurs. Le **tableau 1** présente des facteurs connus pour réguler la syncytialisation. La syncytialisation du CTBv (la formation du STB) est complète après quatre jours de culture *in vitro* (**Fig. 3**).

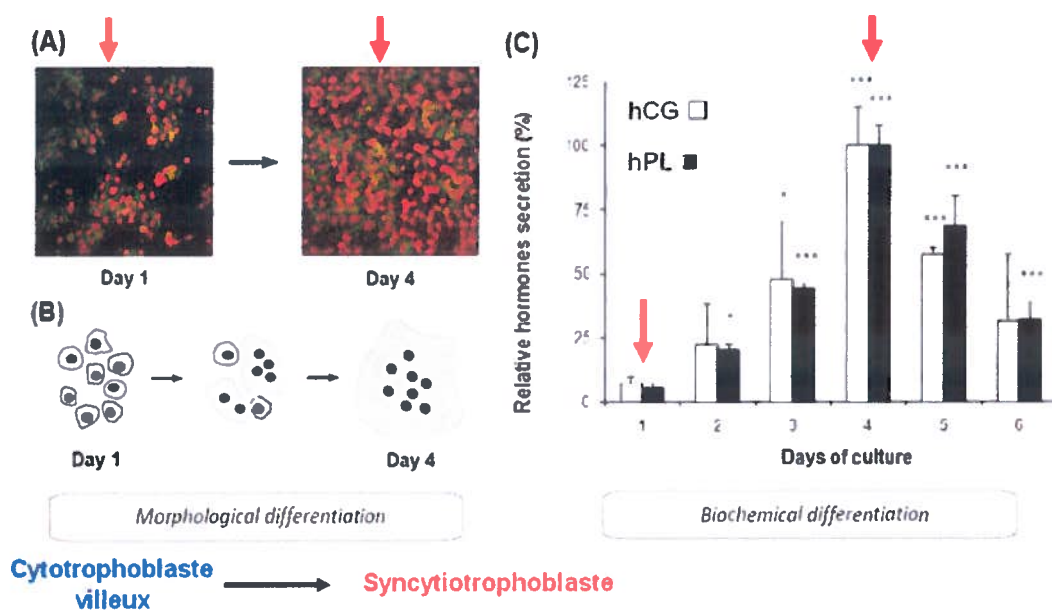


Figure 3 : Différenciation morphologique et biochimique du trophoblaste villosus. La différenciation morphologique (A, B) est caractérisée par la fusion des cytotrophoblastes villosus, mononucléés au jour 1, en syncytiotrophoblaste, multinucléé au jour 4. La différenciation biochimique (C), maximale à 4 jours de culture, est caractérisée par la présence de gènes exprimés seulement lorsque les cellules sont fusionnées en syncytiotrophoblaste comme par exemple l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et l'hormone lactogène placentaire (hPL). Modifié de : (Vaillancourt *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Facteurs régulant la différenciation biochimique et morphologique du trophoblaste villos.

Facteurs	Effet sur la syncytialisation	Références
EGF	Stimulation	(Morrish <i>et al.</i> , 1987)
GM-CSG	Stimulation	(Garcia-Lloret <i>et al.</i> , 1994)
VEGF	Stimulation	(Crocker <i>et al.</i> , 2001)
AMPc	Stimulation	(Keryer <i>et al.</i> , 1998)
Estrogène	Stimulation	(Cronier <i>et al.</i> , 1999b)
hCG	Stimulation	(Cronier <i>et al.</i> , 1994, Shi <i>et al.</i> , 1993)
Glucocorticoïdes	Stimulation	(Cronier <i>et al.</i> , 1998)
Hypoxie	Inhibition	(Alsat <i>et al.</i> , 1996)
TGF- β	Inhibition	(Caniggia <i>et al.</i> , 2000)
TNF- α	Inhibition	(Leisser <i>et al.</i> , 2006)
Endothéline	Inhibition	(Cronier <i>et al.</i> , 1999a)

EGF : facteur de croissance épidermique; TGF- α : facteur de croissance transformant-alpha; GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages; VEGF : facteur de croissance vasculaire endothéliale; AMPc : AMP cyclique

Homéostasie du trophoblaste villos

Le trophoblaste villos est un tissu avec un taux de régénération très rapide. Tout au long de la grossesse, le STB est continuellement régénéré grâce à la fusion des CTBv, sous-jacents ayant un potentiel de cellule souche, avec le STB (**Fig. 4**). Afin de maintenir leur homéostasie, les tissus à régénération rapide, telle que le trophoblaste villos, doivent mourir pour être remplacés. Une fois formé, le STB évolue spontanément vers une mort cellulaire régulée ou apoptose, caractérisée par des changements morphologies distinctifs dans le noyau et le cytoplasme, le clivage de la chromatine et la fragmentation de l'ADN génomique, de manière à permettre sa régénération par les CTBv (Black *et al.*, 2004, Huppertz *et al.*, 1999, Yusuf *et al.*, 2002). *In vitro*, sans la fusion des CTBv, la durée de vie du STB n'est que de quelques jours (Castellucci *et al.*, 1990, Crocker *et al.*, 2004). La différenciation des CTBv en STB se produit en 96 heures, suivie par la dégénérescence du STB (**Fig. 3**). Le maintien de cette homéostasie du trophoblaste villos (formation et mort du STB) est essentiel au bon déroulement de la grossesse et de la croissance fœtale. Un des principaux facteurs modulant l'homéostasie du trophoblaste villos est le stress oxydatif (Burton *et al.*, 2011).

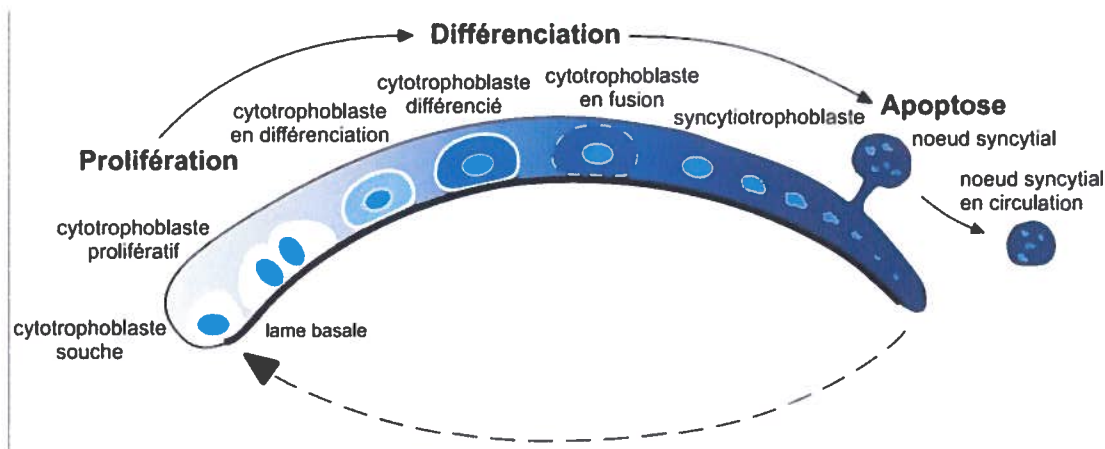


Figure 4 : Renouvellement du trophoblaste villositaire. Le trophoblaste villositaire est formé des cytotrophoblastes souches prolifératifs qui vont sortir du cycle cellulaire et se différencier en cytotrophoblastes villositaires. Les cytotrophoblastes villositaires mononucléés vont fusionner et se différencier en un syncytium, le syncytiotrophoblaste. La dégénérescence du syncytiotrophoblaste se produit par apoptose pour permettre sa régénération et donc de maintenir l'homéostasie du trophoblaste villositaire. Modifié de (D. Lanoix *et al.*, 2012c).

LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif est une conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène. Le stress oxydatif survient lorsque la formation d'espèces réactives (ou espèces oxydantes) surpasse les défenses antioxydantes endogènes, conduisant à de potentiels dommages cellulaires (Burton *et al.*, 2011). Les espèces oxydantes, qu'elles soient radicalaires (possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe) ou non, sont soit formées d'atomes d'oxygène seulement ou des atomes d'oxygène et d'azote. Lorsqu'elles entrent en contact avec d'autres atomes ou molécules, elles peuvent provoquer un transfert d'énergie ou un transfert d'électron menant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS ou RONS). Dans ce mémoire, nos travaux se sont concentrés sur les ROS. Les plus communs sont le singulet d'oxygène ($\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$), le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), le radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) et le peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$) (Gilgun-Sherki *et al.*, 2004). La formation de ces différents radicaux libres provient d'un enchaînement de réactions d'oxydoréduction à partir du radical superoxyde (Koechlin-

Ramonatxo, 2006). L'oxydoréduction étant une suite de réactions d'oxydations (perte d'électrons) et de réductions (gain d'électrons).

Les espèces oxydantes radicalaires sont des entités chimiques très instables dues au dérèglement de leur champ magnétique, ayant tendance à oxyder les autres molécules. Une fois oxydées, ces molécules peuvent causer des dommages oxydatifs aux protéines, aux lipides, aux glucides et à l'ADN qui peut mener à la mort cellulaire (Apel *et al.*, 2004, Jackson, 2009). Le maintien de l'équilibre entre les oxydants et les défenses antioxydantes est donc important pour éviter les dommages oxydatifs. Différents facteurs environnementaux peuvent perturber cet équilibre et mener à une augmentation intracellulaire de la quantité de molécules oxydantes, ou une diminution des défenses antioxydantes, causant ainsi un stress oxydatif. Parmi les sources exogènes d'espèces oxydantes, on compte l'exposition à la fumée de cigarette, les polluants environnementaux, la consommation d'alcool et les infections bactériennes, fongiques ou virales (Gilgun-Sherki *et al.*, 2004). Les espèces oxydantes ont des fonctions paradoxales; elles peuvent jouer un rôle bénéfique et essentiel dans des voies de signalisations alors qu'elles peuvent également perturber des processus physiologiques en interférant avec d'autres voies de signalisations (Jackson, 2009). Les espèces oxydantes peuvent également affecter l'expression de gènes; soit en activant des cascades de signalisation ou en interagissant avec des facteurs de transcriptions (Apel *et al.*, 2004). Il est d'ailleurs connu que les espèces oxydantes (radicalaires ou non) peuvent jouer un rôle majeur dans le vieillissement et le développement de certaines pathologies en causant des dommages aux protéines, lipides et à l'ADN qui induisent de l'inflammation, des dommages tissulaires et conséquemment de l'apoptose (Uttara *et al.*, 2009). C'est entre autres le cas dans la perte de masse musculaire des muscles squelettiques, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), l'artériosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, certains cancers et certaines complications de la grossesse (Jackson, 2009, Menville-Bourg, 2005, Querfurth *et al.*, 2010).

Les espèces réactives oxygénées (ROS)

Génération des ROS

Les ROS sont des sous-produits de nombreuses voies métaboliques dans les différents compartiments cellulaires. La formation des ROS peut être régulée de manière enzymatique et non enzymatique. Les mécanismes de génération des ROS de façon non enzymatiques comprennent notamment les réactions de Fenton et Harber-Weiss, une auto-oxydation des catécholamines, quinones et des flavines ainsi que des facteurs environnementaux dont les

rayons UV, les ultrasons, des radiations ionisantes et des catalyseurs métalliques (Azzam *et al.*, 2012, Renzing *et al.*, 1996). Dans les systèmes biologiques, il s'agit toutefois de mécanismes secondaires. Tout au long de ce mémoire, l'emphasis sera portée sur les mécanismes enzymatiques.

Les ROS générés de manière enzymatique proviennent de la chaîne de transport d'électron mitochondrial lors de la formation d'ATP et principalement par la xanthine oxydase (XO) en période d'hypoxie/réoxygénation (H/R) (Edeas *et al.*, 2009). Le processus de phosphorylation oxydative mitochondrial (OXPHOS) permet la formation d'ATP grâce à un transfert d'électron à une molécule de dioxygène (O_2) à partir du NADH ou du $FADH_2$ (Albert *et al.*, 2004). La xanthine déshydrogénase (XDH) est l'enzyme clé du catabolisme des purines. Elle catalyse l'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en urée. Cependant, en hypoxie, la XDH est irréversiblement convertie en XO par oxydation. L'ATP intracellulaire est ainsi catalysée en hypoxanthine et s'accumule toute au long de la période d'hypoxie. Lors de la réoxygénation, la XO va utiliser l'oxygène nouvellement introduit dans la cellule ainsi que l'hypoxanthine formée en période d'hypoxie pour générer des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fig.5) (Granger *et al.*, 1986, McCord, 1985). De plus, l'activité de la XO est augmentée par l'hypoxie, entraînant une hausse de la formation de l'hypoxanthine et conséquemment de la formation de ROS (Nishino *et al.*, 1997).

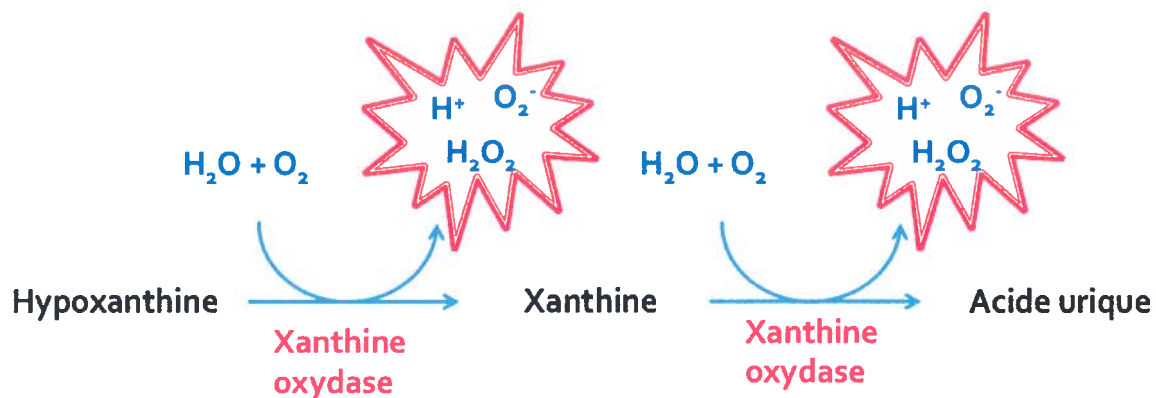


Figure 5 : Formation des espèces réactives oxygénées par la xanthine oxydase. Créée par Andrée-Anne Lacasse.

Voies de signalisation des ROS

Lorsqu'ils sont en équilibre avec les défenses antioxydantes, les ROS ont des fonctions bénéfiques alors que lorsqu'ils sont en excès, ils ont des effets délétères. Les ROS participent à la régulation de plusieurs processus cellulaires en agissant comme seconds messagers ou en

modifiant des voies de signalisation, tels que les MAPKs, PI3K et Ref1 (Lyssenko *et al.*, 2009). Ils peuvent également réguler les processus cellulaires par plusieurs mécanismes, tels que la régulation de l'activité de facteurs de transcription ou d'enzymes sensible au potentiel redox. En effet, plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans la réponse immunitaire, au stress et dans la survie cellulaire, dont NF- κ B, HIF-1 et p53, contiennent des cystéines sensibles aux ROS dans leur domaine de liaison à l'ADN (Haddad, 2002). En situation de stress oxydatif, ces facteurs de transcriptions seront activés, stimulant la transcription de gènes cibles. Les éléments de réponse de ces facteurs de transcription régulent plus de 200 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, l'immunité, la régulation du cycle cellulaire, la régulation des gènes anti-apoptotiques et la réponse au stress (Brauer *et al.*, 2010). Dans le placenta, leurs activations sont entre autres connues pour avoir un effet pro-apoptotique (Cindrova-Davies *et al.*, 2007). L'activation des MAPKs est également régulée par les ROS. Les MAPKs sont une famille de protéines kinases impliquées dans plusieurs réponses physiologiques et mécanismes de régulation, incluant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose (Chen *et al.*, 2001). Les ROS sont des inducteurs connus de l'apoptose par les voies p38 et SAPK/JNK (Matsuzawa *et al.*, 2005). Le stress oxydatif engendré par une H/R active p38 et SAPK/JNK dans des explants de trophoblaste villosus, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'apoptose (Cindrova-Davies, 2009, Cindrova-Davies *et al.*, 2007). De plus, une augmentation de l'activation SAPK/JNK a été démontrée dans les placentas de grossesses compliquées par le diabète gestationnel mellitus (DGM) (Radaelli *et al.*, 2003). Les ROS activent donc des voies de signalisation dans le placenta qui vont altérer l'homéostasie cellulaire, induisant ainsi un stress inflammatoire placentaire et de l'apoptose.

Les défenses antioxydantes

Les antioxydants sont des réducteurs c'est-à-dire des molécules qui empêchent ou diminuent l'oxydation d'autres molécules. Ils existent sous deux formes, enzymatiques et non enzymatiques, aussi connues sous le nom de capteur de radicaux libres.

Les enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes sont composées de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx) (Apel *et al.*, 2004). Il existe plusieurs classes de SOD. La SOD1 (Cu-Zn-SOD) fonctionne en présence de cuivre (Cu) et de zinc (Zn) et se trouve dans tous les organismes eucaryotes. La SOD2 (Mn-SOD) est localisée dans la matrice

mitochondriale, principale source de superoxydes, et fonctionne en présence de manganèse (Mn). Les SODs sont considérées comme les enzymes clés de la défense contre les radicaux libres puisqu'elles agissent directement au départ de l'enchaînement des réactions induites par les ROS. En fait, on sait que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est le point de départ de la production des ROS. La SOD agit en inactivant l' $O_2^{\cdot-}$ et en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est alors catabolisé, par la catalase, via une dismutation, en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau ($2H_2O$) (Menveille-Bourg, 2005) (**Fig. 6**). La GPx permet aussi l'élimination des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que des peroxynitrites ($ONOO^{\cdot}$) qui sont de très puissants oxydants (Cillard *et al.*, 2006). En fait la GPx agit, avec l'aide de deux molécules de glutathion réduit (GSH), en transformant l' H_2O_2 en molécules d'eau ($2 H_2O$) et une molécule de glutathion oxydée (GSSG). Cette molécule de GSSG est ensuite retransformée en deux molécules de GSH, pouvant être réutilisée, par la glutathion réductase (GR) (**Fig. 6**). Le recyclage du GSH est l'un des mécanismes majeurs de protection contre les ROS. Un équilibre entre les différents mécanismes de protection contre les ROS est crucial pour éviter les dommages oxydatifs.

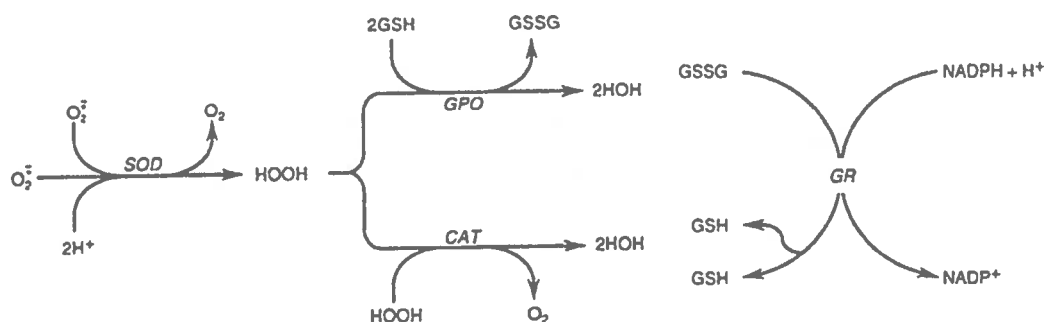


Figure 6 : Boucle d'action des enzymes antioxydantes contre les radicaux libres. Détoxification du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPO) et régénération du glutathion à sa forme réduite (GSH) à partir de sa forme oxydée (GSSG) par la glutathion réductase (GR). Tiré de (Casarett *et al.*, 2001)

Les capteurs de radicaux libres

Différentes molécules antioxydantes non enzymatiques agissent en captant les radicaux libres, dont la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocophérol), le glutathion (GSH), la β -carotène, le sélénium et la mélatonine. Ces molécules agissent en donnant des électrons aux radicaux libres, afin de stabiliser leur structure, permettant ainsi la formation de molécule soluble dans l'eau facilement éliminée par l'organisme. La quantité des ROS dans l'organisme est donc

contrôlée, évitant l'oxydation des différents constituants cellulaires. Des études ont montré que la mélatonine est l'un des plus puissants capteurs de radicaux libres, permettant l'inactivation d'un des plus dévastateurs des radicaux, le HO•, ainsi que d'une importante variété de ROS (Bromme *et al.*, 2000, Fukutomi *et al.*, 2006, Matuszak *et al.*, 1997, Sofic *et al.*, 2005, Valko *et al.*, 2005).

Le trophoblaste villosus et le stress oxydatif

Le stress oxydatif dans les grossesses normales

Chez la femme enceinte présentant une grossesse normale, les niveaux de stress oxydatif sont augmentés par rapport à la femme non enceinte due aux nombreux changements physiologiques encourus, et ce jusqu'à la délivrance. L'augmentation de l'activité métabolique contribue à générer un haut niveau ROS ainsi que des RNS. Cette augmentation de l'activité métabolique et des niveaux de ROS est due, entre autres, à une augmentation du volume sanguin, au volume placentaire, à l'augmentation de la résistance à l'insuline ainsi qu'à une immunorésistance (Tan *et al.*, 2011). L'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants joue un rôle important dans la régulation de nombreuses voies de signalisation impliquées les fonctions utérines, l'embryogénèse, l'implantation du placenta, le tonus vasculaire placentaire et utérin, la syncytialisation et le développement fœtal (Agarwal *et al.*, 2008). De plus, un bon remodelage des artères spiralées utérines permet qu'un flux sanguin constant soit apporté au placenta. Ce taux stable d'oxygène au placenta et au fœtus permet d'éviter la surproduction de ROS ainsi que le bon déroulement de la grossesse.

Le stress oxydatif dans les grossesses pathologiques

Le stress oxydatif semble être un élément clé dans la pathogénèse de nombreuses complications de la grossesse quoique le rôle exact qu'il y joue n'est pas encore bien élucidé (Burton *et al.*, 2004, Redman *et al.*, 2000). Le stress oxydatif, causé par une augmentation des oxydants par rapport aux défenses antioxydantes, a souvent été proposé comme étant impliqué dans l'étiologie de nombreuses complications de la grossesse telles que les fausses couches, l'accouchement prématuré, la prééclampsie, la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), le DGM et la mort fœtale (Boisvert *et al.*, 2010, Lagod *et al.*, 2001, Qiu *et al.*, 2011, Takagi *et al.*, 2004). Un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants au niveau placentaire se caractérise par une peroxydation des lipides, altérant les membranes cellulaires via une

augmentation de l'incorporation du cholestérol ainsi qu'une oxydation des acides gras et des protéines à basse densités (Hubel *et al.*, 1989). Des études *in vitro* ont démontré que le stress oxydatif trop élevé peut entraîner une inhibition de la différenciation et de la fusion des CTBv en STB ainsi qu'une augmentation de leur apoptose (Alsat *et al.*, 1996, Esterman *et al.*, 1997, Heazell *et al.*, 2008, Levy *et al.*, 2000, Nelson *et al.*, 1999). Un mauvais fonctionnement du STB peut diminuer l'apport au fœtus en oxygène et en nutriments, entraînant différents problèmes au cours de son développement. Ce qui concorde avec les complications retrouvées lors de grossesses compliquées par la prééclampsie et la RCIU (Heazell *et al.*, 2008). De plus, il a été suggéré que le stress oxydatif dans les grossesses pathologiques pourrait être induit par un état d'hypoxie/réoxygénation (H/R) dû à un mauvais remodelage des artères spiralées utérines. Le flux sanguin maternel entre donc dans l'espace intervillieux vers le placenta de manière pulsatile avec une haute pression, engendrant ainsi une tension en oxygène très variable (Jauniaux *et al.*, 1995, Jauniaux *et al.*, 1994). Il est d'ailleurs connu que l'H/R génère de hauts niveaux de molécules pro-oxydantes impliquées dans les grossesses pathologiques, telles que la prééclampsie et le DGM (Myatt *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2001).

L'hypoxie/réoxygénation (H/R)

L'H/R est un modèle *in vitro* efficace de génération du stress oxydatif tel qu'observé dans le placenta humain à terme provenant de grossesses pathologiques (Hung *et al.*, 2001). En effet, il a été montré qu'*in vitro*, l'H/R génère de hauts niveaux de ROS, de marqueurs cellulaires du stress oxydatif ainsi qu'une diminution des défenses antioxydantes correspondant à ce qui est observé dans les placentas de grossesses pathologiques caractérisés par un stress oxydatif, tels que la prééclampsie (Cindrova-Davies *et al.*, 2007, Hung *et al.*, 2006a, Hung *et al.*, 2001) et le DGM (Lappas *et al.*, 2011, Myatt *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2001). Il a d'ailleurs été démontré qu'*in vivo*, l'H/R survient dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie et le DGM (Figueroa *et al.*, 2000, Figueroa *et al.*, 1993, Hung *et al.*, 2006a). Ces travaux valident l'utilisation de l'H/R comme modèle d'étude des processus cellulaires impliqués dans la pathogénèse du DGM. La cause de l'H/R dans les cas de DGM n'est pas connue. Cependant, dans les cas de diabète de types 2, l'H/R est le produit de dommages causés aux cellules endothéliales par les niveaux élevés de glucose sanguin (D'Elia *et al.*, 2011, Madonna *et al.*, 2011). Tel que mentionné précédemment, cet état d'H/R conduit à la génération de ROS, principalement par la voie de la XDH/XO. Il est connu que la voie XDH/XO est exprimée (ARNm et protéine) et active dans le placenta humain normal à terme (Many *et al.*, 1996b, Telfer *et al.*, 1997). De plus, dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie et la RCIU,

une augmentation de l'expression de la XDH/XO ainsi que de l'activité de la XO est observée comparativement à ceux de grossesses normales (Many *et al.*, 2000, Many *et al.*, 1996a). Les taux de XO dans la circulation sanguine maternelle sont également plus élevés chez ces complications de la grossesse par rapport à la grossesse normale (Karabulut *et al.*, 2005, Yildirim *et al.*, 2004). D'autre part, la perfusion de placentas normaux avec la XO induit l'expression de gènes reliés au stress oxydatif (Centlow *et al.*, 2009). Enfin, l'H/R active des voies de signalisation responsables de l'induction de l'apoptose tel qu'observé dans la prééclampsie et la RCIU (Cindrova-Davies, 2009, Cindrova-Davies *et al.*, 2007, Hung *et al.*, 2006a, Hung *et al.*, 2002). L'H/R représente donc un modèle *in vitro* de choix pour générer du stress oxydatif dans le placenta et étudier les altérations qui y sont associées.

LA MÉLATONINE

La mélatonine (5-méthoxy-N-acétyltryptamine) est une hormone lipophile et hydrophile retrouvée de façon ubiquitaire dans la nature (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Il a longtemps été cru que la mélatonine était uniquement synthétisée par la glande pinéale, et ce, de façon circadienne. Depuis, il a été démontré que d'autres organes synthétisent la mélatonine, tels que le tractus gastro-intestinal, la peau, les organes reproducteurs, les plaquettes, certaines cellules du système immunitaires, plusieurs régions cérébrales (revue dans : Kvetnoy, 2002) et le placenta (D. Lanoix *et al.*, 2008). La régulation de la synthèse, le mode d'action et le rôle de la mélatonine extrapinéale demeurent toutefois mal compris.

Synthèse de la mélatonine

La mélatonine est synthétisée à partir de l'acide aminé essentiel L-tryptophane qui est transformé en 5-hydroxytryptophane puis en sérotonine. La sérotonine est convertie en mélatonine par l'activité séquentielle des enzymes aralkylamine-N-acétyltransférase (AANAT) et hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT ou ASMT, acétylsérotonine-O-méthyltransférase) (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). La AANAT acétyle la sérotonine en N-acétylsérotonine alors que la HIOMT convertie par méthylation la N-acétylsérotonine en 5-méthoxy-N-acétyltryptamine (mélatonine) (**Fig. 7**) (Wurtman *et al.*, 1968). Il est généralement admis, mais reste controversé, que chez l'humain l'enzyme AANAT est limitante dans la synthèse de la mélatonine (Klein *et al.*, 1997).

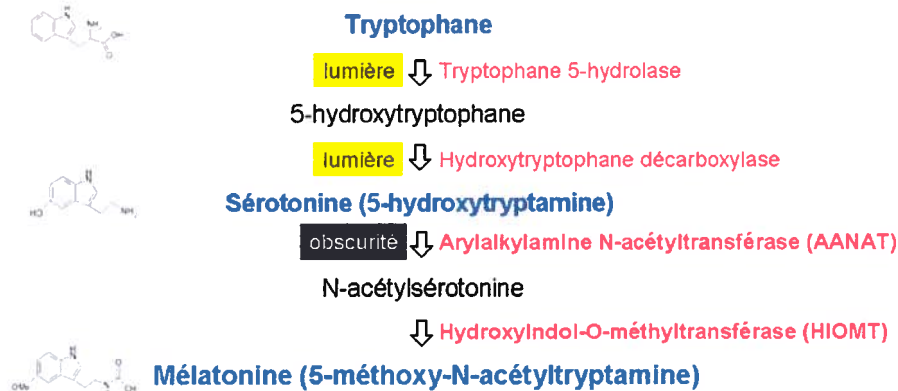


Figure 7 : Enzymes impliquées dans la synthèse de la mélatonine. Thèse de Dave Lanoix (Dave Lanoix, 2013).

La mélatonine retrouvée dans la circulation sanguine est principalement synthétisée par la glande pinéale de façon circadienne. La mélatonine pinéale est synthétisée et sécrétée plus fortement durant les périodes d'obscurité (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). La mélatonine synthétisée en dehors de la glande pinéale n'est pas contrôlée par la photopériode et surpasse celle de la glande pinéale en période d'obscurité et agit principalement localement. Par exemple, le tractus gastro-intestinal produit jusqu'à 400 fois plus de mélatonine que la glande pinéale (Huether, 1993). Notre équipe a démontré que le trophoblaste villositaire du placenta humain à terme produisait *de novo* la mélatonine (Lanoix *et al.*, 2008). Considérant la masse du placenta à terme en comparaison à celle de la glande pinéale (Castellucci *et al.*, 2006, Reichlin, 1998), on estime qu'il produit jusqu'à 225 fois plus de mélatonine (Lanoix *et al.*, 2008).

Les récepteurs de la mélatonine

La mélatonine peut se lier à deux récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G : les récepteurs MT1 (Mel1a) et MT2 (Mel1b). Le site de liaison de la mélatonine, MT3, que l'on croyait être un troisième récepteur de la mélatonine, est en fait un l'enzyme quinones réductases 2 (*dihydronicotinamide riboside : quinone reductase 2* (NQO2)) possédant un site de liaison pour la mélatonine (Dubocovich, 1995, Nosjean *et al.*, 2001, Reppert *et al.*, 1996). Chez l'humain, la mélatonine semble également se lier aux récepteurs nucléaires de la famille RZR/ROR (Smirnov, 2001). En outre, RORα (*retinoic acid receptor-related orphan*) et RZRβ (*retinoid Z receptor*) lient la mélatonine avec une haute affinité (Becker-

Andre *et al.*, 1994, Carlberg *et al.*, 1994, Carrillo-Vico *et al.*, 2005, Giguere, 1999, Wiesenberger *et al.*, 1995), cependant cela demeure controversé (Bitsch *et al.*, 2003, Dai *et al.*, 2001, Jetten, 2009, Ram *et al.*, 2002). Structuralement, le récepteur MT1 est une protéine de 350 acides aminés présentant 60% d'homologie avec le récepteur MT2 qui est une protéine à 362 acides aminés. Le récepteur MT1 a été identifié dans l'hypophyse, et le noyau supra-chiasmatique et MT2 dans la rétine ainsi que dans les tissus périphériques du système nerveux central. Les récepteurs MT1 et MT2 ont également été identifiés dans les tissus des organes reproducteurs féminins tels que le myomètre utérin et les cellules de la granulosa (Tamura *et al.*, 2008). Les récepteurs MT1 et MT2 couplés à une protéine G_i entraînent l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC), bloquant ainsi la production du second messenger adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Ces deux récepteurs de la mélatonine peuvent également lier une protéine $G_{q/11}$ et stimuler la phospholipase C- β (PLC- β) (Shyy *et al.*, 2010). Il a été démontré que la mélatonine, via l'activation de MT1 et MT2, active la différenciation, inhibe la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ovarienne et de choriocarcinomes placentaires humains (Sainz *et al.*, 2005, Sainz *et al.*, 2003, Shiu *et al.*, 2000).

Rôles de la mélatonine

La mélatonine sécrétée par la glande pinéale transmettra à toutes cellules exprimant ses récepteurs l'information sur la photopériode, permettant une adaptation physiologique aux cycles jour/nuit ou aux saisons (Claustrat *et al.*, 2005). La mélatonine possède de nombreuses actions biologiques. Elle exerce notamment un effet cytostatique, antiprolifératif, régule le système immunitaire, possède une puissante action antioxydante et anti-inflammatoire et elle régule la sécrétion de plusieurs hormones et facteurs de croissance (Claustrat *et al.*, 2005, Ekmekcioglu, 2006, Lee *et al.*, 1999, Pandi-Perumal *et al.*, 2006, Peschke *et al.*, 2006a, Reiter *et al.*, 2000). De plus, elle joue un rôle important dans les fonctions reproductrices, telles que la maturation sexuelle et l'ovulation (Boczek-Leszczyk *et al.*, 2007). La mélatonine régule également de nombreux processus cellulaires : prolifération, différenciation, apoptose et invasion (Cos *et al.*, 1998, Sainz *et al.*, 2005, Sainz *et al.*, 2003).

Action antioxydante de la mélatonine

Récepteur indépendant

Plusieurs caractéristiques de la mélatonine contribuent à faire d'elle un excellent capteur des espèces oxydantes lui prodiguant de grandes propriétés cytoprotectrice tel que revue dans Lanoix *et al* (2012c). Son caractère lipophile et hydrophile lui permet de traverser toutes les barrières morphophysiologiques avec facilité de manière à ce qu'elle soit distribuée dans tous les compartiments intracellulaires; particulièrement au niveau de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et du noyau. De plus, suite à son interaction avec les radicaux libres, les métabolites de la mélatonine qui sont produits exercent à leurs tours une action antioxydante (**Fig. 8**). Par exemple, lorsque la mélatonine capte une molécule de $\bullet\text{OH}$ elle est convertie en cyclique 3-hydroxymélatonine qui réagit avec un autre radical libre et génère une molécule de N¹-acétyl-N²-formyle-5-méthoxykynuramine (AFMK), qui est également un puissant antioxydant. L'AFMK capte les ROS et forme une molécule de N¹-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK) (Tan *et al.*, 1999, Tan *et al.*, 1998). Cette cascade antioxydante de la mélatonine fait de cette molécule un incomparable antioxydant.

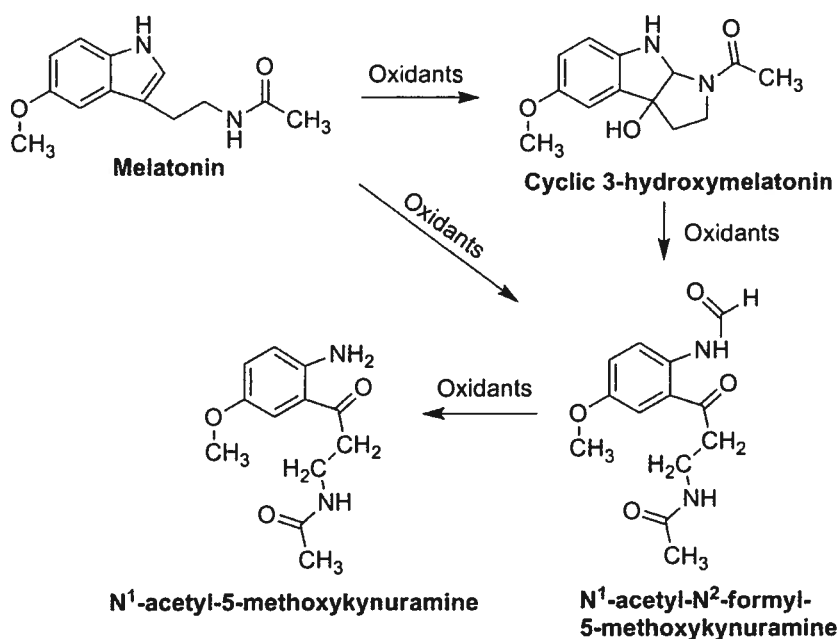


Figure 8: Cascade antioxydante de la mélatonine. Lorsque la mélatonine entre en contact avec une espèce réactive oxygénée, elle est convertie en *cyclique 3-hydroxymélatonine*. Lorsque la *cyclique 3-hydroxymélatonine* réagit avec un autre radical libre, elle est métabolisée en N¹-acétyl-N²-formyl-5-méthoxykynuramine. Lorsque le N¹-acétyl-N²-formyl-5-méthoxykynuramine capte un autre ROS, le N¹-acétyl-5-méthoxykynuramine est formé. Tiré de (D. Lanoix *et al.*, 2012c)

Récepteur dépendant

Des études ont démontré que la mélatonine augmente l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes via ses récepteurs MT1/MT2 qui régulent les MAPKs, la PKC et la PLC (Rodriguez *et al.*, 2004, Tomas-Zapico *et al.*, 2005).

La capacité de la mélatonine d'augmenter l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes ainsi que son action de capteur par sa cascade antioxydative fait d'elle un très puissant antioxydant (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2010, Jou *et al.*, 2010, Korkmaz *et al.*, 2009b). Plusieurs études suggèrent que la mélatonine pourrait avoir des effets positifs en tant qu'antioxydants et anti-inflammatoire sur les nouveau-nés (Gitto *et al.*, 2009), les personnes atteintes du cancer (Bejarano *et al.*, 2009, Korkmaz *et al.*, 2009a, Paredes *et al.*, 2009), de maladies neurodégénératives (Fernandez-Bachiller *et al.*, 2009, Manda *et al.*, 2010) et le vieillissement (Akbulut *et al.*, 2009).

La mélatonine et la grossesse

La mélatonine, grâce à son caractère lipophile et hydrophile, peut traverser la barrière placentaire et entrer dans la circulation fœtale (Okatani *et al.*, 1998). Sa concentration dans le sang de cordon ombilical est d'ailleurs plus élevée que dans le sang maternel (Mitchell *et al.*, 1979). Il y a une augmentation de la production de mélatonine tout au long de la grossesse pour atteindre son maximum au 3^e trimestre. De plus, les taux maternels de mélatonine sont plus élevés en période nocturne et diurne chez les femmes enceintes que chez les femmes non enceintes (Kivela, 1991, Nakamura *et al.*, 2001). La cause physiologique et la source de cette augmentation de mélatonine dans le sang maternel ne sont pas connues. Par contre, il a été montré que les taux sanguins maternels de mélatonine retournent à un niveau similaire à celui des femmes non enceintes après la délivrance du placenta (Nakamura *et al.*, 2001, Wehr, 1997). D'autre part, Nakazawa *et al.* (1999) ont démontré la présence de niveaux élevés de mélatonine dans le placenta humain et ce même en période diurne (Nakazawa *et al.*, 1999). De plus, les taux de mélatonine dans le placenta humain à terme ne subissent pas la variation circadienne observée dans le sang maternel (Nakazawa *et al.* 1999). De plus, une équipe a décrit des changements morphologiques et biochimiques (augmentation de l'activité des enzymes de synthèses) de la glande pinéale chez les femmes enceintes comparativement à celle non enceinte (Lew, 1987), alors qu'une autre n'a observé aucun effet de la grossesse sur la glande pinéale (Kivela, 1991). Ces travaux suggèrent que l'augmentation de mélatonine observée dans le sang maternel durant la grossesse pourrait être de source extra-pinéale et que

le placenta pourrait en être la source. Dans ce sens, les travaux de l'équipe du Pre Vaillancourt montrent la production de mélatonine ainsi que l'expression fonctionnelle de ses enzymes de synthèse et de ses récepteurs dans le trophoblaste humain (Lanoix *et al.*, 2008, Lanoix *et al.*, 2006). La mélatonine produite localement pourrait jouer un rôle paracrine/autocrine dans la régulation du développement et des fonctions endocrines placentaires. D'ailleurs il a été démontré que la mélatonine contribue à la maintenance de la grossesse en stimulant la production de progestérone et en inhibant la synthèse de prostaglandine, arrêtant ainsi les contractions utérines (Richter *et al.*, 2009). La mélatonine participerait également à la régulation du développement fœtal. Chez l'humain, les récepteurs MT1 et MT2 ont été démontrés dès la 18^e semaine de grossesse dans le cerveau et dans les tissus périphériques, tels que le rein, le foie ainsi que la rétine. De plus, le récepteur MT1 a été observé dans les cellules souches neuronales, ce qui suggère un rôle important de ce récepteur et de la mélatonine dans le développement neuronal du fœtus humain (Niles *et al.*, 2004). En outre, il a été montré dans un modèle animal que la mélatonine maternelle est importante pour la croissance et la maturation sexuelle des rejetons (Bishnupuri *et al.*, 1999, Bishnupuri *et al.*, 2000, Bishnupuri *et al.*, 2001). Dans l'ensemble, ces études indiquent une production locale de mélatonine par le placenta et suggèrent que cette mélatonine endogène pourrait jouer un rôle différent de celle produite par la glande pinéale durant la grossesse.

Il a aussi été démontré que le récepteur MT1 est exprimé tout au long de la grossesse dans le placenta de rates et que son expression varie de manière spatiale et temporelle (Lee *et al.*, 2003). Cette équipe a également montré que l'expression du gène de la lactogène placentaire-II (PL-II, un équivalent de la hPLt) est modulée par le rythme circadien et que la variation observée est inverse à celle de l'expression du gène MT1. Aussi, la 6-choromélatonine (un agoniste sélectif et stable de la mélatonine) diminue l'expression des gènes de la PL-II, la variante de la lactogène placentaire I (PL-I) et de la protéine C prolactine-libre (PLP-C) dans le tissu placentaire de rates *in vitro* (Lee *et al.*, 1999). À ce jour, il existe peu d'études sur le rôle et le mode d'action de la mélatonine placentaire, tant chez l'humain que l'animal.

LE DIABÈTE GESTATIONNEL MELLITUS (DGM)

Il existe trois formes de diabète mellitus : le diabète de type I, caractérisé par une destruction auto-immune des cellules β du pancréas; le diabète de types II, dut à une résistance à l'insuline des tissus cibles; le diabète gestationnel diagnostiqué au cours de la grossesse et se résorbant après la délivrance. Le DGM se caractérise par une résistance à l'insuline

combinée à une intolérance au glucose, similaire au diabète de types II. Au Québec, le DGM complique 7 à 9% des grossesses et survient normalement au cours du deuxième et troisième trimestre de la grossesse (entre 24 et 28 semaines de gestation) (AOGQ, 2012). Cette étape de la grossesse est déterminante puisque c'est à ce moment que débute la sécrétion de la hPL par le placenta qui responsable de l'insulino-résistance chez la mère (AOGQ, 2012). Les principaux facteurs de risque du DGM sont l'âge maternel, le surpoids avant et durant la grossesse et les antécédents familiaux de diabète. De plus, le DGM est accompagné par une haute incidence de complication foétale telle que : la macrosomie, une prédisposition a une hyper-agrégation des plaquettes, des malformations congénitales, des difficultés respiratoires au niveau foetal et une augmentation du risque de morbidité périnatale (Mitanchez, 2010, Simpson *et al.*, 1983). Le DGM peut également conduire, chez l'enfant, au développement de maladie cardiovasculaire et à l'obésité ainsi qu'au diabète de type II chez l'enfant et sa mère (Bottalico, 2007). Le diagnostic du DGM se fait par une mesure de la glycémie suite à l'absorption de 50g de glucose 1 heure avant. Si les résultats se situent entre 7,8 et 10,2 mmol/L. la patiente devra être suivie par une diététiste et son médecin traitant. Le traitement le plus utilisé est une diète faible en glucose afin d'éviter les variations importantes de la glycémie. Cependant, si une glycémie normale ne peut être atteinte avec une diète spéciale un supplément en insuline doit être administré (AOGQ, 2012).

Le stress oxydatif dans le DGM

Les femmes atteintes de DGM présentent une augmentation des niveaux sanguins de ROS, qui ne sont pas régulés par une augmentation des enzymes antioxydantes, générant ainsi un état de stress oxydatif (Chaudhari *et al.*, 2003, Grissa *et al.*, 2007, Peuchant *et al.*, 2004). Les hauts niveaux de ROS dans le sang maternel dans les cas de DGM sont corrélés avec une augmentation de l'activité de la XO (Biri *et al.*, 2006) et une diminution de l'activité de la SOD et de la GPx (Lappas *et al.*, 2011). Dans les placentas compliqués par un DGM comparativement à ceux de grossesses normales, une augmentation de marqueurs du stress oxydatif a également été décrite (Coughlan *et al.*, 2004, Marseille-Tremblay *et al.*, 2008). Cependant, il existe toujours une controverse concernant l'expression et l'activité des enzymes pro-oxydantes, telles que la XO, et antioxydantes dans le placenta provenant de grossesses compliquées par un DGM, à savoir si elles sont augmentées, inchangées ou diminuées. Une étude a démontré une augmentation des défenses antioxydantes alors qu'une autre montrait une diminution (Biri *et al.*, 2006, Lappas *et al.*, 2011). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'une des équipes

a analysé l'activité enzymatique alors que l'autre a analysé l'expression de l'ARNm. De plus, ces deux équipes n'ont pas pris en considération l'indice de masse corporelle (IMC) des patientes. En effet, des études épidémiologiques ont démontré une association entre un surpoids pré-gestationnel et un haut risque de développer un DGM, une prééclampsie et une restriction de croissance intra-utérine (Siega-Riz *et al.*, 2006, Valsamakis *et al.*, 2006). L'obésité entraîne une augmentation de la production des ROS induisant un stress oxydatif élevé se caractérisant par une augmentation des enzymes pro-oxydantes ainsi qu'une diminution des enzymes antioxydantes (Unger *et al.*, 2010). Il aurait été nécessaire de prendre en compte de ce paramètre à fin qu'une personne avec un IMC élevé ne se retrouve pas dans le groupe contrôle. Il serait donc important de vérifier l'activité ainsi que l'expression des enzymes pro- et antioxydantes tout en tenant compte de l'IMC des patientes afin d'avoir des données plus représentatives.

La mélatonine et le diabète

La mélatonine et ses récepteurs sont impliqués dans le diabète à plusieurs niveaux. Une réduction significative des taux sanguins de mélatonine a été observée chez le diabète de type 2 ainsi que chez des modèles de rat et de hamster diabétiques (Peschke *et al.*, 2006b). Chez le rat diabétique, la réduction de la sécrétion de mélatonine est attribuable à une diminution de l'activité de l'enzyme AANAT, l'enzyme limitante dans la synthèse de la mélatonine, dans la glande pinéale (Peschke *et al.*, 2006b).

Les récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine sont exprimés sur les cellules β pancréatiques (Muhlbauer *et al.*, 2007). Il a d'ailleurs été montré que l'activation des récepteurs MT1 et MT2 était essentiel à l'homéostasie des taux de la glycémie (Claustrat *et al.*, 2005). En effet, l'administration de mélatonine réduisait significativement les taux sanguins de glucose et de lipides chez un modèle de rats diabétiques (Montilla *et al.*, 1998). Des études ont montré que la présence d'une mutation génétique assurant la perte de fonction du récepteur MT2 était un important facteur de risque de développer le diabète de type 2 ainsi que le DGM (Bonnefond *et al.*, 2012, Bouatia-Naji *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2011, Ling *et al.*, 2011, Prokopenko *et al.*, 2009). La mélatonine protège également les cellules β pancréatiques ainsi que plusieurs organes qui sont affectés par le stress oxydatif lors de diabète, tel que les reins, le cerveau, la rétine et le système vasculaire (Andersson *et al.*, 2001, Baydas *et al.*, 2003, Baydas *et al.*, 2004, Cam *et al.*, 2003, Colantuoni *et al.*, 2002, Derlacz *et al.*, 2005, Reyes-Toso *et al.*, 2004, Sudnikovich *et al.*, 2007, Yavuz *et al.*, 2003). Considérant ceci, la mélatonine a été utilisée comme adjuvant

dans des essais cliniques pour le traitement des complications associées au diabète de type 2. La mélatonine a en effet amélioré le contrôle de la glycémie, diminué les taux de lipides et les niveaux de stress oxydatifs chez les patients (Hussain *et al.*, 2006, Kadhim *et al.*, 2006, Paskaloglu *et al.*, 2004).

Il y a toutefois très peu d'étude en lien avec la mélatonine et le DGM, sauf celle sur la mutation du récepteur MT2. Quelques études ont par contre été réalisées chez des rates gestantes diabétiques. Il a entre autres été démontré que la co-administration de la mélatonine et d'insuline permet de renverser les effets néfastes générés par le diabète tels que la mortalité embryonnaire et les altérations de croissance fœtale (Salem *et al.*, 2010). De plus, l'administration de 10 mg/kg par jour de mélatonine à des rates gestantes diabétiques réduit les taux de stress oxydatif dans le sang comparativement à celles sans traitement de mélatonine (Guney *et al.*, 2011). Chez les rates dont le taux de mélatonine sanguin est diminué significativement par une pinéalectomie, une augmentation significative des dommages oxydatifs dans l'utérus durant et après la grossesse a été observée (Sainz *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que l'administration de mélatonine chez les rats nourri avec une diète riche en glucide induisant l'obésité réduit le poids corporel, les taux de glucose, de leptine et de triglycérides ainsi que du stress oxydatif (Prunet-Marcassus *et al.*, 2003). La caractérisation de la mélatonine dans le DGM doit donc être approfondie, en particulier au niveau placentaire.

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

La mélatonine agit comme capteur des éléments du stress oxydatif et active la synthèse et l'activité des enzymes antioxydantes. Le trophoblaste humain produit la mélatonine et exprime ses récepteurs. Le stress oxydatif altère les fonctions du trophoblaste et est impliqué dans la pathogénèse du DGM. Les taux sanguins maternels de mélatonine sont altérés dans les cas de diabète de type 2. Une étude a démontré que chez les rats avec une diète induisant l'obésité, une réduction significative des taux sanguins de mélatonine, par pinéalectomie, augmente les taux de glucose ainsi que le stress oxydatif alors que l'administration de mélatonine permettait de renverser ces effets (Prunet-Marcassus *et al.*, 2003). Notre laboratoire a récemment démontré dans les tissus placentaires prééclampsiques, une diminution significative de la production de mélatonine conséquente avec la réduction de l'expression et de l'activité de AANAT ainsi que de l'expression des récepteurs MT1 et MT2 (D. Lanoix *et al.*, 2012a). Enfin, plusieurs études proposent que la mélatonine joue un rôle protecteur dans le stade précoce et avancé de diverses maladies dans laquelle la pathogénèse implique des dommages induits par les radicaux libres, dont des complications de la grossesse telle que la prééclampsie et le diabète gestationnel mellitus (Allegra *et al.*, 2003, Figueroa-Quevedo *et al.*, 2011, Milczarek *et al.*, 2010, Okatani *et al.*, 2001, Reiter *et al.*, 2000, Reiter *et al.*, 2009, Sallinen *et al.*, 2007, Tomas-Zapico *et al.*, 2005, Wakatsuki *et al.*, 2001). Par contre, le rôle de la mélatonine dans la régulation de l'homéostasie oxydative du trophoblaste ainsi que dans la pathogénèse du DGM n'a jamais été étudié.

Ce projet de recherche repose sur **les hypothèses suivantes** : 1) les placentas de grossesse compliquée par un DGM sont caractérisés par une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'une altération du système mélatonine comparé aux placentas de grossesses normales et 2) la mélatonine prévient le stress oxydatif du STB induit par de l'hypoxie/réoxygénation. Les **objectifs spécifiques** pour vérifier ces hypothèses de recherche sont : 1) comparer le niveau de stress oxydatif et l'expression des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine ainsi que des enzymes AANAT et HIOMT assurant sa synthèse dans les tissus placentaires de DGM par rapport à ceux de grossesses normales et 2) déterminer dans un modèle *in vitro* simulant les altérations placentaires retrouvées dans le DGM, la capacité de la mélatonine à prévenir le stress oxydatif induit par de l'H/R dans les primocultures de STB.

Résultats

**CHAPITRE 1: LINKING THE ALTERATION OF PLACENTAL MELATONIN TO THE LOSS OF
THE OXIDATIVE HOMEOSTASIS IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS**

Andrée-Anne Lacasse, Julie Lafond et Cathy Vaillancourt

Manuscrit en préparation pour soumission à *Diabetes and Metabolism*

Résumé de l'article en français

La mélatonine, un puissant antioxydant, est produite placenta humain qui exprime ses récepteurs. Le diabète gestationnel mellitus (DGM) est caractérisé par une augmentation du stress oxydatif dans le sang maternel. Par contre, le statut oxydant et le système mélatonine dans les placentas de grossesses compliquées par un DGM n'a jamais été étudié. Pour combler ce vide, dans cette étude nous comparons : (i) l'expression des enzymes de synthèse (aralkylamine-N-acétyltransferase (AANAT) et hydroxyindole-O-méthyltransferase (HIOMT)) et des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine; (ii) la génération des espèces réactives oxygénées (ROS) et (iii) l'expression et l'activité des enzymes antioxydants dans les placentas de grossesses DGM vs. non-DGM. L'expression de AANAT, de HIOMT, de MT1 et de MT2 est significativement diminuée dans les placentas de DGM en comparaison à ceux de grossesses normales. Les niveaux de ROS, ainsi que l'expression de la xanthine oxydase (XO) sont significativement augmentés dans les placentas de DGM par rapport aux non-DGM. Au contraire, l'expression et l'activité des enzymes antioxydants, superoxyde dismutase 1 (SOD1) et 2 (SOD2) et glutathion peroxydase (GPx), est significativement réduite dans les placentas de DGM par rapport aux normaux. Cette étude démontre une altération du système mélatonine placentaire associée à une augmentation du stress oxydatif dans les placentas de DGM par rapport à ceux de grossesses normales. Ces résultats suggèrent la perte de l'effet protecteur de la mélatonine contre le stress oxydatif et une avenue thérapeutique potentielle pour la mélatonine contre les dommages induits par le stress oxydatif dans les grossesses compliquées par un DGM.

Contribution de l'étudiant

L'étudiante a réalisé la totalité des expériences et l'analyse des résultats. Elle a également rédigé le manuscrit en collaboration avec les co-auteurs.

**Linking the alteration of placental melatonin to the loss of the oxidative homeostasis in
gestational diabetes mellitus**

Andrée-Anne Lacasse^{1,2}, Julie Lafond^{2,3}, Cathy Vaillancourt^{1,2,*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada; ²BioMed Research Center, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada; ³Laboratoire de Physiologie materno-fœtale, Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada.

Running title: Melatonin in placentas of GDM pregnancies

* Corresponding author: Cathy Vaillancourt, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier
531, boul. des Prairies, Building 18
Laval (QC) H7V 1B7, CANADA
T: (450) 687-5010 # 8812
F: (450) 686-5389
Email: cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

We previously demonstrate that melatonin, a powerful antioxidant, is produced and that its receptors are expressed in normal human placenta. Gestational diabetes mellitus (GDM) is a complication characterized by increased maternal oxidative stress. However, the oxidative status of the placenta is not clearly established and melatonin has never been characterized in placentas from GDM pregnancies. Therefore, this study aims to compare (i) expression of melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptors, (ii) reactive oxygen species (ROS) generation and (iii) antioxidant enzymes expression and activity in placentas from GDM vs. normal pregnancies. Protein expression of both melatonin-synthesizing enzymes, aralkylamine-*N*-acetyltransferase (AANAT) and hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT) as well as MT1 and MT2 melatonin receptors is significantly reduced in placentas from GDM compare to normal pregnancies. ROS levels and the expression and activity of xanthine oxidase (XO), a major ROS-generating enzyme, are significantly increased in placentas from GDM vs. normal pregnancies. In the other hand, the expression and activity of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase 1 (SOD1) and 2 (SOD2) as well as glutathione peroxidase (GPx), is significantly reduced in placentas from GDM compared to non-GDM. The alteration of placental melatonin systems associated with increased pro-oxydant and decreased antioxidant defenses suggests the loss of the protective effect of melatonin against placental oxidative stress in GDM placentas. Taken together with the current literature, this study suggests a potential therapeutic avenue for melatonin against oxidative stress damages in GDM.

Keywords: Aralkylamine-*N*-acetyltransferase (AANAT), hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT or ASMT), MT1 melatonin receptor, MT2 melatonin receptor, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), xanthine oxidase (XO).

INTRODUCTION

Gestational diabetes mellitus (GDM) affect 3 to 20% of pregnancies, depending of their risk factors (Canadian Diabetes Association 2013). An increase in its prevalence has been observed in the last decades, as for type II diabetes (Ferrara 2007). GDM usually arises in the second and third trimester of pregnancy (between 24 to 28 weeks of gestation). It is characterized by an insulin resistance combined with glucose intolerance, similar to type II diabetes, appearing during pregnancy and resolving after delivery. However, there is an increased risk for women with a history of GDM to suffer from diabetes after delivery (Lauenborg, Hansen et al. 2004). The pathophysiology of GDM is not well understood. Although, it has been suggested that impaired placental functions may contributed to the development of this disease (Gauster, Desoye et al. 2012).

GDM is associated with high incidence of fetal complications such as macrosomia, predisposition to platelet hyper-agreeability, congenital malformations, fetal respiratory distress and increased perinatal risk of morbidity (Simpson, Elias et al. 1983; Mitanchez 2010). Moreover, GDM can lead later in child's life or adulthood to the development of obesity, cardiovascular disease and type II diabetes (Bottalico 2007). Maternal hyperglycemia is considered as the primary teratogenic factor, although oxidative stress has also been suggested to induce congenital anomalies (Eriksson, Cederberg et al. 2003; Allen, Armson et al. 2007).

Oxidative stress is a natural consequence of oxygen metabolism occurring when antioxidant enzymes defenses are overwhelms by the reactive oxygen species (ROS) production and result to potential damage (Burton and Jauniaux 2011). At homeostasis levels, ROS are eliminated by several mechanisms such as free radical scavengers and antioxidant enzymes (review in (Jezek, Dlaskova et al. 2012). The major antioxidant enzymes are the superoxide dismutase 1 (SOD1 or Cu, Zn-SOD, localized in the cytosol), the superoxide dismutase 2 (SOD2 or Mn-SOD, localized in the mitochondrial matrix) and the glutathione

peroxidase (GPx) (review in (Jezek, Dlaskova et al. 2012)). Normal pregnancy is a state of enhanced ROS (Wisdom, Wilson et al. 1991). However, antioxidant defenses are up-regulated to counterbalance it (review in (Jezek, Dlaskova et al. 2012)). During pregnancy, major maternal physiological changes occur to guarantee proper growth and development of the fetus as well as preparation for delivery. In addition, the high metabolic demand and elevated requirement of oxygen contributes to ROS generation in pregnant women (Little and Gladen 1999; Hung, Lo et al. 2006). However, in maternal blood from GDM, increased ROS levels are not counterbalanced by an increase in antioxidant defenses, thereby generating systemic oxidative stress. Indeed, it has been demonstrated that high ROS level in maternal blood of GDM women arises from increased activity of xanthine oxidase (XO), the main free radical-producing enzyme (Biri, Onan et al. 2006), as well as from down regulated activity of antioxidants enzymes (Lappas, Hiden et al. 2011). However, there is a controversy surrounding oxidant status in placentas from GDM, whether oxidative stress is increased or decreased (Biri, Onan et al. 2006; Lappas, Mitton et al. 2010).

Melatonin, one of the most powerful antioxidant known to date, reduces damages in many organs and diseases, scavenging free radicals and up-regulating cellular antioxidant defenses (Okatani, Wakatsuki et al. 2001; Sallinen, Manttari et al. 2007; Hardeland, Tan et al. 2009; Kang, Koh et al. 2011; Watanabe, Hamada et al. 2012). Melatonin metabolites are also excellent ROS scavengers (Matuszak, Reszka et al. 1997; Bromme, Morke et al. 2000; Sofic, Rimpapa et al. 2005; Valko, Morris et al. 2005; Fukutomi, Fukuda et al. 2006; Hardeland, Tan et al. 2009). This indolamine (5-methoxy-*N*-acetyltryptamine) is synthesized from serotonin by the sequential action of aralkylamine-*N*-acetyltransferase (AANAT) and hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT, also known as acetylserotonine-*O*-methyltransferase, ASMT) (Wurtman and Axelrod 1968). Part of melatonin antioxidant effects are mediated by two high affinity G protein-coupled receptors, MT1 and MT2 (Rodriguez, Mayo et al. 2004; Tomas-Zapico and Coto-Montes 2005). We have demonstrated melatonin production and expression of its

receptors in human placentas (Lanoix, Beghdadi et al. 2008). In addition, we and others have shown that melatonin and its metabolites prevent placental oxidative stress and apoptosis as well as production of pro-inflammatory cytokines in humans and rats, suggesting that melatonin can improve metabolic alteration associated with obesity and GDM (Milczarek, Klimek et al. 2000; Okatani, Wakatsuki et al. 2001; Milczarek, Hallmann et al. 2010; Lanoix, Lacasse et al. 2012). However, the expression of melatonin-synthesizing enzymes and its receptors has never been compared in placentas from normal and GDM pregnancies. Therefore, the goal of this study was to investigate: pro-oxidant levels (ROS levels, and XO expression and activity), antioxidant enzyme defenses (SOD1, SOD2 and GPx expression and activity) and melatonin system (AANAT, HIOMT, MT1 and MT2 expression) in placentas from normal compared to GDM pregnancies.

METHODS

Subjects and placental tissues

Women were recruited before week 10 of pregnancy, at the Clinic FIDES or at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc. The protocol was approved by the institutional review board for human subjects and all women provided their written informed consent. All women completed an interview-administered questionnaire containing medical history, drinking and smoking habits, and their general physical condition before (age, weight, height) and during pregnancy (weight gain, gestational age and mode of delivery) (Table 1). At birth, weight and length of the child and placental weight were also noted. In this study, women diagnosed with GDM according to the criteria of the American Diabetes Association (American Diabetes Association 2012) were compared to women without GDM (called normal group). All women with GDM were treated by adjusting their diet and with insulin supplements. Women with other pathological conditions than GDM, smokers and those on medication (other than insulin for GDM) were excluded from this study.

Human term placentas (37 to 41 weeks) were obtained immediately after delivery and immersed in Dulbecco's minimal essential medium-high glucose (DMEM-HG; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) containing antibiotics (5 µg/ml amphotericin, 50 µg/ml gentamycin, 0.12 mg/ml penicillin), kept at 4°C and processed within 1 h. Following the removal of the amnion, the chorion and the decidua layer, 5-cm² sections of the trophoblast tissues were cut, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis as described in (Lanoix, Beghdadi et al. 2008).

RT-qPCR analysis

The mRNA expression was analyzed by reverse-transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (real-time; qPCR), as described previously (Lanoix, Lacasse et al. 2012). Briefly, total RNA was extracted from frozen human placental tissue using Aurum Total RNA mini kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). RNA was quantified by spectrophotometric measurement (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The Experion™ Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad) was used to determine RNA integrity. Only samples that successfully satisfied the quality control standards were processed to complementary DNA (cDNA) using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Specific primers for AANAT, HIOMT, MT1, MT2, XO, SOD1, SOD2, GPx, GAPDH, PPIA, and YWHAZ (**Table 2**) were designed using Oligo 6 software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA). Reactions were run on a CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (Lanoix, Lacasse et al. 2012). The stability of reference genes was analyzed using geNorm software. Gene expression was normalized to GAPDH, PPIA and YWHAZ as well as expressed as relative fold expression, as previously described (Lanoix, Lacasse et al. 2012).

Western blot analysis

The protein expression was analyzed by semi-quantitative Western blot analysis p, as described previously (Lanoix, Beghdadi et al. 2008; Lanoix, Guérin et al. 2012; Lanoix, St-Pierre et al. 2012). Briefly, total proteins were extracted from frozen placental tissue using ice-cold modified radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mmol/l Tris-HCL pH 7.4, 1% NP-40, 0,25% nadeoxycholate, 150 mmol/l NaCL and 1 mmol/l EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors as described previously (Lanoix, Beghdadi et al. 2008). Tissues were ground and homogenized using a QIAshredder spin column homogenizer (Qiagen, Toronto, ON, Canada). The homogenates were then centrifuged at 13 000 x g for 10 min at 4 °C to remove insoluble material. The concentration of each sample was determined by spectrophotometric quantification (SpectraMax M5 with SoftMax Pro v5 software, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent according to the manufacturer's instruction (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Samples (50 µg per lane) were solubilized in 10% SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The blots were blocked for non-specific binding in tris buffered saline solution (TBS) containing 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. They were incubated over night at 4°C with primary antibodies as described in **Table 3**. Membranes were then washed four times for 10 min with TBS-Tween and three times for 5 min with TBS. Next, the membranes were reprobed with the appropriate HPR-conjugated secondary antibodies (**Table 3**) for 1 h at room temperature. Blots were washed three times for 5 min with TBS and rinsed quickly four times in water before detection with the Immobilon Western Chemiluminescent HPR Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Band intensity was analyzed and quantified by densitometric analysis using FluorChem FC2 Western Blot Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). For normalization of total proteins transferred to PVDF membranes were stained for 45 sec with amido black staining solution (Sigma, St-Louis, MO, USA) and were then washed in destaining solution (50 % methanol, 7 % acetic acid) as previously described (Lanoix, St-Pierre et al. 2012).

Stained blots were scanned using FluorChem FC2 Western Blot Imager. Proteins expression was expressed as relative fold expression of amido black band density as previously described (Lanoix, St-Pierre et al. 2012).

Relative ROS levels analysis

Relative ROS levels were detected with the Reactive Oxygen Species Detection Reagents (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Proteins from placental tissues were extracted and quantified as described above and 10 µg of proteins were used. Relative ROS levels were determined by fluorimetry using 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA) according to the manufacturer's instruction.

SOD, GPx and XO activity analysis

Enzymes activity assays of normal and GDM placental tissue were performed using SOD Activity Assay Kit # K335-100, GPx Activity Assay Kit #K762-100 and XO Assay Kit #K710-100 according to manufacturer's instruction (BioVision, Mountain View, CA, USA). Briefly, samples were prepared from 0.05 g of placental tissues. Samples were ground and tissue was solubilized in cold Assay Buffer specific to each enzyme and provide by the companies. Samples were homogenized using QIAshredder columns and centrifuged 2 min at 20 000 x g. Enzyme activity was determined by spectrophotometry in supernatant using specific standard curve.

Statistical analysis

All data are represented as mean $\pm$ S.D. Statistical significance between GDM pregnancies and normal gestational-matched controls was determined by non-parametric Mann-Whitney U-test using Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data were considered statistically significant at a *P* value < 0.05.

RESULTS

Clinical characteristics of patients and placentas

Table 1 presents clinical characteristics of patients and placentas used in this study. As shown, no significant differences were observed for any of the characteristics between normal or GDM pregnancies, except for the maternal BMI. There is a significant increased maternal BMI in pregnancies complicated by GDM ($P = 0.0159$) compared to normal ones. Therefore, the only difference between normal and GDM group are the clinical features of GDM.

Reduced protein expression of melatonin-synthesizing enzymes in GDM compared to normal pregnancy placentas

mRNA and protein expression levels of AANAT and HIOMT melatonin-synthesizing enzymes between placentas from GDM and normal pregnancies are shown in **Figure 1**. The placental expression of AANAT and HIOMT genes was not significantly different in GDM compared to normal pregnancies placentas (**Fig. 1A-B**). A significantly reduced protein expression of AANAT ($P < 0.0001$) and HIOMT ($P = 0.0002$) was shown in GDM placentas compared to normal ones (**Fig. 1C-D**). Thus **Figure 1** suggests a decreased melatonin production in placentas from GDM compared to normal pregnancies. To pursue the analysis of the melatonin system in placentas from pregnancies complicated by GDM, the expression of both melatonin receptors was assessed.

Reduced expression of melatonin receptors in placentas from GDM compared to normal pregnancies

Figure 2 shows mRNA and protein expression levels of MT1 and MT2 melatonin receptors between placentas from GDM and normal pregnancies. RT-qPCR experiments demonstrated a significant reduction in both MT1 ($P = 0.0211$) and MT2 ($P = 0.0211$) receptors expression in placentas from GDM compared to normal pregnancies (**Fig. 2A-B**). Accordingly, a

semi-quantitative western blot analysis demonstrated that the protein expression of MT1 ($P = 0.0317$) and MT2 ($P = 0.0159$) was significantly reduced in GDM placentas compared to normal ones (**Fig. 2C-D**). This demonstrates that GDM pregnancy is characterized by a significant reduced expression of both placental melatonin receptors.

Increased ROS generation in placentas from GDM compared to normal pregnancies

Figure 3A shows that ROS levels were significantly increased in placentas from GDM compared to normal pregnancies ($P < 0.0001$). This result indicates that placentas from GDM pregnancies are characterized by increased ROS production compared to normal pregnancies. The expression and activity of XO, one of the main generators of ROS, was analyzed in **Figure 3B-C-D**. A significant increase of XO mRNA ($P = 0.0396$) and protein ($P = 0.0059$) expression as well as its activity ($P = 0.0057$) was observed in GDM compare to normal pregnancies placentas. This indicates that placentas from GDM compare to normal pregnancy are characterized by an increased in pro-oxidant levels. Therefore, to determine the pro-oxidant-antioxidant balance, the expression and activity of antioxidant defense enzymes were analyzed.

Reduced antioxidant enzymes expression and activity in GDM compared to normal pregnancies placentas

SOD1 and SOD2 mRNA ($P = 0.0454$ and $P = 0.0254$) and protein ($P = 0.0635$ and $P = 0.0317$) expression were significantly decreased in placentas from GDM compared to normal pregnancies (**Fig. 4 A; 4B**). Total SOD activity was also significantly reduced ($P = 0.0033$) in placental tissues from GDM compared to normal pregnancies (**Fig. 4 C**). **Figure 5** demonstrates a significant reduction of GPx mRNA ($P = 0.0422$) and protein ($P = 0.0317$) expression as well as its activity ($P = 0.0006$) in GDM placentas compare to normal pregnancies. Overall **Figures 4 and 5** demonstrate that an alteration of endogenous antioxidant defense enzymes contributes to the increased ROS levels detected in placentas from GDM compared to normal pregnancies.

DISCUSSION

This study demonstrates significant reduction of protein expression of the melatonin-synthesizing enzymes and the MT1 and MT2 receptors in human placental tissues from GDM compared to normal pregnancies, indicating an alteration of the melatonin system in this pregnancy complication. In addition, our results demonstrated that placentas from GDM are characterized by an increase of ROS production in conjunction with a reduced antioxidant enzymes capacity in comparison to normal pregnancies, leading to enhanced placental oxidative stress.

Epidemiological studies have shown an evident association between pre-gestational overweight and increased risk of developing GDM, preeclampsia and intra-uterine growth restriction (Siega-Riz and Laraia 2006; Valsamakis, Kanaka-Gantenbein et al. 2006). Accordingly, in our cohort women affected by GDM were overweight (BMI 25-29.9 kg/m²) or obese (BMI > 30 kg/m²) compared to non-GDM mother (BMI 18.5-24.9 kg/m²) who had a normal weight. Over nutrition, from high calories and fatty diets, associated to obesity, has been shown to induce lipotoxicity and glucotoxicity and increased oxidative stress (Unger, Clark et al. 2010). Increased oxidative stress is a known inducer of pro-inflammatory cascades and tissue damages associated with obesity and diabetes (Unger, Clark et al. 2010). In agreement with this, our study shows an increased oxidative stress in placental tissue from GDM mother, which are overweight compared to normal weight mothers without GDM. However, in opposition to our results, a study shows no reduction of SOD and GPx mRNA expression in placentas from GDM in comparison to normal pregnancies (Lappas, Mitton et al. 2010). This could be due to the fact that in the study from Lappas (2010), the participants from both normal and GDM groups had a BMI corresponding to an overweight. The difference observed between Lappas's study and our data could also be explained by the reference gene used to compare gene expression. Indeed, we previously demonstrated that it is crucial to select appropriate reference genes to obtain accurate and reproducible RT-qPCR data and how different or even opposite results can be

reported if this key step is not followed (Lanoix, St-Pierre et al. 2012). We showed that the geometric mean of three stably expressed reference genes, GAPDH, PPIA and YWHAZ, must be performed to accurately compare gene expression profiles between placentas from GDM and normal pregnancies (Lanoix, St-Pierre et al. 2012). However, Lappas and colleagues (Lappas, Mitton et al. 2010) only used ribosomal 18S RNA as a reference gene, which as the greatest expression variability between placentas from GDM and normal pregnancies as previously shown (Lanoix, Lacasse et al. 2012). This discrepancy could explain the differences observed in our results.

Normal pregnancy is itself a state of oxidative stress which is controlled by an increased in antioxidant enzymes defenses (Gitto, Pellegrino et al. 2009). As shown in the present study, increased ROS production by the XO is not counterbalanced by an increased in antioxidant enzymes expression and activity in placental tissues from GDM. An alteration of the redox homeostasis leads to oxidative damages, increase of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , as well as cellular dysfunctions (Coughlan, Vervaart et al. 2004; Dandona, Aljada et al. 2004; Biri, Onan et al. 2006; Lappas, Hiden et al. 2011). Hence, increased oxidative stress markers and pro-inflammatory cytokines have been reported in placentas from GDM compared to normal pregnancies, such as increased 8-isoprostane release as well as protein carbonyl, TNF- α and IL-1 β levels (Coughlan, Vervaart et al. 2004; Marseille-Tremblay, Ethier-Chiasson et al. 2008). However, our study is the first to show that abnormally high ROS levels in GDM placentas arise from reduced endogenous antioxidant defenses.

Melatonin is a powerful antioxidant and co-administration of melatonin with insulin in pregnant diabetic rats reverses the adverse effects of diabetes on the fetus, such as embryo lethality, teratogenicity and fetal growth changes (Salem, Nosseir et al. 2010). Melatonin treatment also reduces plasmatic oxidative stress parameters in pregnant diabetic rats (Guney, Erdemoglu et al. 2011). In addition, in rats with markedly reduced circulating melatonin levels before gestation, through pinealectomy, a significant increase in oxidative stress damages in the

uterus during and after the gestation is observed (Sainz, Reiter et al. 2000). Melatonin administration to rats with diet-induced obesity reduced body weight as well as diminished glucose, leptin, triglyceride levels, and oxidative stress (Prunet-Marcassus, Desbazeille et al. 2003). In the same study, reduced circulating melatonin levels through pinealectomy in rats with diet-induced obesity, increases body weight; glucose level as well as oxidative stress and melatonin administration reverse these parameters (Prunet-Marcassus, Desbazeille et al. 2003). Therefore, the increase oxidative stress that we demonstrate in GDM pregnancy placentas could be relate to an altered melatonin signaling in this pregnancy complication.

As we demonstrated in placental tissue of GDM, placentas from preeclampsia are characterized by increased of ROS and XO as well as reduce antioxidant enzymes expression and activity (Many, Hubel et al. 1996; Wang and Walsh 1996; Many, Hubel et al. 2000; Wang and Walsh 2001; Vanderlelie, Venardos et al. 2005). In addition, we have recently demonstrated, in placental tissues from preeclampsia, a significant reduction of melatonin production consequently to reduce AANAT expression and activity as well as a reduced expression of MT1 and MT2 melatonin receptors. Therefore, we sought to investigate the melatonin system in placentas of GDM. Moreover, data show a significant reduction of AANAT and HIOMT melatonin-synthesizing enzymes protein expression in placentas from GDM pregnancy compared to normal pregnancies, pointing toward decreased placental melatonin production in this pregnancy complication. Accordingly, we have previously demonstrated that the placental protein expression of AANAT was positively correlated to melatonin production (Lanoix, Beghdadi et al. 2008; Lanoix, Guérin et al. 2012). Furthermore, studies by us and others indicate that the placental melatonin production would be responsible for the increase melatonin level in maternal blood during normal pregnancy as well as of its reduction in preeclampsia (Kivela 1991; Nakazawa, Kanakura et al. 1999; Nakamura, Tamura et al. 2001; Lanoix, Beghdadi et al. 2008; Lanoix, Guérin et al. 2012). Consequently, the reduced AANAT expression in GDM reported in this study suggests a decreased maternal plasma level of

melatonin. Additional studies on the activity of melatonin-synthesizing enzymes and melatonin production in placentas from GDM compare to normal pregnancies are required to complete the characterization of melatonin synthesis. It would also be noteworthy to assess melatonin levels in maternal blood from pregnancies complicated by GDM.

The results present in this study show no difference in mRNA expression of melatonin-synthesizing enzymes between placentas from GDM and normal pregnancy. In accordance with our results, in human, melatonin production is correlated to the protein expression of phosphorylated AANAT (Ganguly, Weller et al. 2005). Several studies show that melatonin, by its antioxidant proprieties, decrease several parameters implicated in hyperglycemia of GDM, including glucose and lipid (Agil, Navarro-Alarcon et al. 2011; Figueroa-Quevedo and Agil 2011; Tan, Manchester et al. 2011; Nduhirabandi, du Toit et al. 2012), suggesting that a potential decrease placental melatonin production in GDM might play a role in its pathogenesis. Furthermore, in type 2 diabetic patients and in diabetic rats, reduced blood levels of melatonin are observed, which are associated to abnormal glycemia and to related complications, including increased oxidative stress (Claustrat, Brun et al. 2005; Peschke, Frese et al. 2006).

The present study demonstrates reduced placental expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in GDM compare to normal pregnancies. The decreased expression of melatonin receptors might due to a down-regulation induced by a decreased placental production of melatonin (Yerer, M.D.P. et al. 2010). We have recently demonstrated a lower placental expression of MT1 and MT2 in preeclamptic placental tissue as well as a significant reduction of melatonin production (Lanoix, Guérin et al. 2012). In addition, in several cells or tissues, melatonin by its MT1 and MT2 receptors, protects against oxidative stress, a key event in the pathogenesis of GDM and type II diabetes (Rodriguez, Mayo et al. 2004; Tomas-Zapico and Coto-Montes 2005). Thus, the reduced placental expression of MT1 and MT2 receptors demonstrated in this study suggest a loss of the protective effect of melatonin against oxidative stress. Accordingly, a loss-of-function mutation of MT2 receptor is associates with an increased

risk to develop GDM and type II diabetes (Sparso, Bonnefond et al. 2009; Vlassi, Gazouli et al. 2012). However, further studies are required to determine if the reduce expression of melatonin receptors in GDM placentas is a cause or consequence of this pregnancy complication. In addition, insulin is a known modulator of melatonin (Peschke and Muhlbauer 2010). In our study, all patients were supplement with insulin to achieve normal levels, therefore our result are not due to altered insulin levels in GDM placentas.

In conclusion, the results present in this study, showing reduced placental protein expression of melatonin-synthesizing enzymes as well as reduced expression of its MT1 and MT2 receptors in GDM, suggest the loss of the protective effect of melatonin against placental oxidative stress. Taken together, our results and the current literature indicate a potential therapeutic avenue for melatonin against oxidative stress and inflammatory factors implicated in the pathogenesis of GDM, especially in overweight women. Accordingly, melatonin administration has been suggested as a potential treatment in high-risk pregnancies of GDM (Agil, Navarro-Alarcon et al. 2011; Figueroa-Quevedo and Agil 2011; Agil, Rosado et al. 2012). In addition to GDM, melatonin could be used to manage pregnancy complications characterized by an increased placental oxidative stress and inflammation, such as intrauterine growth restriction and preeclampsia (Gitto, Pellegrino et al. 2009; Reiter, Paredes et al. 2009; Reiter, Tan et al. 2009). However, further studies are required to show the safety of melatonin in pregnancy and to better understand the signaling pathways implicated in its antioxidant and anti-inflammatory properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully thank Dave Lanoix for advice and critical reading of the manuscript. This study was financially supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC # 262011-2009) awarded to C Vaillancourt and from the Canadian Institute of Health Research (CIHR # NET 54002-2002) awarded to J Lafond. AA Lacasse

received studentships from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQ-NT) and the NSERC.

REFERENCES

- Agil, A., M. Navarro-Alarcon, et al. (2011). "Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats." J Pineal Res **50**(2): 207-12.
- Agil, A., I. Rosado, et al. (2012). "Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats." J Pineal Res **52**(2): 203-10.
- Allen, V. M., B. A. Armson, et al. (2007). "Teratogenicity associated with pre-existing and gestational diabetes." J Obstet Gynaecol Can **29**(11): 927-44.
- American Diabetes Association (2012). "Standards of medical care in diabetes–2012." Diabetes Care **35 Suppl 1**: S11-63.
- Biri, A., A. Onan, et al. (2006). "Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes." Placenta **27**(2-3): 327-32.
- Bottalico, J. N. (2007). "Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications." Semin Perinatol **31**(3): 176-84.
- Bromme, H. J., W. Morke, et al. (2000). "Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan." J Pineal Res **29**(4): 201-8.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **25**(3): 287-99.
- Canadian Diabetes Association (2013). Gestational diabetes.
- Claustrat, B., J. Brun, et al. (2005). "The basic physiology and pathophysiology of melatonin." Sleep Med Rev **9**(1): 11-24.
- Coughlan, M. T., P. P. Vervaaert, et al. (2004). "Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus." Placenta **25**(1): 78-84.
- Dandona, P., A. Aljada, et al. (2004). "Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes." Trends Immunol **25**(1): 4-7.

- Eriksson, U. J., J. Cederberg, et al. (2003). "Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies." Rev Endocr Metab Disord **4**(1): 79-93.
- Ferrara, A. (2007). "Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective." Diabetes Care **30 Suppl 2**: S141-6.
- Figuerola-Quevedo, A. and A. Agil (2011). "Changes in plasma's oxidative stress and antioxidant activity, measured with melatonin levels, and its relationship to newborns from obese and diabetic pregnancies." J Diabetes Metab **S4**:002-012.
- Fukutomi, J., A. Fukuda, et al. (2006). "Scavenging activity of indole compounds against cisplatin-induced reactive oxygen species." Life Sci **80**(3): 254-7.
- Ganguly, S., J. L. Weller, et al. (2005). "Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1222-7.
- Gauster, M., G. Desoye, et al. (2012). "The placenta and gestational diabetes mellitus." Curr Diab Rep **12**(1): 16-23.
- Gitto, E., S. Pellegrino, et al. (2009). "Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin." J Pineal Res **46**(2): 128-39.
- Guney, M., E. Erdemoglu, et al. (2011). "Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats." Biol Trace Elem Res **143**(2): 1091-102.
- Hardeland, R., D. X. Tan, et al. (2009). "Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines." J Pineal Res **47**(2): 109-26.
- Hung, T. H., L. M. Lo, et al. (2006). "A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation." Reprod Sci **17**(4): 401-9.

- Jezek, P., A. Dlaskova, et al. (2012). "Redox homeostasis in pancreatic beta cells." Oxid Med Cell Longev **2012**: 932838.
- Kang, J. W., E. J. Koh, et al. (2011). "Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway." J Pineal Res **50**(4): 403-11.
- Kivela, A. (1991). "Serum melatonin during human pregnancy." Acta Endocrinol (Copenh) **124**(3): 233-7.
- Lanoix, D., H. Beghdadi, et al. (2008). "Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors." J Pineal Res **45**(1): 50-60.
- Lanoix, D., P. Guérin, et al. (2012). "Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy." *Journal of Pineal Research* **53**(4):417-425..
- Lanoix, D., A. A. Lacasse, et al. (2012). "Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model." Mol Cell Endocrinol **348**(1): 1-11.
- Lanoix, D., A. A. Lacasse, et al. (2012). "Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta." Mol Biotechnol **52**(3): 234-43.
- Lanoix, D., J. St-Pierre, et al. (2012). "Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark." Placenta **33**(3): 151-6.
- Lappas, M., U. Hiden, et al. (2011). "The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus." Antioxid Redox Signal **15**(12): 3061-100.
- Lappas, M., A. Mitton, et al. (2010). "In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes." J Endocrinol **204**(1): 75-84.
- Lauenborg, J., T. Hansen, et al. (2004). "Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population." Diabetes Care **27**(5): 1194-9.

- Little, R. E. and B. C. Gladen (1999). "Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature." Reprod Toxicol **13**(5): 347-52.
- Many, A., C. A. Hubel, et al. (2000). "Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia." Am J Pathol **156**(1): 321-31.
- Many, A., C. A. Hubel, et al. (1996). "Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited." Am J Obstet Gynecol **174**(1 Pt 1): 288-91.
- Marseille-Tremblay, C., M. Ethier-Chiasson, et al. (2008). "Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta." Mol Reprod Dev **75**(6): 1054-62.
- Matuszak, Z., K. Reszka, et al. (1997). "Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations." Free Radic Biol Med **23**(3): 367-72.
- Milczarek, R., A. Hallmann, et al. (2010). "Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria." J Pineal Res **49**(2): 149-55.
- Milczarek, R., J. Klimek, et al. (2000). "Melatonin inhibits NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria." Horm Metab Res **32**(2): 84-5.
- Mitanchez, D. (2010). "[Fetal and neonatal complications of gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal outcomes]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **39**(8 Suppl 2): S189-99.
- Nakamura, Y., H. Tamura, et al. (2001). "Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy." J Pineal Res **30**(1): 29-33.
- Nakazawa, K., Y. Kanakura, et al. (1999). "Study on melatonin in human and rat placental tissue." Placenta **20, Supplement 1**(0): 467-474.
- Nduhirabandi, F., E. F. du Toit, et al. (2012). "Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities?" Acta Physiol (Oxf). **205**(2):209-

- Okatani, Y., A. Wakatsuki, et al. (2001). "Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion." J Pineal Res **31**(2): 173-8.
- Peschke, E., T. Frese, et al. (2006). "Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status." J Pineal Res **40**(2): 135-43.
- Peschke, E. and E. Muhlbauer (2010). "New evidence for a role of melatonin in glucose regulation." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **24**(5): 829-41.
- Prunet-Marcassus, B., M. Desbazeille, et al. (2003). "Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity." Endocrinology **144**(12): 5347-52.
- Reiter, R. J., S. D. Paredes, et al. (2009). "Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin." Crit Rev Biochem Mol Biol **44**(4): 175-200.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2009). "Melatonin and reproduction revisited." Biol Reprod **81**(3): 445-56.
- Rodriguez, C., J. C. Mayo, et al. (2004). "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin." J Pineal Res **36**(1): 1-9.
- Sainz, R. M., R. J. Reiter, et al. (2000). "Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy." J Reprod Fertil **119**(1): 143-9.
- Salem, A. H., N. S. Nosseir, et al. (2010). "Growth assessment of diabetic rat fetuses under the influence of insulin and melatonin: a morphologic study." Anthropol Anz **68**(2): 129-38.
- Sallinen, P., S. Manttari, et al. (2007). "The effect of myocardial infarction on the synthesis, concentration and receptor expression of endogenous melatonin." J Pineal Res **42**(3): 254-60.
- Siega-Riz, A. M. and B. Laraia (2006). "The implications of maternal overweight and obesity on the course of pregnancy and birth outcomes." Matern Child Health J **10**(5 Suppl): S153-6.

- Simpson, J. L., S. Elias, et al. (1983). "Diabetes in pregnancy, Northwestern University series (1977-1981). I. Prospective study of anomalies in offspring of mothers with diabetes mellitus." Am J Obstet Gynecol **146**(3): 263-70.
- Sofic, E., Z. Rimpapa, et al. (2005). "Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin." J Neural Transm **112**(3): 349-58.
- Sparso, T., A. Bonnefond, et al. (2009). "G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans." Diabetes **58**(6): 1450-6.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2011). "Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity." Obes Rev **12**(3): 167-88.
- Tomas-Zapico, C. and A. Coto-Montes (2005). "A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes." J Pineal Res **39**(2): 99-104.
- Unger, R. H., G. O. Clark, et al. (2010). "Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome." Biochim Biophys Acta **1801**(3): 209-14.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
- Valsamakis, G., C. Kanaka-Gantenbein, et al. (2006). "Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome." Ann N Y Acad Sci **1092**: 138-47.
- Vanderlelie, J., K. Venardos, et al. (2005). "Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae." Placenta **26**(1): 53-8.
- Vlassi, M., M. Gazouli, et al. (2012). "The rs10830963 variant of melatonin receptor MTNR1B is associated with increased risk for gestational diabetes mellitus in a Greek population." Hormones (Athens) **11**(1): 70-6.

- Wang, Y. and S. W. Walsh (1996). "Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas." J Soc Gynecol Investig **3**(4): 179-84.
- Wang, Y. and S. W. Walsh (2001). "Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia." Placenta **22**(2-3): 206-12.
- Watanabe, K., F. Hamada, et al. (2012). "Prophylactic administration of melatonin to the mother throughout pregnancy can protect against oxidative cerebral damage in neonatal rats." J Matern Fetal Neonatal Med **25**(8): 1254-9.
- Wisdom, S. J., R. Wilson, et al. (1991). "Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension." Am J Obstet Gynecol **165**(6 Pt 1): 1701-4.
- Wurtman, R. J. and J. Axelrod (1968). "The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin." Adv Pharmacol **6**(Pt A): 141-51.
- Yerer, M. K., A. D. M.D.P., et al. (2010). "Regulation of MT1 and MT2 Receptors in Pineal Gland with Light/Dark Cycle: A Novel Approach." Turk J Biochem **35**(3): 256-261.

LEGENDS

Figure 1. Expression of AANAT and HIOMT melatonin-synthesizing enzymes in placentas from gestational diabetes mellitus (GDM) compared to normal (N) pregnancies. Aralkylamine-*N*-acetyltransferase (AANAT) and hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT)(A) mRNA and (B) proteins were respectively determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction and semi-quantitative western blot. The geometric average of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) was used to normalize gene expression and amido black stain was used to normalize protein expression. Representative images of 8 N pregnancies and 8 GDM placentas. Mean $\pm$ S.D; n=8 of different placentas from N and GDM pregnancies. *** $P < 0.001$.

Figure 2. Expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in placentas from gestational diabetes mellitus (GDM) compared to normal (N) pregnancies. MT1 and MT2 (A) mRNA and (B) proteins were respectively determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction and semi-quantitative western blot. The geometric average of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) was used to normalize gene expression and amido black stain was used to normalize protein expression. Representative images of 8 N pregnancies and 8 GDM placentas. Mean $\pm$ S.D; n=8 of different placentas from N and GDM pregnancies. * $P < 0.05$.

Figure 3. Increased reactive oxidative species (ROS) in placentas from gestational diabetes mellitus (GDM) compared to normal (N) pregnancies. XO (A) mRNA and (B) proteins expression were respectively determined by reverse-transcription quantitative

polymerase chain reaction and semi-quantitative western blot, The geometric average of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) was used to normalize gene expression and amido black stain to normalize protein expression. (C) XO activity in placental tissues homogenate was determined by colorimetric assay as described in Material and Methods. (D) Relative ROS levels in placental tissues were determined by DCFDA fluorometric assay as described in Material and Methods. RFU: relative fluorescence units. Representative images of 8 N pregnancies and 8 GDM placentas. Mean $\pm$ S.D; n= 8 of different placentas from N and GDM pregnancies. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 4. Decreased superoxide dismutase (SOD) expression and activity levels in placentas from gestational diabetes mellitus (GDM) compared to normal (N) pregnancies. SOD1 and SOD2 (A) mRNA and (B) proteins were respectively determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction and semi-quantitative western blot. The geometric average of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) was used to normalize gene expression and amido black stain was used to normalize protein expression. (C) Total SOD (SOD1 and SOD2) activity was determined by colorimetric assay as described in Material and Methods. Representative images of 8 N pregnancies and 8 GDM placentas. Mean $\pm$ S.D; n=8 of different placentas from N and GDM pregnancies. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 5. Decreased glutathione peroxidase (GPx) expression and activity levels in placentas from gestational diabetes mellitus (GDM) compared to normal (N) pregnancies. GPx (A) mRNA and (B) proteins expression were respectively determined by reverse-

transcription quantitative polymerase chain reaction and semi-quantitative western blot. The geometric average of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) was used to normalize gene expression and amido black stain was used to normalize protein expression. (C) GPx activity was determined by colorimetric assay. Representative images of 8 N pregnancies and 8 GDM placentas. Mean $\pm$ S.D; n=8 of different placentas from N and GDM pregnancies. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

TABLES AND FIGURE

Table 1. Clinical characteristics of patients and placentas

Variable	N (n=8)	GDM (n=8)
Maternal age (years)	29.8 ± 4.1	32.8 ± 4.8
Maternal BMI (kg/m ²)	22.6 ± 2.8	27.3 ± 3.4 (<i>P</i> = 0.0159)
Gestational age (weeks)	39.8 ± 1.9	39.3 ± 0.9
Mode of delivery (V:C)	8:0	6:2
Newborn sex (F:M)	5:3	4:4
Newborn weight (g)	3691.9 ± 210.6	3503.4 ± 314.5
Placenta weight (g)	593.8 ± 123.0	643.8 ± 209.1
Placenta index	0.160 ± 0.029	0.184 ± 0.059

BMI: body mass index; C: caesarean section; F: female; GDM: gestational diabetes mellitus; M: male; N: normal; V: vaginal

Table 2. Genes and primer sequences used for RT-qPCR.

Gene	Accession number	Primer sequence (5' → 3')		
		Sense	Antisense	Reference
AANAT	NM_001088	GCTGTCAGCGCCTT T	ACGCCCCAAGACGG A	(Lanoix, Guérin et al. 2012)
GAPDH	NM_002046	GAAGGTGAAGGTC GGAGTCAA	GGAAGATGGTGATG GGATTTC	(Lanoix, Lacasse et al. 2012)
GPx	NM_002083	CAACCAGTTTGGGC ATCAGG	AGCATGAAGTTGGG CTCGAAC	In-house design
PPIA	NM_021130	GTTTGCAGACAAG GTCCCA	ACCCGTATGCTTTA GGATG	(Lanoix, Lacasse et al. 2012)
HIOMT	NM_004043	GGCGAGCGGCTAC AGTT	ACAGGTCAAAGGC GGTCA	(Lanoix, Guérin et al. 2012)
MT1	NM_005958	CCTGTCGGTGTAT CGGAACA	TGACTTGGCAGTG CAGATAGC	(Lanoix, Guérin et al. 2012)
MT2	NM_005959	TACGACCCACGCA TCTATTCC	AGGTAGCAGAAGG ACACGACA	(Lanoix, Guérin et al. 2012)
SOD1	NM_000454	TGCTGGTTTTCGTC GTAGTCT	CATGCAGGCCTTCA GTCAGTC	In-house design
SOD2	NM_000636	AGCGGTAGCACCA GCACTAGC	TAGTCGTAGGGCAG GTCGG	In-house design
XO	NM_000379	TGTTTCATTTCCGC TGATG	ATGCCCCAACACAA GTAACCTT	In-house design
YWHAZ	NM_003406	GGCAACCTAAGAA CAAATG	CATGTTAGGCAAG TATCAAA	(Lanoix, Lacasse et al. 2012)

AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GPx: glutathione peroxidase; HIOMT: hydroxyindole O-methyltransferase; PPIA: peptidylprolyl isomerase A; SOD: superoxide dismutase; XO: xanthine oxidase, YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

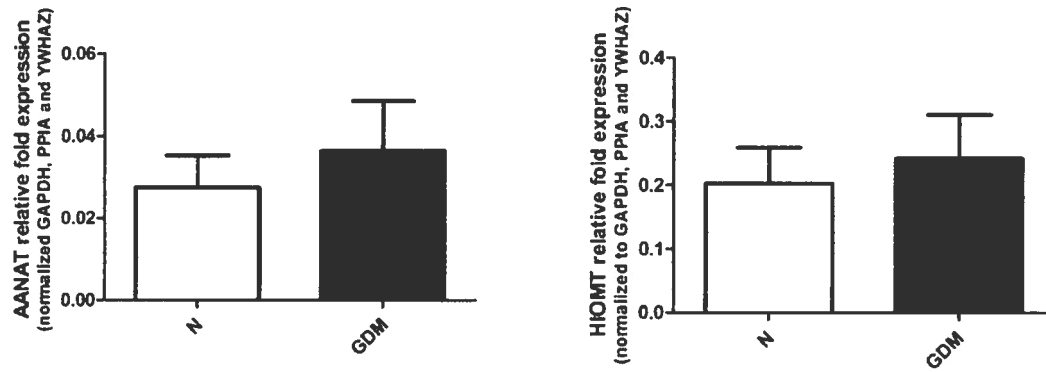
Table 3. Antibodies used for western blot analysis.

Antibody	Dilution	Incubation	Source
Primary antibody			
anti-AANAT	1:10 000	O/N at RT	Millipore (AB5467)
anti-GPx	1:500	O/N at 4°C	Abcam (ab22604)
anti-HIOMT	1:40 000	O/N at 4°C	Abnova (H00000438-A01)
anti-MT1	1:1000	O/N at 4°C	Abnova (H00004543-A01)
anti-MT2	1:1000	O/N at 4°C	Novus Biologicals (NBP1-00922)
anti-SOD1	1:2000	O/N at 4°C	Abcam (ab16831)
anti-SOD2	1:2000	O/N at 4°C	Abcam (ab13534)
anti-XO	1:2000	O/N at 4°C	Abcam (ab6194)
Secondary antibody			
anti-goat-HRP	1:10 000	1 h at RT	Millipore (AP180P)
anti-mouse-HRP	1:10 000	1 h at RT	Millipore (AP192P)
anti-rabbit-HRP	1:10 000	1 h at RT	Millipore (AP182P)

AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase; GPx: glutathione peroxidase; HIOMT: hydroxyindole O-methyltransferase; HRP: *horseradish peroxidase*; O/N: overnight; RT: room temperature
SOD: superoxide dismutase; XO: xanthine oxidase.

Figure 1.

A



B

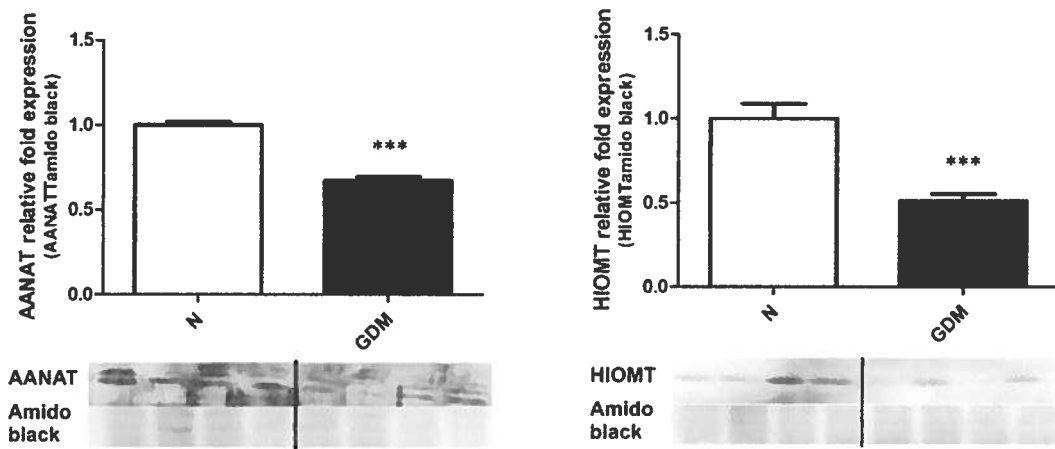


Figure 2.

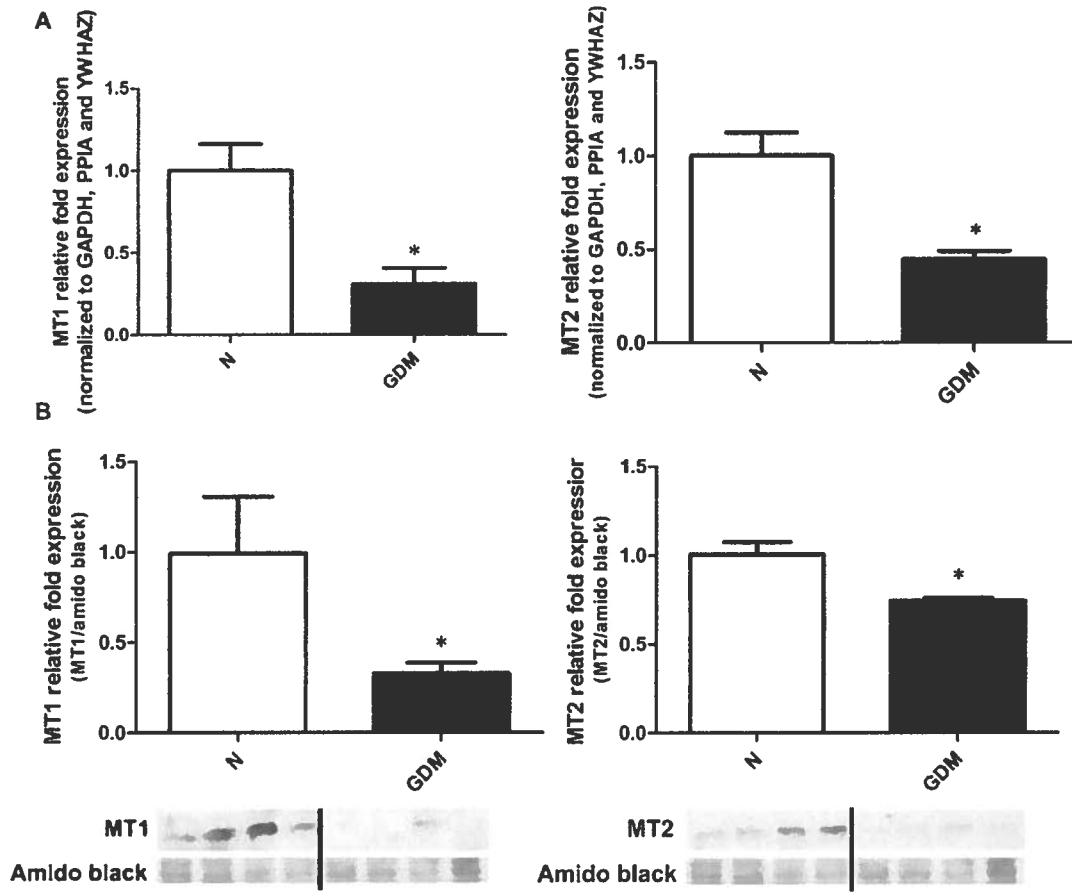


Figure 3.

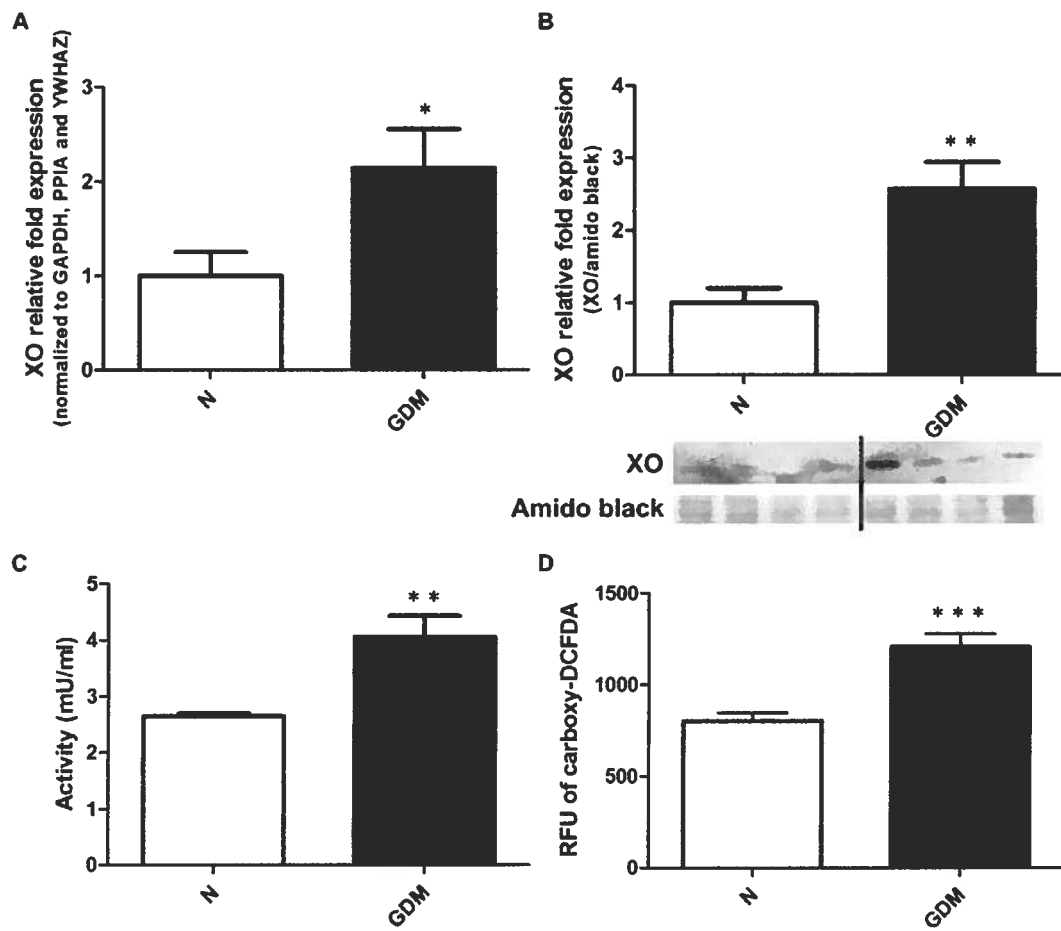


Figure 4.

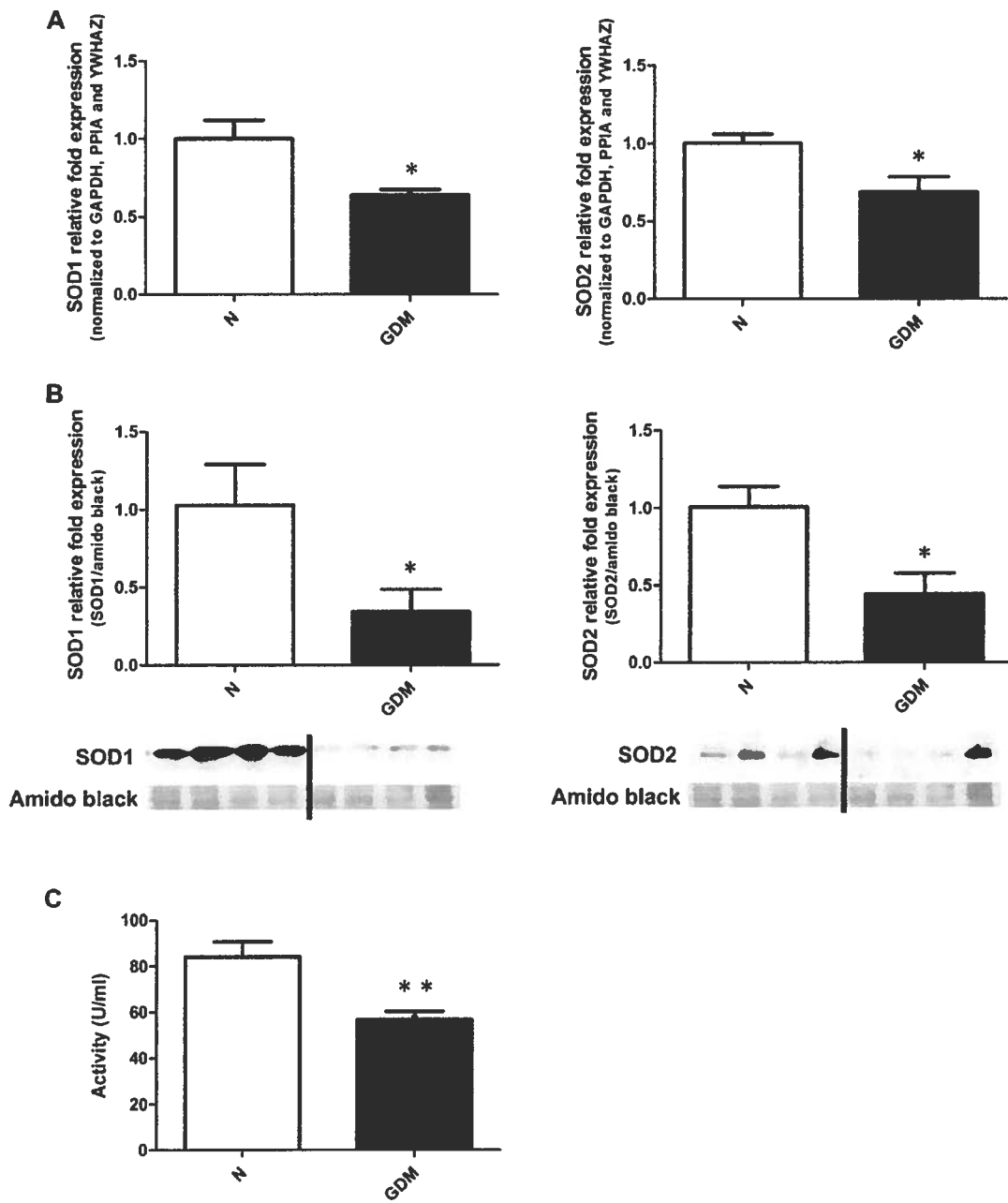
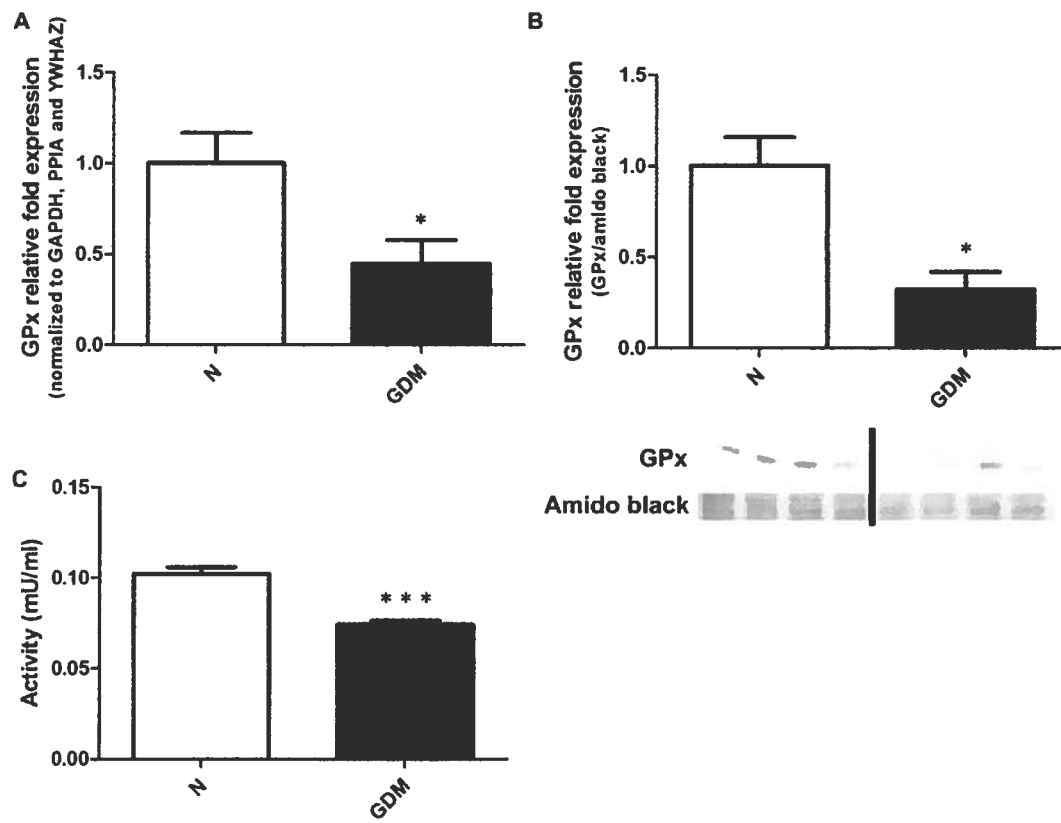


Figure 5.



**CHAPITRE 2 : MELATONIN: THE WATCHDOG OF VILLOUS TROPHOBLAST
HOMEOSTASIS AGAINST HYPOXIA/REOXYGENATION-INDUCED OXIDATIVE STRESS
AND APOPTOSIS**

Dave Lanoix, Andrée-Anne Lacasse, Russel J. Reiter et Cathy Vaillancourt

Mol Cell Endocrinol. Accepté pour publication, 15 juillet 2013.

Résumé du manuscrit en français

Le placenta humain produit de la mélatonine et exprime ses récepteurs. Nous proposons que la mélatonine, un antioxydant, protège le placenta des dommages cellulaires induits par l'hypoxie/réoxygénation (H/R). Des primocultures de cytotrophoblastes villeux à terme ont été mis 72 h en culture sous normoxie (8% O₂) pour permettre leur différenciation en présence ou en absence de 1 mM de mélatonine. Les trophoblastes ont ensuite été cultivés pour une période additionnelle de 22 h sous normoxie ou soumise à une hypoxie (0,5% O₂) pour 4 h suivi d'une réoxygénation (8% O₂) pendant 18 h en présence ou absence de 1 mM de mélatonine. L'H/R induit un stress oxydatif, qui induit l'activation de la voie de Bax/Bcl-2 ainsi que la fragmentation de l'ADN subséquente. Le traitement du trophoblaste villeux avec 1 mM de mélatonine renverse significativement tous les effets négatifs induits par l'H/R au niveau de la normoxie. Cette étude montre que la mélatonine protège le trophoblaste villeux contre le stress oxydatif et l'apoptose induits par l'H/R. Ces résultats révèlent la potentielle utilisation préventive et thérapeutique de la mélatonine dans les complications de la grossesse caractérisée par une altération de la survie du syncytiotrophoblaste, telle que la prééclampsie et le DGM.

Contribution de l'étudiant

Les deux premiers auteurs ont contribué à l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit. D Lanoix a réalisé la partie apoptose et AA Lacasse la partie stress oxydatif. Plus particulièrement, l'étudiante a entièrement réalisé les expériences et l'analyse des résultats des niveaux de ROS, de l'expression et de l'activité de la XO ainsi que de l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes SOD1, SOD2 et GPx. L'étudiante a également participé à la rédaction de l'article, au choix du journal de publication et aux corrections de l'article en collaboration avec les co-auteurs.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 12, 2013

This is a License Agreement between Andrée-Anne Lacasse ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK 1982084
Registered Company Number	
Customer name	Andrée-Anne Lacasse
Customer address	5349 3e Avenue Montréal, QC H1Y 2W4
License number	500777699
License date	Aug 12, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Molecular and Cellular Endocrinology
Licensed content title	Melatonin: the watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis
Licensed content author	Dave Lanoix, Andrée-Anne Lacasse, Russel J. Reiter, Cathy Vaillancourt
Licensed content date	December 2013
Licensed content volume number	381
Licensed content issue number	1-2
Number of pages	11
Start Page	35
End Page	45
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Maintien de l'homéostasie oxydative du trophoblaste par la mélatonine dans les grossesses compliquée par un diabète gestationnel mellitus



Melatonin: The watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis

Dave Lanoix^{a,1}, Andrée-Anne Lacasse^{a,1}, Russel J. Reiter^b, Cathy Vaillancourt^{a,*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

^b Department of Cellular & Structural Biology, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2012

Received in revised form 10 June 2013

Accepted 15 July 2013

Available online 23 July 2013

Keywords:

Villous trophoblast

Reactive oxygen species

Antioxidant

Mitochondrial apoptosis

ABSTRACT

Human placenta produces melatonin and expresses its receptors. We propose that melatonin, an antioxidant, protects the human placenta against hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced damage. Primary term villous cytotrophoblasts were cultured under normoxia (8% O₂) with or without 1 mM melatonin for 72 h to induce differentiation into the syncytiotrophoblast. The cells were then cultured for an additional 22 h under normoxia or subjected to hypoxia (0.5% O₂) for 4 h followed by 18 h reoxygenation (8% O₂) with or without melatonin. H/R induced oxidative stress, which activated the Bax/Bcl-2 mitochondrial apoptosis pathway and the downstream fragmentation of DNA. Villous trophoblast treatment with melatonin reversed all the negative effects induced by H/R to normoxic levels. This study shows that melatonin protects the villous trophoblast against H/R-induced oxidative stress and apoptosis and suggests a potential preventive and therapeutic use of this indolamine in pregnancy complications characterized by syncytiotrophoblast survival alteration.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The maintenance of villous trophoblast homeostasis is essential to fetal and pregnancy well-being. The villous trophoblast is formed by proliferative stem cytotrophoblasts that exit the cell cycle and terminally differentiated into syncytiotrophoblast. The syncytiotrophoblast (multinucleated) is formed by fusion of the underlying mononuclear villous cytotrophoblast which retain the ability to proliferate and fuse with the overlying syncytium allowing continuous regeneration of the syncytiotrophoblast throughout the pregnancy (Black et al., 2004; Vaillancourt et al., 2009). Therefore, the syncytiotrophoblast must undergo apoptosis to be replaced and maintain its homeostasis (Gauster et al., 2009; Huppertz et al., 1999; Lanoix et al., 2012b). Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast disrupts its homeostasis and stimulates

the release of syncytial factors in maternal circulation, including tumor necrosis factor α (TNF- α), soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and syncytiotrophoblast microparticles (STBM), which are involved in the pathogenesis of pregnancy complications, such as preeclampsia and intra-uterine growth restriction (Heazell et al., 2011; Ishihara et al., 2002; Rampersad and Nelson, 2007; Scifres and Nelson, 2009; Tomas et al., 2011).

Placental oxidative stress is a potent inducer of syncytiotrophoblast apoptosis through the mitochondrial pathway (Cindrova-Davies et al., 2007a, Heazell et al., 2008; Tuuli et al., 2011). Oxidative stress occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) overwhelms the intrinsic antioxidant defense system leading to molecular damage (Burton and Jauniaux, 2011). Endogenous homeostatic ROS levels are tightly regulated by the major antioxidant enzymes, including superoxide dismutase 1 (SOD1 or Cu, Zn-SOD), superoxide dismutase 2 (SOD2, Mn-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), all of which are present in human placenta. At homeostatic levels, ROS act as second messengers to modulate cellular functions, such as proliferation and differentiation and low levels of ROS are necessary to the formation of the syncytiotrophoblast (Robins et al., 2007). In addition, over-expression of SOD1 in villous cytotrophoblasts decreases differentiation and syncytial fusion (Frendo et al., 2001). However, at higher ROS levels, the balance between pro-oxidant and antioxidant activities are lost and deleterious outcomes, such as increased syncytiotrophoblast apoptosis, occurs (Cindrova-Davies et al., 2007a).

Abbreviations: CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; HIF-1, hypoxia inducible factor 1; H/R, hypoxia/reoxygenation; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PPIA, peptidylprolyl isomerase A; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; real-time PCR, qPCR, quantitative polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; RT, reverse-transcription; ROCK-1, rho-associated coiled-coil protein kinase 1; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; SOD1 or Cu, Zn-SOD, superoxide dismutase 1; SOD2, Mn-SOD, superoxide dismutase 2; STBM, syncytiotrophoblast microparticles; TNF- α , tumor necrosis factor α ; XDH, xanthine dehydrogenase; XO, xanthine oxidase.

* Corresponding author. Tel.: +1 450 687 5010x8812; fax: +1 450 686 5389.

E-mail address: cathy.vaillancourt@af.inrs.ca (C. Vaillancourt).

¹ These authors contributed equally to this work.

Hypoxia/reoxygenation (H/R) is a potent stimulus for apoptosis of the syncytiotrophoblast via the mitochondrial pathway through altered equilibrium between pro-oxidant and antioxidant defenses (Cindrova-Davies et al., 2007b; Hung et al., 2002; Rampersad and Nelson, 2007; Scifres and Nelson, 2009). Consequently, H/R is a model of choice to study alterations of syncytiotrophoblast homeostasis. In H/R, pro-oxidants are increased through the irreversible conversion of xanthine dehydrogenase (XDH) to xanthine oxidase (XO). During reoxygenation, XO generates large amounts of ROS which are harmful to cells (Nishino et al., 1997). In placenta, XO is one of the main generators of ROS (Many et al., 1996). Under H/R, altered pro-oxidant-antioxidant balance activates redox-sensitive transcription factors such as nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (Haddad, 2002). NF- κ B directly targets p53, a master regulator of cell fate, which triggers apoptosis through the mitochondrial pathway. ROS-induced DNA damage also triggers p53 activation. Key components of the mitochondrial-mediated apoptosis pathway involved an increase of the Bax/Bcl-2 ratio as well as activation of the caspase 9 and caspase 3 (Zamzami and Kroemer, 2001). Cellular manifestations of apoptosis are the formation of membrane blebs and the inhibition of DNA repair mediated by the caspase 3-dependent cleavage of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), respectively (Coleman et al., 2001; Lazebnik et al., 1994). Cell death through apoptosis is also characterized by caspase 3-mediated DNA fragmentation and degradation (Lakhani et al., 2006).

Melatonin reduces H/R-induced damage in many organs including during myocardial infarction (Tan et al., 1999), stroke (Koh, 2012) and liver injury due of its powerful antioxidant properties (Kang et al., 2011; Okatani et al., 2001; Watanabe et al., 2012). Melatonin and its metabolites are excellent ROS scavengers (Galano et al., 2011). Moreover, melatonin increases the expression and activity of the antioxidant enzymes by mechanisms likely dependent on its MT1 and MT2 receptors (Richter et al., 2009; Rodriguez et al., 2004). Due to its potent antioxidant properties, melatonin decreases mitochondrial-dependent apoptosis through inhibition of oxidative stress-activated pathways (Das et al., 2008; Das et al., 2010; Li et al., 2009), thereby maintaining tissue homeostasis.

We have demonstrated high melatonin production and expression of its receptors in villous trophoblast cells from normal term placentas (Lanoix et al., 2008), suggesting an autocrine and

paracrine role. In addition, we have recently shown that melatonin promotes syncytiotrophoblast survival (Lanoix et al., 2012a). However, the effect of melatonin on H/R-induced villous trophoblast homeostasis alteration, namely on the increased oxidative stress and mitochondrial apoptosis, has never been studied. The goal of the current study was to determine the effect of melatonin on villous trophoblast subjected to normoxia and H/R on: (i) ROS generation, (ii) expression and activity of antioxidant enzymes, (iii) activation of ROS-induced cell signaling pathway, and, (iv) induction of mitochondrial apoptosis.

2. Materials and methods

2.1. Isolation, purification and treatment of term villous trophoblasts

This study was approved by the ethical committee of CHUM-St-Luc Hospital (Montreal, QC, Canada). Villous cytotrophoblasts from term placentas of uncomplicated pregnancies were isolated and purified as previously described by our group (Lanoix et al., 2008; Lanoix and Vaillancourt, 2010; Le Bellego et al., 2009), using the trypsin-DNase/Percoll method (Kliman et al., 1986). Mononuclear villous cytotrophoblasts were purified by immunomagnetic labeling using autoMACS™ (Myltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) and anti-HLA-ABC antibody as described previously (Lanoix et al., 2008).

Villous cytotrophoblasts ($n=3$ different placentas) were cultured for 26 h under three different oxygen conditions in Modular Incubator Chambers (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA). Cells were seeded at a density of 5.75×10^5 cells/cm² and cultured for 6 h in normoxia (8% O₂, 5% CO₂, and 87% N₂) to allow adherence and then subjected to: (a) normoxia, control condition, (b) normoxia with 1 mM melatonin, (c) H/R or (d) H/R with 1 mM melatonin treatment as described in Fig. 1. As they do *in vivo*, *in vitro* mononuclear villous cytotrophoblast cells fused and differentiate into a syncytium, the syncytiotrophoblast. To verify if melatonin treatment affect the rate of syncytialization of primary villous cytotrophoblast cells, hCG production in cell culture supernatant was monitored daily, from 24 to 72 h, using an hCG enzyme-linked immunosorbent (ELISA) from DRG Diagnostics as described previously (Lanoix et al., 2008; Le Bellego et al., 2009). Supplementary data 1 shows that melatonin has no effect on hCG production (biochemical villous cytotrophoblast differentiation rate) under

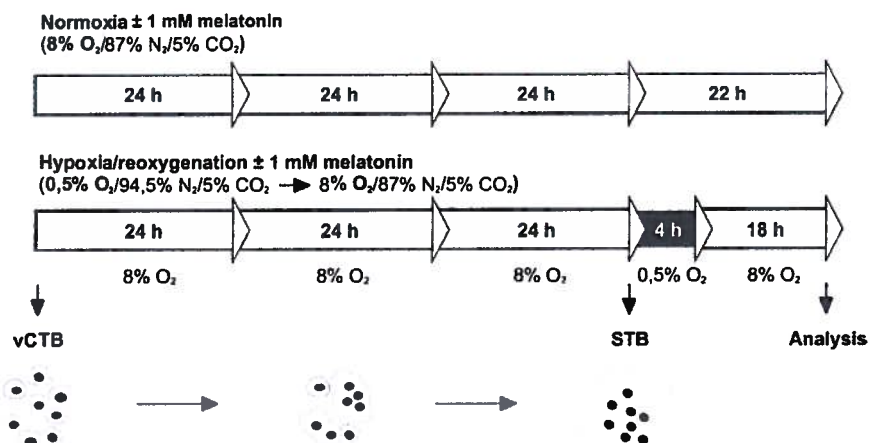


Fig. 1. Experimental design of villous trophoblast cell culture. Villous cytotrophoblasts were cultured under normoxia (8% O₂) with or without 1 mM melatonin for 72 h to induce their differentiation into the syncytiotrophoblast. The cells were then cultured for an additional 22 h under normoxia or subject to hypoxia (0.5% O₂) for 4 h followed by 18 h reoxygenation (8% O₂) with or without 1 mM melatonin. Oxidative stress and mitochondrial-dependent apoptosis parameters were subsequently analyzed. STB, syncytiotrophoblast; and vCTB, villous cytotrophoblasts.

normoxia (8% O₂) was observed between the different culture conditions and treatment. Melatonin was dissolved in DMSO at a final concentration of 0.1%. Normoxia (0.1% DMSO as vehicle) was established at 8% O₂, a concentration that is maintained in normal pregnancy from 12 weeks gestation to term (Schneider, 2011). Hypoxic oxygen concentration of 0.5% and 16 h of reoxygenation were used as established by Cindrova-Davies et al. to promote mitochondrial apoptosis (Cindrova-Davies et al., 2007a). Chambers were flushed for 4 min at 25 L/min with a mixture of O₂, CO₂ and N₂ to achieve the desired final oxygen concentration (8% or 0.5%) and a final CO₂ concentration of 5%. Dissolved O₂ at the cell-medium interface was confirmed using a microoxygen electrode (MI-730; Microelectrodes Inc., Londonderry, NH, USA). All media were pre-equilibrated with the appropriate gas mixture before addition to the culture plate and refreshed every 24 h.

2.2. mRNA expression analysis

The reverse-transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR; qPCR) analysis was performed as described previously (Lanoix et al., 2012c). Briefly, total RNA was extracted from primary villous trophoblast after 96 h of culture using Aurum Total RNA mini kit according to manufacturer's instructions (Bio-Rad, Mississauga, Canada). RNA was quantified by spectrophotometric measurement (Spectramax, Molecular Devices). The Experion™ Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad) was used to determine RNA integrity. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 2 µg RNA with the iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad) and stored at -20 °C until further analysis. Specific primer for XO, SOD1, SOD2, GPx, CAT, HPRT1 and PPIA were designed using Oligo 6 software (Molecular Biology Insights, Cascade, USA) and their specificity was determined with Primer-Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Validated primer sequences are shown in Table 1. HPRT1 and PPIA were selected as reference genes according to the method described in Lanoix et al. (2012a).

qPCR reactions were conducted using the CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Amplification was performed with SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) from 0.5 µl of cDNA as described previously (Lanoix et al., 2012a).

2.3. Proteins expression analysis

Briefly, cells were collected with ice-cold modified radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% nadeoxycholate, 150 mmol/l NaCl and 1 mmol/l EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and then sonicated as described (Lanoix et al., 2006; Lanoix et al., 2008). Samples were homogenized using a QIA-shredder spin column homogenizer (Qiagen, Toronto, Canada). The homogenate was then centrifuged at 13 000 g for 10 min at 4 °C to

Table 2
Antibodies used for Western blot analysis.

Antibody	Dilution	Incubation	Source
<i>Primary antibody</i>			
Anti-Bax	1:250	O/N at 4 °C	Cell signaling (2774)
Anti-Bcl-2	1:250	O/N at 4 °C	Cell signaling (2872)
Anti-cleaved caspase 3	1:500	O/N at 4 °C	Cell signaling (9661)
Anti-cleaved caspase 9	1:250	O/N at 4 °C	Cell signaling (9501)
Anti-GPx	1:500	O/N at 4 °C	Abcam (ab22604)
Anti-HIF-1	1:2000	O/N at 4 °C	Abcam (ab16066)
Anti-NF-κB p65	1:250	O/N at 4 °C	Millipore (ST1047)
Anti-p53	1:250	O/N at 4 °C	Biological (628202)
Anti-cleaved PARP	1:250	O/N at 4 °C	Cell signaling (5625)
Anti-ROCK-1	1:100	O/N at 4 °C	Cell signaling (4035)
Anti-SOD1	1:2000	O/N at 4 °C	Abcam (ab16831)
Anti-SOD2	1:2000	O/N at 4 °C	Abcam (ab13534)
Anti-TNF-α	1:1000	O/N at 4 °C	Abcam (ab13179)
Anti-XO	1:2000	O/N at 4 °C	Abcam (ab6194)
<i>Secondary antibody</i>			
Anti-goat-HRP	1:10,000	1 h at RT	Millipore (AP180P)
Anti-mouse-HRP	1:10,000	1 h at RT	Millipore (AP192P)
Anti-rabbit-HRP	1:10,000	1 h at RT	Millipore (AP182P)

O/N, overnight and RT, room temperature.

remove insoluble material. Protein concentration of each sample was determined by spectrophotometric quantification (Spectra-Max M5 with SoftMax Pro v5 software, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent according to manufacturer's instruction (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Proteins (50 µg per lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (4% stacking and 12% separating gels), and were subsequently transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Mississauga, ON, Canada) as described previously (Lanoix et al., 2008). Specific primary antibodies are described in Table 2. Band intensities were analyzed and quantified with AlphaEaseFC software (Alpha Innotech). After the antibody procedures, membranes were stained with amido black to normalize target protein expression as previously described (Lanoix et al., 2012d). In some cases, blots were stripped with Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution, rinsed twice with TBST and reprobed with another primary antibody.

2.4. Relative ROS levels analysis

Relative ROS levels were analyzed with the Reactive Oxygen Species Detection Reagents (Invitrogen) that detect hydrogen peroxide, peroxy radical, peroxy nitrite anion and superoxide anion, all of which are scavenged by melatonin. After 96 h of culture, primary villous trophoblasts were rinsed and incubated with 10 µM of 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA) pre-equilibrate at 8% oxygen, for 45 min in the Modular Incubator Chambers. After rinsing, relative ROS levels

Table 1
Genes and primer sequences used for RT-qPCR.

Gene	Accession number	Primer sequence	
		Sense	Antisense
GPx	NM_002083	CAACCATGTTGGGCATCAGG	AGCATGAAGTTGGGCTCGAAC
HPRT1	NM_000194	GACCACTCAACAGGGACATAA	AAGCTTGCAGCTTGACC
PPIA	NM_021130	GTTTGCAGACAAGGTCCCA	ACCCGTATGCTTTAGGATG
SOD1	NM_000454	TGCTGGTTTGCCTGCTAGTCT	CATGCAGGCTTTCAGTCAGTC
SOD2	NM_000636	AGCCGTAGCAGCAGCACTAGC	TAGTCGTAGGGCAGGTCCG
XO	NM_000379	TGTTTCATTTCCGCTGATG	ATGCCCAACACAAGTAACCTT

GPx, glutathione peroxidase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; PPIA, peptidylprolyl isomerase A; SOD, superoxide dismutase; and XO, xanthine oxidase.

were determined by fluorimetry according to manufacturer's instruction and normalized against protein content of cell culture well.

2.5. SOD, GPx and XO activity assays

Samples were prepared from primary villous trophoblast after 96 h of culture. Enzyme activity assays were performed using SOD Activity Assay Kit # K335-100, GPx Activity Assay Kit #K762-100 and XO Assay Kit #K710-100 according to manufacturer's instruction (BioVision, Mountain View, USA). Cells were homogenized in cold Assay Buffer and centrifuged to remove debris. Enzyme activity was determined spectrophotometrically in supernatants using specific standard curve.

2.6. DNA fragmentation analysis

Internucleosomal DNA fragmentation was evaluated to detect villous trophoblast apoptosis by standard agarose gel electrophoresis as previously described (Dupere-Minier et al., 2004). Briefly, primary villous trophoblasts after 96 h of culture were washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 20 μ l of 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5% M/W sarkosyl, 0.5 mg/ml proteinase K and incubated at 50 °C for 1.5 h. One μ l of 30 mg/ml RNase A was added to samples and further incubated for 1 h at 50 °C. Samples were then heat at 70 °C for 10 min, loaded on a 2% agarose gel and electrophoresed for 1 h at 100 V. DNA was

stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination using a FluorChem FC2 (Alpha Innotech).

2.7. Statistical analysis

All data are represented as mean $\pm$ S.D. from three different villous trophoblast cells isolations. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tuckey–Kramer *post hoc* comparison test using Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data were considered statistically significant at a value of $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Melatonin prevents the increased oxidative stress induced by H/R

Carboxy-H2DCFDA fluorescence showed that H/R significantly increased ROS levels compared to normoxia ($P = 0.0283$) and this effect was reversed by melatonin treatment ($P = 0.0152$) (Fig. 2A). Considering that melatonin is a powerful antioxidant (Galano et al., 2011) and that basal ROS levels are required to allow syncytiotrophoblast differentiation (Robins et al., 2007), ROS levels were determined between normoxia and normoxia combined with melatonin treatment. Supplementary data 2A shows that melatonin maintains basal ROS level required for its differentiation under normoxia. The expression and activity of XO, the main generator of ROS in the placenta, was determined by RT-qPCR and semi-quantitative western blot as well as by colorimetric assay

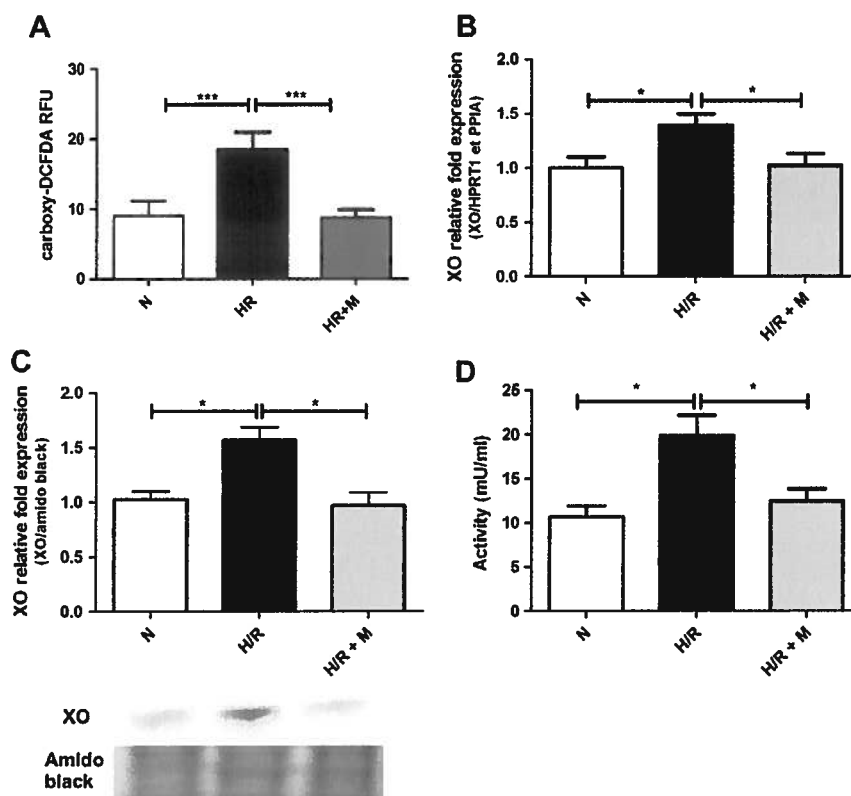


Fig. 2. Melatonin prevents hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced generation of oxidative stress. (A) Relative ROS levels in primary villous trophoblasts were determined using 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA) fluorometric assay as described in Section 2. (B) XO mRNA was amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1) was used to normalize gene expression. (C) XO protein expression was determined using semi-quantitative Western blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. (D) XO activity in cells homogenate was determined by colorimetric assay as described in Section 2. RFU, relative fluorescence units; N, normoxia (8% O₂, 5% CO₂, and 87% N₂); H/R, hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); and 1 mM melatonin. Results are expressed as mean $\pm$ SD; $n = 3$ different placentas; and * $P \leq 0.05$.

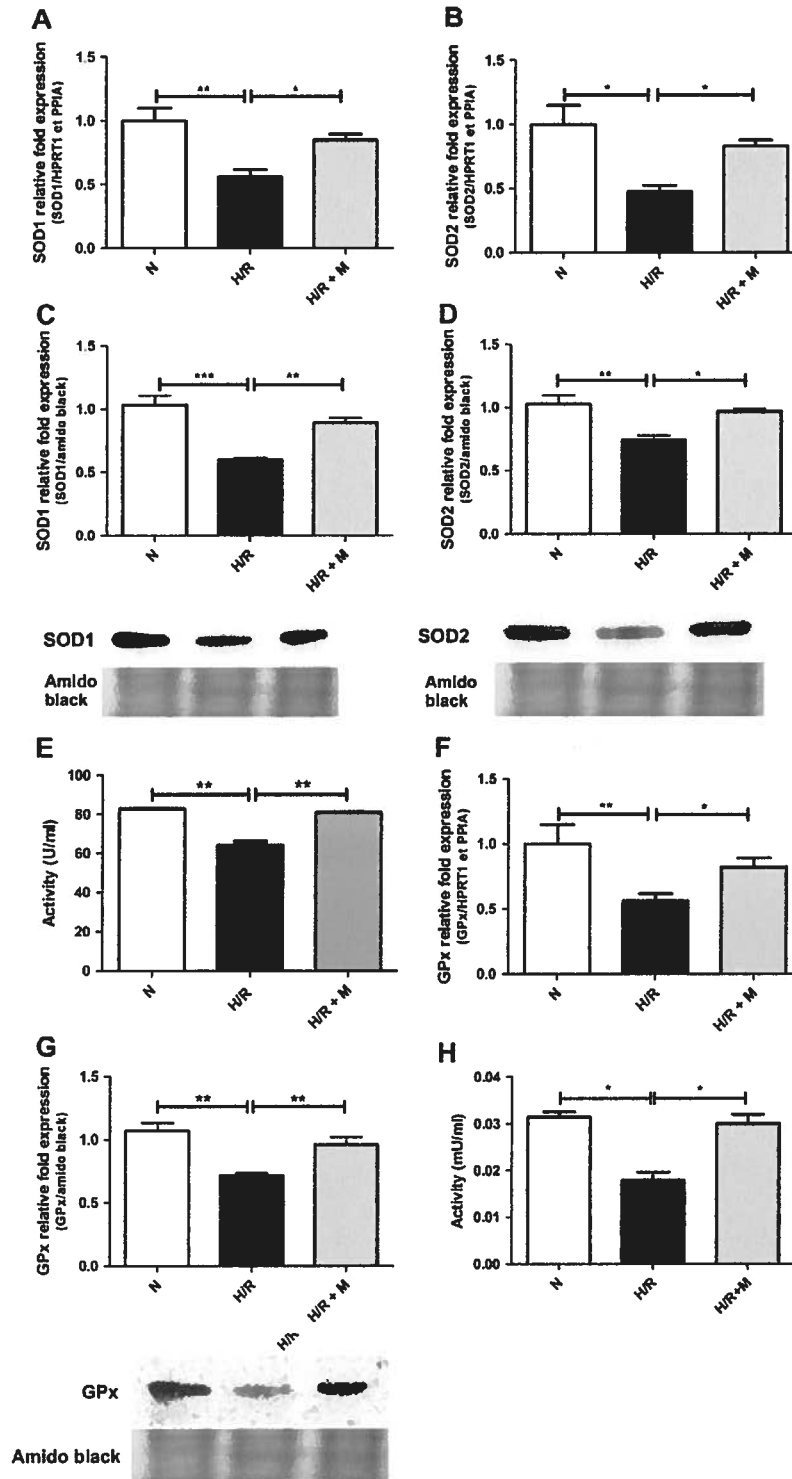


Fig. 3. Melatonin prevents hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced decreased SOD and GPx expression and activity. (A) SOD1, (B) SOD2 and (F) GPx mRNA was amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of PPIA and HPRT1 was used to normalize gene expression. Protein expression of (C) SOD1, (D) SOD2 and (G) GPx was determined using semi-quantitative Western blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. (E) Total SOD and (H) GPx activity in cells homogenate was determined by colorimetric assay as described in Section 2. SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; N, normoxia (8% O₂, 5% CO₂, and 87% N₂); H/R, hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); and 1 mM melatonin; PPIA, peptidylprolyl isomerase A, HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. Results are expressed as mean ± SD; n = 3 different placentas; * $P \leq 0.05$; and ** $P \leq 0.01$.

respectively. Fig. 2B–D shows that H/R significantly increased XO mRNA ($P = 0.0212$) and protein ($P = 0.0346$) expression as well as its activity ($P = 0.0134$) compared to normoxia. Melatonin signifi-

cantly reverses the effect of H/R on XO mRNA ($P = 0.0443$) and protein ($P = 0.0345$) expression as well as its activity ($P = 0.0235$). This indicates that melatonin significantly reverses the increased

pro-oxidant level induced by H/R. Therefore, to determine the pro-oxidant-antioxidant balance, the antioxidant defense enzymes were analyzed.

3.2. Melatonin prevents the alteration of antioxidant enzymes induced by H/R

SOD1 and SOD2 mRNA ($P = 0.0088$ and $P = 0.0451$, respectively) and protein ($P = 0.0013$ and $P = 0.0042$, respectively) expression were significantly decreased under H/R compared to normoxia (Fig. 3A–D). Fig. 3A–D demonstrates that melatonin prevents the H/R-induced decreased SOD1 and SOD2 mRNA ($P = 0.0317$ and $P = 0.0386$, respectively) and protein ($P = 0.0003$ and $P = 0.0151$, respectively) expression. In addition, H/R significantly decreased total SOD activity compared to normoxia ($P = 0.0069$) and this effect was reversed by melatonin ($P = 0.0021$) (Fig. 3E). Over-expression of SOD1 in the syncytiotrophoblast under normal condition has been shown to decrease its differentiation (Frendo et al., 2001). Therefore, the effect of melatonin on the expression of SOD1 and SOD2 in normoxia was characterized to ensure that there are no deleterious effects of melatonin. Supplementary data 2B and C show that in the villous trophoblast under normoxia, melatonin has no effect on the expression of SOD1 and SOD2 protein.

Fig. 3F–H demonstrates a significant reduction of GPx mRNA ($P = 0.0025$) and protein ($P = 0.0015$) expression as well as its activ-

ity ($P = 0.0105$) under H/R compared to normoxia. Melatonin treatment significantly reverses these effects of H/R on GPx activity ($P = 0.0483$) as well as its mRNA ($P = 0.0250$) and protein ($P = 0.0033$) expression. Fig. 3 demonstrates alterations in endogenous antioxidant defense enzymes under H/R, resulting in increased intracellular ROS levels, and the capacity of melatonin to significantly prevent these deleterious effects. Given that ROS induced mitochondrial apoptosis through activation of redox-sensitive transcription factors, including NF- κ B and p53, their expression was investigated under H/R combined or not with melatonin treatment.

3.3. Melatonin prevents the expression of the active form of redox-sensitive signaling pathways induced by H/R

H/R induces significant expression of the stable form of HIF-1 ($P = 0.0005$) in the villous trophoblast compared to normoxia which is significantly inhibited ($P = 0.0023$) by melatonin (Fig. 4A). Fig. 4B and C demonstrate an increased expression of the active form of NF- κ B p65 protein ($P = 0.0004$) and the subsequent induction of p53 ($P = 0.0063$) under H/R compared to normoxia. These effects were significantly reduced by melatonin (NF- κ B; $P = 0.0002$ and p53; $P = 0.0059$). These results demonstrate the ability of melatonin to prevent the activation of signaling pathways triggering mitochondrial apoptosis induced

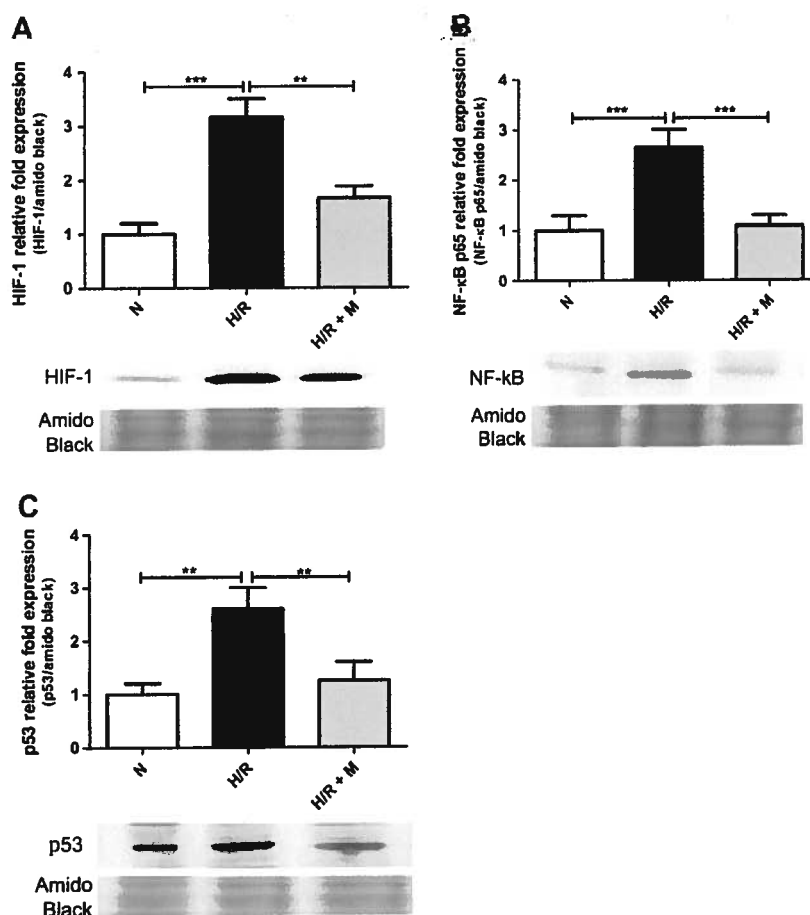


Fig. 4. Melatonin prevents the expression of the active form of HIF-1, NF- κ B p65 and p53 induced by hypoxia-reoxygenation (H/R). Protein expression of, (A) HIF-1, (B) NF- κ B p65 and (C) p53 was determined using semi-quantitative Western blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. HIF-1, hypoxia inducible factor 1; NF- κ B p65, nuclear factor-kappa B p65; N, normoxia (8% O₂, 5% CO₂, and 87% N₂); H/R, hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); and 1 mM melatonin. Results are expressed as mean $\pm$ SD; $n = 3$ different placentas; ** $P \leq 0.01$; and *** $P \leq 0.001$.

by H/R in primary term villous trophoblast. Consequently, the expression of key components of the mitochondrial apoptosis cascade and of associated syncytial factors was studied.

3.4. Melatonin prevents the stimulation of mitochondrial apoptosis and of associated syncytial factors induced by H/R

Primary term villous trophoblast under H/R displays a significantly increased Bax/Bcl-2 ratio, an indicator of mitochondrial apoptosis activation, compared to normoxia ($P = 0.0074$) while melatonin treatment prevents it ($P = 0.0086$, Fig. 5A). Fig. 5B and C demonstrate that H/R induces the cleavage of caspase-9 ($P = 0.0008$) and caspase-3 ($P = 0.0024$) compared to normoxia in the villous trophoblast while melatonin significantly reverses their activation (caspase-9, $P = 0.0087$ and caspase-3, $P = 0.0073$). In villous trophoblast, H/R mediates significant caspase 3-dependent cleavage of ROCK-1 ($P = 0.0053$) and PARP ($P = 0.0046$) compared to normoxia (Fig. 5D–E). H/R-induced cleavage of ROCK-1 ($P = 0.0064$) and PARP ($P = 0.0395$) are significantly inhibited by melatonin (Fig. 5D–E). Fig. 5F demonstrates increased DNA fragmentation under H/R compared to normoxia whereas melatonin treatment decreased DNA fragmentation to a level similar to normoxia. Taken together, Fig. 5 demonstrates that in the villous trophoblast under H/R, apoptosis by the mitochondrial pathway is significantly prevented by 1 mM melatonin. The syncytiotrophoblast under normal conditions requires basal level of apoptosis to allow its regeneration and thus maintain its homeostasis (Huppertz et al., 1999). Thus, DNA fragmentation was compared between normoxia and normoxia combined with melatonin treatment. Melatonin has no effect on the level of DNA fragmentation in normoxia, and therefore on apoptosis, required to maintain syncytiotrophoblast homeostasis (Supplementary data 2D).

To evaluate the potential of melatonin to decrease the production of factors from the syncytiotrophoblast consequent to its apoptosis, we investigated the expression of TNF- α . Supplementary data 3 demonstrated that H/R significantly increased the expression of TNF- α ($P = 0.0003$) compared to normoxia and this effect was reversed by melatonin treatment TNF- α ($P = 0.0002$). These observations are in accordance with the inhibition of H/R-induced mitochondrial apoptosis by melatonin.

4. Discussion

This study demonstrates a protective effect of melatonin against mitochondrial-mediated apoptosis of the villous trophoblast induced by H/R through maintenance of the equilibrium between pro-oxidants and antioxidants. These results suggest that melatonin plays a crucial role in placental functions and pregnancy well-being by maintaining differentiated villous cytotrophoblast homeostasis.

Normal pregnancy is itself a state of oxidative stress (Wisdom et al., 1991). In addition, oxidative stress and apoptosis of the syncytiotrophoblast are normal physiological processes in the human placenta (Huppertz et al., 1999; Jauniaux et al., 2000). However, deleterious effects, such as activation of redox-sensitive transcription factors triggering the mitochondrial-dependent apoptosis pathway, occur when the endogenous antioxidants are overwhelmed by increasing ROS levels (Cindrova-Davies et al., 2007a). Such exacerbated placental oxidative stress and apoptosis levels are associated with the pathogenesis of intra-uterine growth restriction and preeclampsia (Ishihara et al., 2002; Tomas et al., 2011). In this study, primary villous trophoblasts challenged with H/R *in vitro* showed a marked increase in oxidative stress, activation of redox-sensitive transcription factors and the downstream rise in mitochondrial apoptosis (Fig. 6). In accord with our results, it has been demon-

strated that the generation of oxidative stress under H/R arises through elevated ROS production and decreased antioxidant enzyme defenses in the syncytiotrophoblast (Cindrova-Davies et al., 2007a; Hung et al., 2001). As we observed, others have shown abnormally high ROS levels under H/R are activators of redox-sensitive transcription factors, such as NF- κ B and HIF-1 (Cindrova-Davies et al., 2007a; Jung et al., 2003), which trigger the mitochondrial apoptotic cascade in the syncytiotrophoblast and other tissues (Cindrova-Davies et al., 2007a; Hung and Burton, 2006). H/R has been selected over hypoxia alone as an inducer of syncytiotrophoblast apoptosis because it initiates villous trophoblast alterations of pro-oxidant-antioxidant balance occurring in several pregnancy complications, such as preeclampsia and intra-uterine growth restriction (Hung et al., 2001, 2002; Hung and Burton, 2006).

The present work demonstrates that melatonin significantly limits villous trophoblast oxidative stress on both sides of the equation, by inhibition of ROS generation and by restoration of antioxidant enzyme defenses (Fig. 6). As observed in this study, melatonin is a powerful antioxidant acting through inhibition of pro-oxidant levels and promotion of antioxidant defenses (Rodriguez et al., 2004). Melatonin also significantly reduces H/R-induced mitochondrial-mediated apoptosis of the primary term villous trophoblast. In agreement with these results, melatonin has been reported to inhibit the activation of redox-sensitive transcription factors, including NF- κ B and HIF-1, and the associated rise in mitochondrial apoptosis (Das et al., 2008, 2010). The current results show for the first time that melatonin reverses the activation of redox-sensitive transcription factors as well as the induction of mitochondrial-dependent apoptosis arising from abnormally high oxidative stress. Studies have proposed the utility of melatonin to combat trophoblast oxidative stress damage during pregnancy (Aversa et al., 2012); however, we provided the first data supporting this assertion. Additional studies on the effect of melatonin against oxidative stress and apoptosis in syncytiotrophoblast under H/R are required to further characterize the cytoprotective role of melatonin in the placenta, for example, on lipid peroxidation and the other pathways of mitochondrial apoptosis, such as apoptosis inducing factor (AIF), Endo G and second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with a low pI (Smac/DIABLO) (Lanoix et al., 2012a).

We have recently demonstrated reduced melatonin production and expression of its receptors in preeclamptic placentas compared to normotensive pregnancies (Lanoix et al., 2012a), suggesting a role of melatonin in the pathogenesis of preeclampsia and thus its potential clinical utility in women with decreased plasma level of melatonin. Accordingly, melatonin significantly reduces many placental alterations found in preeclampsia analyzed in this study, including H/R-induced ROS generation (Wang and Walsh, 2001), increased expression and activity of XO (Many et al., 2000), decreased expression and activity of SOD and GPx (Vanderliele et al., 2005; Wang and Walsh, 2001), induction of ROS-activated pathways (Aban et al., 2004), activation of the Bax/Bcl-2 mitochondrial apoptosis pathway leading to caspase 9 and 3 activation as well as DNA fragmentation (Leung et al., 2001). In addition, we show that melatonin prevents syncytial factor expression induced by H/R, such as TNF- α and HIF-1, which are responsible for the maternal syndrome of preeclampsia. Antioxidants, such as vitamin C and E, have been used to limit H/R-induced damage in preeclampsia. However, despite their reported *in vitro* efficiency against H/R-induced villous trophoblast damage (Cindrova-Davies et al., 2007a), *in vivo* these vitamins show no benefits in the prevention of preeclampsia (Poston et al., 2006; Rumbold et al., 2006; Tuuli et al., 2011). Proposed explanations for the failure of vitamins to prevent or ameliorate preeclampsia is an inadequate dosage or inaccessibility of the vitamins to the placenta (Reiter et al., 2009). In contrast to vitamins, melatonin

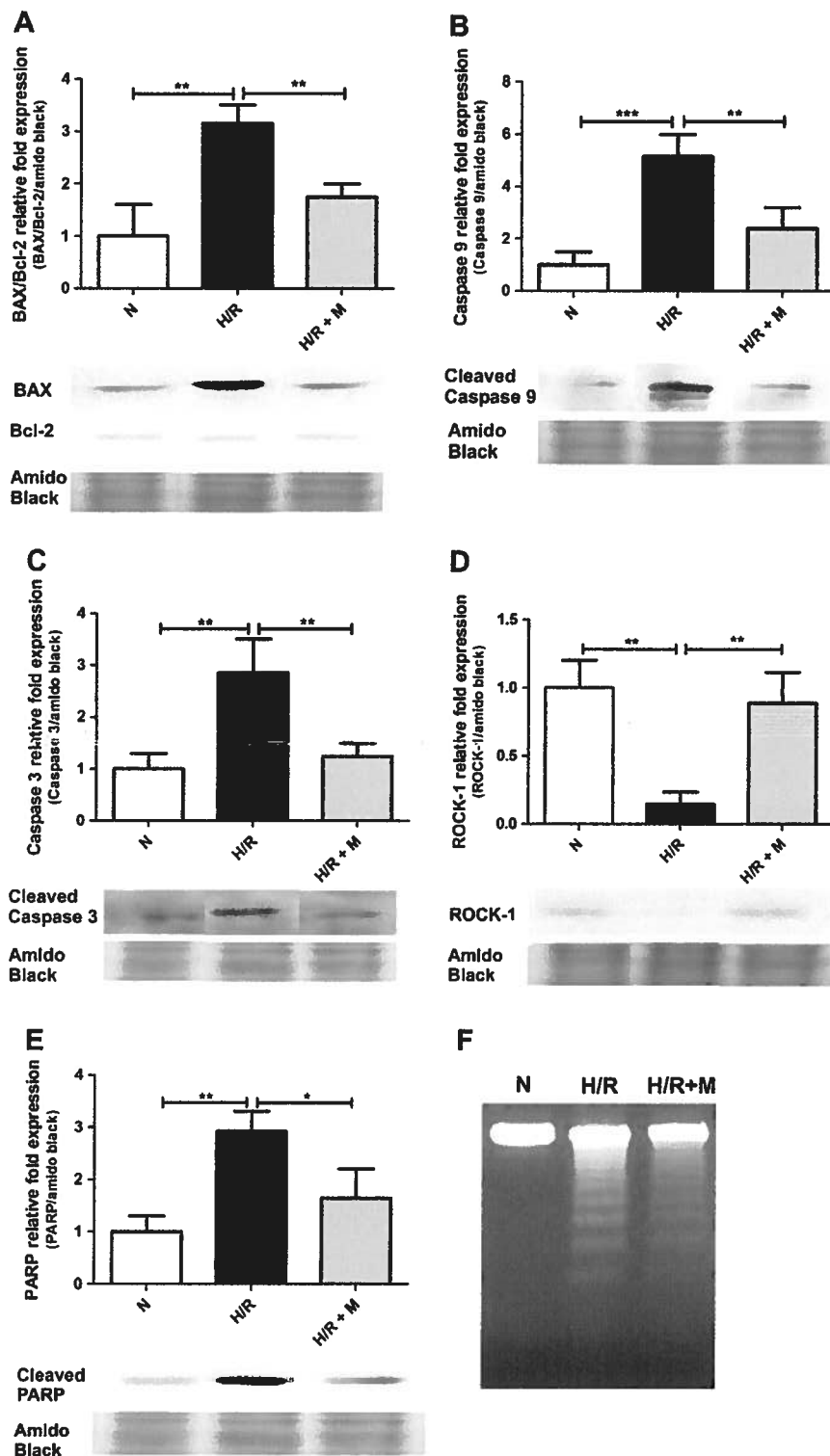


Fig. 5. Melatonin prevents the induction of mitochondrial-mediated apoptosis induced by hypoxia-reoxygenation (H/R). Protein expression of (A) Bax relative to Bcl-2 and expression of (B) cleaved caspase 9, (C) cleaved caspase 3, (D) ROCK-1 and (E) cleaved PARP was determined using semi-quantitative Western blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. (F) DNA fragmentation was evaluated by agarose gel electrophoresis. Bax, Bcl-2-associate X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; ROCK-1, rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; N, normoxia (8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); H/R, hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); and 1 mM melatonin. Results are expressed as mean ± SD; n = 3 different placentas; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; and *** P ≤ 0.001.

is a powerful *in vivo* antioxidant even at low doses (Bubenik et al., 1998). A prospective clinical study demonstrates that two hundred-fold higher dosage of vitamin E than melatonin is

required to achieve the same protective antioxidant effect (Reiter et al., 2009; Tamura et al., 2008). Moreover, melatonin, a lipophilic and hydrophilic indoleamine, enters every subcellular compart-

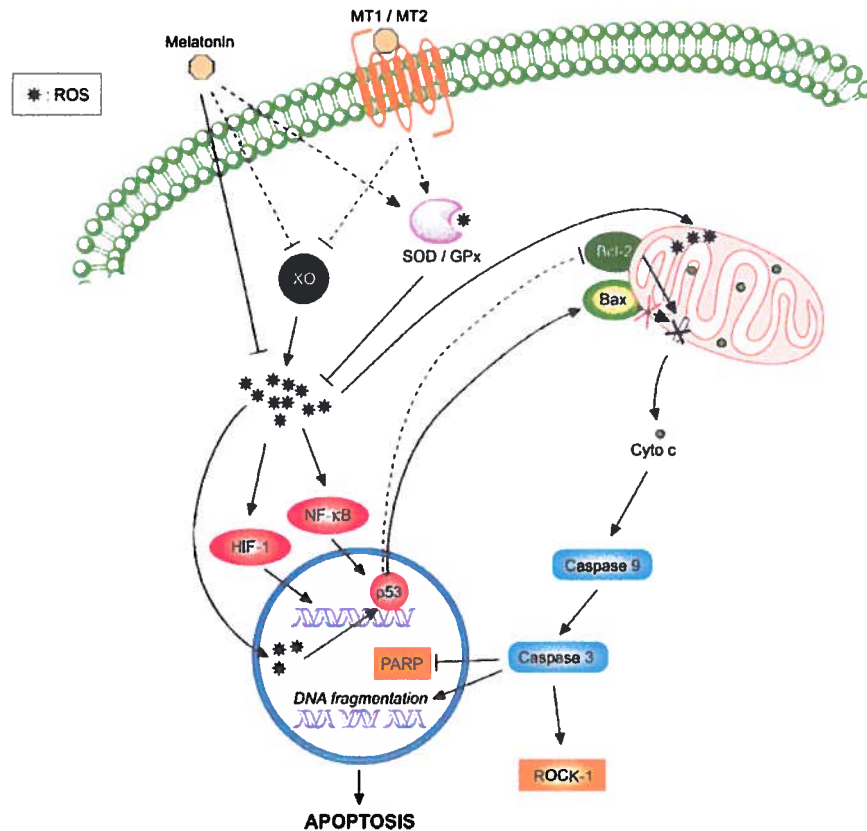


Fig. 6. Proposed anti-apoptotic pathway of melatonin in the syncytiotrophoblast subsequent to hypoxia/reoxygenation. Primary villous cytotrophoblasts were cultured for 72 h under normoxia (8% O₂) to allow the differentiation into syncytiotrophoblast. The cells were then subjected to hypoxia (0.5% O₂) for 4 h followed by 18 h reoxygenation (8% O₂) with or without melatonin as described in Section 2. Hypoxia/reoxygenation induces xanthine oxidase (XO) expression and activity, thereby generating reactive oxygen species (ROS). ROS activate redox sensitive transcription factors including hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and nuclear factor kappa B (NF-κB). NF-κB induces p53 which triggers the Bax/Bcl-2 pathway of mitochondrial apoptosis. ROS-induced DNA fragmentation also activated p53. Activation of the Bax/Bcl-2 pathway leads to the activation of caspase 9 and caspase 3. Downstream effects of caspase 3 are the activation of Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK-1), the cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) and the DNA fragmentation. Melatonin reverses the induction of mitochondrial apoptosis through reduce oxidative stress. Melatonin passes through all physiological membranes and then scavenges ROS in the cytoplasm, mitochondria and nucleus. Melatonin via its MT1 and MT2 receptors indirectly increase the expression and activity of superoxide dismutase (SOD) 1 and 2 as well as glutathione peroxidase (GPx) antioxidant enzymes. XO expression and activity is indirectly reduced by melatonin and its receptors. Plain line: direct mechanism; dash line: indirect mechanism; arrowhead: stimulation.

ment (Venegas et al., 2012) and rapidly crosses every morpho-physiological barrier, including the placental barrier (Okatani et al., 1998; Pardridge and Mietus, 1980), in opposition to vitamin E (Bortolotti et al., 1990). Supporting our results, other authors have proposed the use of melatonin to prevent or treat preeclampsia (Lanoix et al., 2012a; Milczarek et al., 2010; Okatani et al., 2001; Wakatsuki et al., 2001). The effect of melatonin on primary villous trophoblast cells isolated from placentas of pregnancies complicated by preeclampsia in comparison to normotensive pregnancies remains unknown. The villous trophoblast is the alleged tissue responsible (Kivela, 1991; Lanoix et al., 2008) for the increased maternal blood melatonin levels occurring during pregnancy (Kivela, 1991; Nakamura et al., 2001) and those levels are significantly reduced in cases of preeclampsia (Nakamura et al., 2001; Tranquilli et al., 2004). Thus, it may be important to characterize *in vitro* melatonin production in syncytiotrophoblast under H/R in comparison to normoxia. In addition to preeclampsia, melatonin could be effectively used in the management of pregnancy complications in case of alterations of villous trophoblast homeostasis, including intra-uterine growth restriction and gestational diabetes mellitus (Heazell et al., 2011). Melatonin has been implicated in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus and proposed as a potential treatment for this condition (Figuerola and Agil, 2011).

In conclusion, this work establishes melatonin as a potential watchdog against H/R-induced villous trophoblast homeostasis alterations. This is the first study to ascertain the preventive role of melatonin against oxidative stress damage in the primary term villous trophoblast in placentas from normal pregnancies and to document that melatonin treatment protects against mitochondrial-dependent apoptosis arising from abnormally high oxidative stress. Taken together with our previous work showing a decrease of melatonin in the preeclamptic placenta (Lanoix et al., 2012a), these results reinforce the potential preventive and therapeutic use of melatonin in pregnancy complications that involve villous trophoblast homeostasis alterations, such as preeclampsia as suggested by us (Lanoix et al., 2012a) and others (Milczarek et al., 2010; Okatani et al., 2001; Wakatsuki et al., 2001). While more studies are needed, one thorough investigation conducted by the U.S. Center for Life Sciences and Toxicology has documented the maternal and fetal safety of melatonin during pregnancy when given over a wide range of doses (Jahnke et al., 1999).

Acknowledgements

We are grateful to Pr. Jacques Bernier and Mr. Bruno Johnson for technical assistance with the DNA fragmentation analysis. This work was financially supported by a grant from the Natural

Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC # 262011-2009) awarded to C.V. D.L. received a Ph.D. studentship from the Fond de la recherche en Santé du Québec (FRSQ) and AAL a M.Sc. studentships from the NSERC and the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.010>.

References

- Aban, M., Cinel, L., Arslan, M., Dilek, U., Kaplanoglu, M., Arpacı, R., Dilek, S., 2004. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J. Exp. Med.* 204, 195–202.
- Aversa, S., Pellegrino, S., Barberi, I., Reiter, R.J., Gitto, E., 2012. Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 25, 207–221.
- Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N., Huppertz, B., 2004. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.* 11, 90–98.
- Bortolotti, A., Traina, G.L., Barzago, M.M., Celardo, A., Bonati, M., 1990. Placental transfer and tissue distribution of vitamin E in pregnant rabbits. *Biopharm. Drug Dispos.* 11, 679–688.
- Bubenik, G.A., Blask, D.E., Brown, G.M., Maestroni, G.J., Pang, S.F., Reiter, R.J., Viswanathan, M., Zisapel, N., 1998. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol. Signals Recept.* 7, 195–219.
- Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287–299.
- Cindrova-Davies, T., Spasic-Boskovic, O., Jauniaux, E., Chazotte-Lucas, P.C., Burton, G.J., 2007a. Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am. J. Pathol.* 170, 1511–1520.
- Cindrova-Davies, T., Yung, H.-W., Johns, J., Spasic-Boskovic, O., Korolchuk, S., Jauniaux, E., Burton, G.J., Charnock-Jones, D.S., 2007b. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am. J. Pathol.* 171, 1168–1179.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3, 339–345.
- Das, A., Belagodu, A., Reiter, R.J., Ray, S.K., Banik, N.L., 2008. Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *J. Pineal Res.* 45, 117–124.
- Das, A., McDowell, M., Pava, M.J., Smith, J.A., Reiter, R.J., Woodward, J.J., Varma, A.K., Ray, S.K., Banik, N.L., 2010. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors. *J. Pineal Res.* 48, 157–169.
- Dupere-Minier, G., Hamelin, C., Desharnais, P., Bernier, J., 2004. Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells. *Apoptosis* 9, 543–551.
- Figuerola, A., Agil, A., 2011. Changes in plasma's oxidative stress and antioxidant activity, measured with melatonin levels, and its relationship to newborns from obese and diabetic pregnancies. *J. Diabetes Metab. S:4* 002.
- Frendo, J.L., Therond, P., Bird, T., Massin, N., Muller, F., Guibourdenche, J., Luton, D., Vidaud, M., Anderson, W.B., Evain-Brion, D., 2001. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142, 3638–3648.
- Galano, A., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J. Pineal Res.* 51, 1–16.
- Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., Huppertz, B., 2009. Factors Involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30, 49–54.
- Haddad, J.J., 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 14, 879–897.
- Heazell, A.E., Lacey, H.A., Jones, C.J., Huppertz, B., Baker, P.N., Crocker, I.P., 2008. Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta* 29, 175–186.
- Heazell, A.E., Sharp, A.N., Baker, P.N., Crocker, I.P., 2011. Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis* 16, 135–144.
- Hung, T.H., Burton, G.J., 2006. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 45, 189–200.
- Hung, T.H., Skepper, J.N., Burton, G.J., 2001. In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am. J. Pathol.* 159, 1031–1043.
- Hung, T.H., Skepper, J.N., Charnock-Jones, D.S., Burton, G.J., 2002. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ. Res.* 90, 1274–1281.
- Huppertz, B., Frank, H.G., Reister, F., Kingdom, J., Korr, H., Kaufmann, P., 1999. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab. Invest.* 79, 1687–1702.
- Ishihara, N., Matsuo, H., Murakoshi, H., Laoa-Fernandez, J.B., Samoto, T., Maruo, T., 2002. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186, 158–166.
- Jahnke, G., Marr, M., Myers, C., Wilson, R., Travlos, G., Price, C., 1999. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 50, 271–279.
- Jauniaux, E., Watson, A.L., Hempstock, J., Bao, Y.P., Skepper, J.N., Burton, G.J., 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress, a possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol.* 157, 2111–2122.
- Jung, Y., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z.G., Neckers, L., 2003. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem. J.* 370, 1011–1017.
- Kang, J.W., Koh, E.J., Lee, S.M., 2011. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J. Pineal Res.* 50, 403–411.
- Kivela, A., 1991. Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124, 233–237.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss 3rd, J.F., 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118, 1567–1582.
- Koh, P.O., 2012. Melatonin attenuates decrease of protein phosphatase 2A subunit B in ischemic brain injury. *J. Pineal Res.* 52, 57–61.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter Jr., G.A., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., Flavell, R.A., 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847–851.
- Lanoix, D., Vaillancourt, C., 2010. Cell culture media formulation and supplementation affect villous trophoblast HCG release. *Placenta* 31, 558–559.
- Lanoix, D., Ouellette, R., Vaillancourt, C., 2006. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum. Reprod.* 21, 1981–1989.
- Lanoix, D., Beghdadi, H., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2008. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J. Pineal Res.* 45, 50–60.
- Lanoix, D., Guerin, P., Vaillancourt, C., 2012a. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. *J. Pineal Res.* 53, 417–425.
- Lanoix, D., Lacasse, A.A., Reiter, R.J., Vaillancourt, C., 2012b. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol. Cell Endocrinol.* 348, 1–11.
- Lanoix, D., Lacasse, A.A., St-Pierre, J., Taylor, S.C., Ethier-Chiasson, M., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2012c. Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Mol. Biotechnol.* 52, 234–243.
- Lanoix, D., St-Pierre, J., Lacasse, A.A., Viau, M., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2012d. Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. *Placenta* 33, 151–156.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346–347.
- Le Bellego, F., Vaillancourt, C., Lafond, J., 2009. Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake. *Methods Mol. Biol.* 550, 73–87.
- Leung, D.N., Smith, S.C., To, K.F., Sahota, D.S., Baker, P.N., 2001. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 1249–1250.
- Li, Z., Nickkhogh, A., Yi, X., Bruns, H., Gross, M.L., Hoffmann, K., Mohr, E., Zorn, M., Buchler, M.W., Schemmer, P., 2009. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J. Pineal Res.* 46, 365–372.
- Many, A., Westerhausen-Larson, A., Kanbour-Shakir, A., Roberts, J.M., 1996. Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta* 17, 361–365.
- Many, A., Hubel, C.A., Fisher, S.J., Roberts, J.M., Zhou, Y., 2000. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am. J. Pathol.* 156, 321–331.
- Milczarek, R., Hallmann, A., Sokolowska, E., Kaletha, K., Klimek, J., 2010. Melatonin enhances antioxidant action of α -tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J. Pineal Res.* 49, 149–155.
- Nakamura, Y., Tamura, H., Kashida, S., Takayama, H., Yamagata, Y., Karube, A., Sugino, N., Kato, H., 2001. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J. Pineal Res.* 30, 29–33.
- Nishino, T., Nakanishi, S., Okamoto, K., Mizushima, J., Hori, H., Iwasaki, T., Ichimori, K., Nakazawa, H., 1997. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 783–786.
- Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tamura, S., Sagara, T., 1998. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J. Pineal Res.* 25, 129–134.

- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Shinohara, K., Taniguchi, K., Fukaya, T., 2001. Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. *J. Pineal Res.* 31, 173–178.
- Pardridge, W.M., Mietus, L.J., 1980. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34, 1761–1763.
- Poston, L., Briley, A.L., Seed, P.T., Kelly, F.J., Shennan, A.H., 2006. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 367, 1145–1154.
- Rampersad, R., Nelson, D.M., 2007. Trophoblast biology, responses to hypoxia and placental dysfunction in preeclampsia. *Frontiers Biosci.* 12, 2447–2456.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Mayo, J.C., Sainz, R.M., 2009. Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod.* 81, 445–456.
- Richter, H.G., Hansell, J.A., Raut, S., Giussani, D.A., 2009. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *J. Pineal Res.* 46, 357–364.
- Robins, J.C., Heizer, A., Hardiman, A., Hubert, M., Handwerger, S., 2007. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta* 28, 1141–1146.
- Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter, R.J., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36, 1–9.
- Rumbold, A.R., Crowther, C.A., Haslam, R.R., Dekker, G.A., Robinson, J.S., 2006. Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N. Engl. J. Med.* 354, 1796–1806.
- Schneider, H., 2011. Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178, 51–58.
- Scifres, C.M., Nelson, D.M., 2009. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J. Physiol.* 587, 3453–3458.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R.J., Sugino, N., 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res.* 44, 280–287.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Kim, S.J., El-Sokkary, G.H., 1998. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J. Pineal Res.* 25, 184–191.
- Tomas, S.Z., Prusac, I.K., Roje, D., Tadin, I., 2011. Trophoblast apoptosis in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 71, 250–255.
- Tranquilli, A.L., Turi, A., Giannubilo, S.R., Garbati, E., 2004. Circadian melatonin concentration rhythm is lost in pregnant women with altered blood pressure rhythm. *Gynecol. Endocrinol.* 18, 124–129.
- Tuuli, M.G., Longtine, M.S., Nelson, D.M., 2011. Review: Oxygen and trophoblast biology – a source of controversy. *Placenta* 32 (Suppl 2), S109–S118.
- Vaillancourt, C., Lanoix, D., Le Bellego, F., Daoud, G., Lafond, J., 2009. Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 962–973.
- Vanderlelie, J., Venardos, K., Clifton, V.L., Gude, N.M., Clarke, F.M., Perkins, A.V., 2005. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 26, 53–58.
- Venegas, C., Garcia, J.A., Escames, G., Ortiz, F., Lopez, A., Doerrier, C., Garcia-Corzo, L., Lopez, L.C., Reiter, R.J., Acuna-Castroviejo, D., 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J. Pineal Res.* 52, 217–227.
- Wakatsuki, A., Okatani, Y., Ikenoue, N., Shinohara, K., Watanabe, K., Fukaya, T., 2001. Melatonin protects against oxidized low-density lipoprotein-induced inhibition of nitric oxide production in human umbilical artery. *J. Pineal Res.* 31, 281–288.
- Wang, Y., Walsh, S.W., 2001. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 206–212.
- Watanabe, K., Hamada, F., Wakatsuki, A., Nagai, R., Shinohara, K., Hayashi, Y., Imamura, R., Fukaya, T., 2012. Prophylactic administration of melatonin to the mother throughout pregnancy can protect against oxidative cerebral damage in neonatal rats. *J. Matern-Fetal & Neonatal. Med.* 25, 1254–1259.
- Wisdom, S.J., Wilson, R., McKillop, J.H., Walker, J.J., 1991. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 1701–1704.
- Zamzami, N., Kroemer, G., 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 67–71.

SUPPLEMENTAL MATERIAL: FIGURE LEGENDS

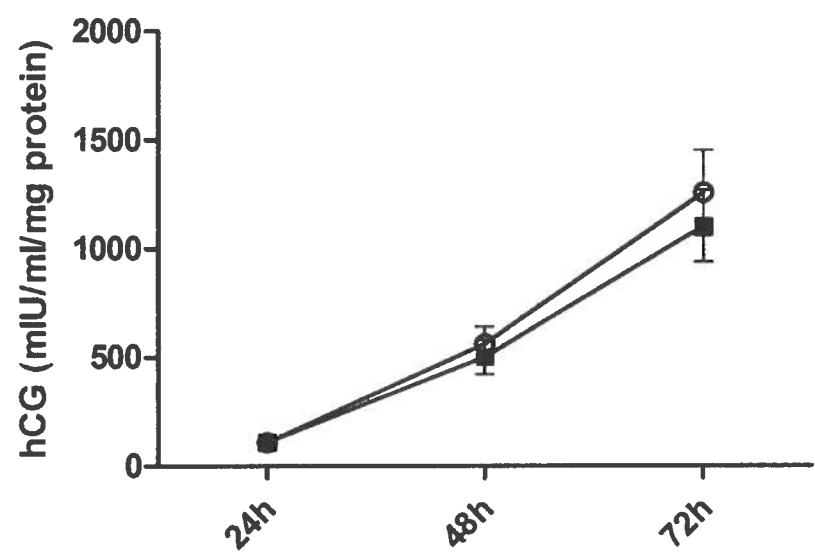
Supplemental data 1: Melatonin does not alter human chorionic gonadotropin (hCG) secretion (biochemical differentiation) in primary term villous trophoblast under normoxia. Villous cytotrophoblasts were cultured under normoxia (8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂) with (■) or without (vehicle; 0.1% DMSO) (○) 1 mM melatonin for 72 h. Treatments were replenished daily. hCG production was at 24 h, 48 h and 72 h of culture determined as described in Material and Methods. Results are expressed as mean ± S.D. (n = 3 different placentas) and data have been normalized against protein content of whole cell lysate from corresponding culture well.

Supplemental data 2: Melatonin does not alter cell parameters required to allow villous trophoblast differentiation. (A) Relative ROS levels in primary villous trophoblasts were determined using the 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA) fluorometric assay. (B) SOD1 and (C) SOD2 was determined using semi-quantitative Western blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. (D) DNA fragmentation was evaluated by agarose gel electrophoresis. The different techniques are described in Material and Methods. RFU: relative fluorescence units. N: normoxia (8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); H/R: hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); 1 mM melatonin. Results are expressed as mean ± SD; n= 3 different placentas; *** $P \leq 0.001$.

Supplemental data 3: Melatonin prevents the production of TNF- α induced by hypoxia/reoxygenation (H/R). Protein expression of TNF- α was determined using semi-quantitative Western blot as described in Material and Methods. Amido black stain was used to normalize protein expression. TNF- α : tumor necrosis factor α ; N: normoxia

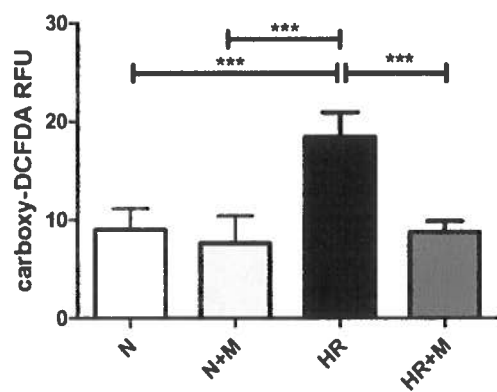
(8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); H/R: hypoxia/reoxygenation (0.5% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂ → 8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); 1 mM melatonin. Results are expressed as mean ± SD; n=3 different placentas; *** $P \leq 0.001$.

Supplemental data 1.

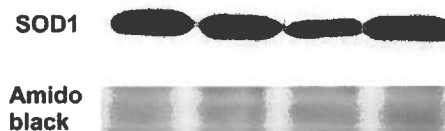
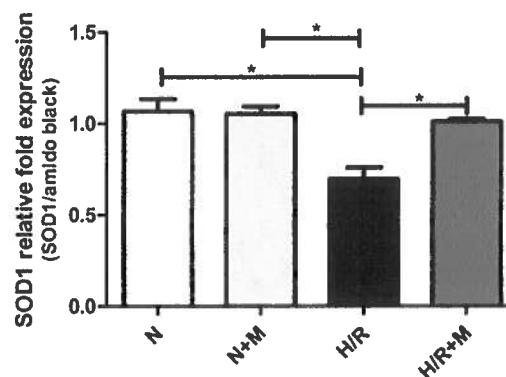


Supplemental data 2.

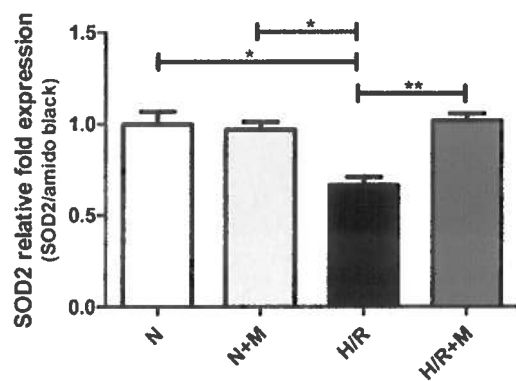
A



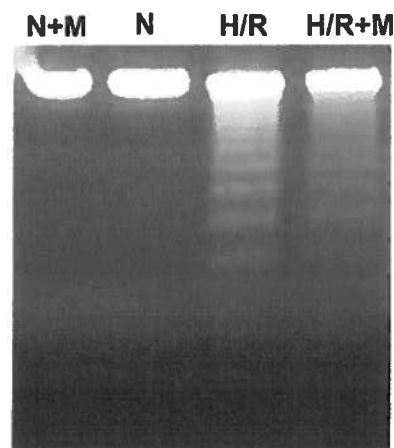
B



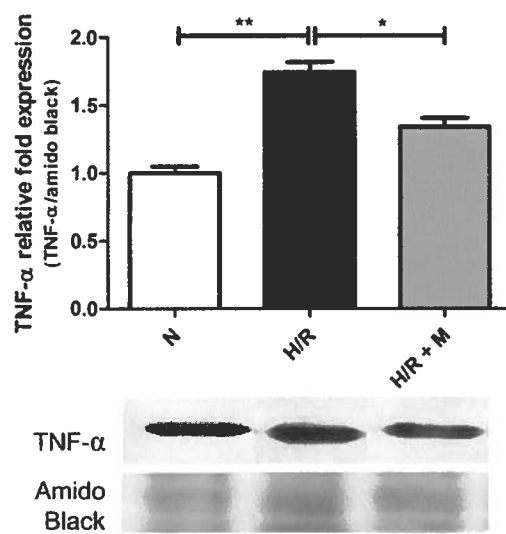
C



D



Supplemental data 3.



DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La présente étude a permis de démontrer la capacité de la mélatonine à prévenir le stress oxydatif placentaire, impliqué dans de nombreuses complications de la grossesse telles que le DGM, ainsi qu'une altération du système de la mélatonine (expression des enzymes de synthèse et de ses récepteurs) dans les placentas de grossesses normales par rapport à ceux de DGM. Plus spécifiquement, les résultats démontrent que : 1) l'expression de l'enzyme limitante de la synthèse de la mélatonine (AANAT) ainsi que des récepteurs MT1 et MT2 est significativement réduite dans les placentas de DGM comparativement à ceux de grossesses normales; 2) une augmentation significative de la génération des ROS conjuguée à une diminution significative des défenses antioxydantes dans les placentas compliqués par un DGM comparativement à ceux de grossesses normales, et 3) dans notre modèle *in vitro*, la mélatonine prévient l'augmentation du stress oxydatif induit par une H/R en maintenant l'équilibre pro-oxydant-antioxydant dans les primocultures de trophoblaste villosus de placentas de grossesses normales à terme.

Les travaux présentés au **Chapitre 1** démontrent une diminution significative de l'expression de la protéine des enzymes AANAT et HIOMT, responsable de la synthèse de la mélatonine, dans les placentas de grossesses compliquées par le DGM en comparaison à ceux de grossesses normales (**Chapitre 1**). Ces résultats suggèrent une diminution de la production de mélatonine placentaire dans les placentas de DGM étant donné que la production placentaire de mélatonine est positivement corrélée à l'expression de la protéine de AANAT et HIOMT (Lanoix *et al.*, 2008, Lanoix *et al.*, 2012a). Des études supplémentaires devront cependant être réalisées pour confirmer si l'activité de AANAT et HIOMT ainsi que les taux de mélatonine sont diminués dans les placentas de grossesses avec DGM comparée à ceux de grossesses normales. Le placenta semble être responsable de l'importante augmentation des taux sanguins maternels de mélatonine tout au long de la grossesse (Kivela, 1991, Lanoix *et al.*, 2008).

D'ailleurs, les données préliminaires montrent une augmentation significative de l'expression de AANAT dans le placenta est observée au 3^e trimestre de la grossesse, suggérant une plus grande production de mélatonine par le placenta (**Annexe 1**). De plus, une diminution des taux sanguins maternels de mélatonine a été observée dans les cas de grossesses pathologiques associées avec une augmentation du stress oxydatif, tel que la prééclampsie (Kivela, 1991, Lanoix *et al.*, 2008, Lanoix *et al.*, 2012a). Une réduction des taux sanguins maternels de mélatonine pourrait également être observée dans les cas de DGM. Il serait donc intéressant de comparer les taux sanguins maternels de mélatonine chez les femmes atteintes de DGM ou non. D'ailleurs, chez des patients atteints de diabète de type 2 ainsi que chez des modèles de rats diabétiques, une diminution des taux sanguins de mélatonine a été observée et est corrélée à un risque accru d'altération de la régulation de la glycémie ainsi qu'à des complications associées; dont une augmentation du stress oxydatif (Claustrat *et al.*, 2005, Peschke *et al.*, 2006b). En outre, il a récemment été démontré qu'une diminution du taux de sécrétion de mélatonine augmente le risque de développer un diabète de type 2 (McMullan *et al.*, 2013). D'ailleurs, la signalisation du récepteur MT2 semble particulièrement importante dans le diabète de type 2 et le DGM. En effet, une mutation génétique assurant la perte de sa fonction est un important facteur de risque pour le développement de ces deux maladies (Bonfond *et al.*, 2012, Bouatia-Naji *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2011, Lanoix *et al.*, 2012d, Ling *et al.*, 2011, Radaelli *et al.*, 2003). Dans ce sens, la présente étude montre une réduction significative de l'expression de l'ARNm et de la protéine des récepteurs MT1 et MT2 dans les placentas de grossesses compliquées par le DGM par rapport à ceux de grossesses normales (**Chapitre 1**). Cette réduction de l'expression de MT1 et MT2 dans les placentas de DGM pourrait être due à une diminution des taux de mélatonine; l'expression de ses enzymes de synthèse, AANAT et HIOMT, étant moindre que dans le placenta de grossesse normale. Une diminution de la production locale de mélatonine est d'ailleurs connue pour réguler à la baisse l'expression du gène des récepteurs MT1 et MT2 (Yerer *et al.*, 2010). Conséquemment, dans les placentas de

grossesses compliquées par le DGM, la diminution de production de mélatonine, conjuguée à la diminution de l'expression de ses récepteurs MT1 et MT2, indique une perte de fonction de la mélatonine. Une des principales fonctions de la mélatonine est son action antioxydante. Cette altération de ses propriétés antioxydantes pourrait donc être, en partie, impliquée dans l'augmentation du stress oxydatif observée dans les placentas de DGM par rapport à ceux de grossesses normales (**Chapitre 1**).

Les résultats présentés au **Chapitre 1** montrent une augmentation de la génération des ROS, probablement via l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme XO, dans les placentas de DGM comparés à ceux de grossesses normales. On observe également une réduction significative des défenses antioxydantes, expression et activité de la SOD1, SOD2 et GPx, dans les placentas de DGM par rapport à ceux de grossesses normales. Ces résultats suggèrent fortement que l'augmentation du stress oxydatif placentaire dans le DGM résulte d'une altération de l'équilibre pro-oxydants-antioxydants. Nos résultats sont toutefois différents de ceux de l'étude de l'équipe de Lappas qui ne démontre aucune différence d'expression de l'ARNm de SOD et GPx dans les placentas de DGM par rapport à ceux de grossesses normales (Lappas *et al.*, 2010). Dans l'étude de Lappas et collaborateur, les participantes, groupe contrôle et DGM, avaient un IMC correspondant à un surpoids alors que dans la présente étude (**Chapitre 1**), les femmes du groupe contrôle avaient un IMC indiquant un poids santé et celles avec un DGM un surpoids. Il est connu qu'un surpoids et l'obésité entraînent une augmentation de la production de ROS ainsi qu'une diminution des défenses antioxydantes (Unger *et al.*, 2010). L'équipe de Lappas n'a pas observé de diminution de l'expression de SOD et GPx dans les placentas de DGM en comparaison à leur groupe contrôle probablement parce que les défenses antioxydantes sont déjà diminuées dans le groupe contrôle dû au surpoids des participantes. Cette différence de résultats pourrait également être due aux gènes de références utilisées. En effet, l'équipe de Lappas n'a pas validé la stabilité des gènes de référence qu'ils ont

employés. De ce fait, ils n'ont pas suivi le *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (MIQE), ce qui peut engendrer des résultats erronés, tel que démontré par notre groupe (D. Lanoix *et al.*, 2012d). Nous avons démontré qu'il est important de vérifier l'intégrité de l'ARN et la stabilité des gènes de références pour obtenir des résultats valides et reproductibles. L'omission de le faire peut conduire à l'obtention de résultats différents et même significativement opposés à la réalité. L'équipe de Lappas a utilisé l'ARN ribosomal 18S comme gène de référence sans s'assurer de sa stabilité. Comme nous l'avons montré précédemment (D. Lanoix *et al.*, 2012d), 18S est le gène de références, parmi ceux étudiés, dont l'expression est la moins stable entre les placentas de grossesses normales vs. de DGM (Lanoix *et al.*, 2012d). De plus, l'équipe de Lappas n'a utilisé qu'un seul gène de référence alors qu'il a été démontré dans Lanoix *et al.* (2012d) que c'est la moyenne géométrique de trois gènes qui donne des résultats fiables pour la comparaison de l'expression des gènes entre des placentas de grossesses normales et de DGM (Lanoix *et al.*, 2012d).

La mélatonine induit son action cytoprotectrice via l'activation de ses récepteurs MT1 et MT2 et par son action de capteur de radicaux libres (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Il a été démontré, chez le rat, que la mélatonine protège le myocarde contre les dommages causés par une ischémie/réperfusion par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de ses récepteurs (Sallinen *et al.*, 2007). De plus, la capacité de la mélatonine à promouvoir la survie cellulaire chez plusieurs tissus est induite à la fois dépendamment et indépendamment de ses récepteurs (Hardeland *et al.*, 2009, Rodriguez *et al.*, 2004, Tan *et al.*, 1999, Tan *et al.*, 1998, Tomas-Zapico *et al.*, 2005). Il serait intéressant d'utiliser de comparer des primocultures de trophoblaste villos de placentas de DGM et de grossesses normales afin de caractériser le rôle antioxydant de la mélatonine et de déterminer l'implication des récepteurs MT1 et MT2 dans ses effets protecteurs à l'aide de petits ARN interférents (siRNA). Il est toutefois difficile d'obtenir du tissu placentaire frais de DGM immédiatement après l'accouchement pour en isoler des

primocultures de trophoblastes villex. Il serait donc avantageux d'utiliser un modèle *in vitro* simulant les altérations placentaires retrouvées dans les cas de DGM, similaire à celui que nous avons utilisé au Chapitre 2, compte tenu de la difficulté à accéder à des primocultures de trophoblaste villex de DGM.

Le modèle *in vitro* d'H/R utilisé dans la présente étude (**Chapitre 2**) mime l'augmentation du stress oxydatif et les altérations trophoblastiques qui lui sont associées dans les grossesses pathologiques associées à une H/R, tels le DGM et la prééclampsie (Biri *et al.*, 2006, Coughlan *et al.*, 2004, Lappas *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2013). Chez les femmes enceintes, il y a une augmentation des ROS, en comparaison aux femmes non enceintes, qui est contrôlée par le système de défense antioxydant (Hung *et al.*, 2006b). Cette augmentation de ROS est accrue et non contrôlée par le système de défense antioxydantes dans certaines complications de la grossesse, telle que le DGM (**Chapitre 1**); tant au niveau placentaire que maternel (Biri *et al.*, 2006, Coughlan *et al.*, 2004, Lappas *et al.*, 2011). La fluctuation de la tension en oxygène au contact du STB contribue majoritairement à la génération du stress oxydatif (Hung *et al.*, 2001). Cette condition d'H/R, par la génération de radicaux libres, est une des sources de stress oxydatif participant à la pathogénèse du DGM (Lappas *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2013). Les résultats du **Chapitre 2** montrent qu'*in vitro*, les primocultures de CTBv sous H/R présentent des atteintes caractéristiques du DGM tel qu'observé au **Chapitre 1**, soit une augmentation des niveaux de radicaux libres conjugués à une diminution des défenses antioxydantes; supportant la validité de notre modèle. L'efficacité de l'H/R comme agent induisant un stress oxydatif dans le tissu placentaire a été démontrée *in vitro* où elle stimule la production de ROS (Cindrova-Davies, 2009, Cindrova-Davies *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2013), inhibe les défenses antioxydantes (He *et al.*, 2009, Matsunami *et al.*, 2009) et augmente l'apoptose par la voie de la mitochondrie (Cindrova-Davies *et al.*, 2007, Hung *et al.*, 2006a, Hung *et al.*, 2002). La présente étude démontre que la mélatonine maintient l'équilibre pro-oxydant-antioxydant, en renversant de manière significative

la production de ROS, notamment en réduisant l'expression et l'activité de la XO, et en augmentant les défenses antioxydantes, telles que l'expression et l'activité de la SOD1, SOD2 et GPx. Il est connu que la mélatonine diminue les niveaux de pro-oxydants, maintient les défenses antioxydantes et renverse l'apoptose par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de ses récepteurs (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2010, Choi *et al.*, 2011, Nagi *et al.*, 2002, Rodriguez *et al.*, 2004, Tomas-Zapico *et al.*, 2005, Turkoz *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2008) (voir la section **Action antioxydante de la mélatonine** dans la synthèse des connaissances, le **Chapitre 2** ainsi que la thèse de doctorat de Dave Lanoix (Dave Lanoix, 2013)). Les résultats obtenus au **Chapitre 1** montrent une diminution significative de l'expression des récepteurs MT1 et MT2 dans les cas de DGM; indiquant une perte de l'effet protecteur de la mélatonine. Cependant, des études supplémentaires avec des siRNA des récepteurs MT1 et/ou MT2 sont nécessaires pour déterminer si l'effet observé de la mélatonine dans notre modèle *in vitro* au **Chapitre 2** est dépendant et/ou indépendant de ses récepteurs.

Les données préliminaires présentées à l'**Annexe 1** montrent un rôle de la mélatonine et de ses récepteurs dans la différenciation du trophoblaste villos. En outre, la mélatonine stimule la sécrétion de la hCG, un marqueur de la survie du STB, dans les primocultures de trophoblaste villos cultivé à 20% O₂, par un mécanisme indépendant de ses récepteurs MT1 et MT2. Donnée intéressante, la mélatonine n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion de hCG dans les primocultures de trophoblaste villos cultivé à 8% O₂ (**Chapitre 2**). Il est connu que chez les cellules exposées à une teneur en oxygène supérieure à leur condition physiologique (hyperoxie), il y a une augmentation de la concentration intracellulaire en radicaux libres, exposant ainsi les cellules aux dommages causés par le stress oxydatif (Prokopenko *et al.*, 2009). Ceci suggère que les cellules trophoblastiques exposées à 20% O₂ (hyperoxie) ont probablement été exposées à une plus grande concentration de radicaux libres que celles cultivées à 8% O₂ (normoxie). Ces résultats suggèrent qu'en condition hyperoxique, la mélatonine via son action

antioxydante exerce un effet cytoprotecteur sur l'homéostasie du trophoblaste villositaire; illustré par une augmentation de la relâche de hCG en comparaison aux cellules non traitées. Tandis qu'en situation de normoxie, la relâche de hCG n'est pas affectée par la mélatonine, car les cellules maintenues à 8% O₂ n'ont pas été exposées à des niveaux de radicaux libres altérant l'homéostasie.

Les résultats de l'**Annexe 1** montrent une augmentation de l'expression du récepteur MT1 au cours de la différenciation des CTBv en STB alors qu'une diminution est observée pour le récepteur MT2, suggérant un rôle différent pour ces récepteurs dans la syncytialisation du trophoblaste villositaire. En effet, la littérature montre que la mélatonine stimule la différenciation de plusieurs types de cellules. Le récepteur MT1 pourrait donc être impliqués dans les processus d'induction de la différenciation alors que le récepteur MT2 serait davantage impliqué dans le maintien de la syncytialisation du trophoblaste villositaire; ceci reste à être étudié. Des études utilisant une approche de siRNA permettrait de déterminer le rôle de chacun des récepteurs de la mélatonine impliqué dans la différenciation, la fusion et la production de hCG chez le trophoblaste villositaire.

En conclusion, la présente étude démontre (1) que le système mélatonine placentaire (MT1, MT2 et AANAT et HIOMT) est exprimé dans le tissu placentaire à tous les trimestres de grossesse et est altéré dans les placentas de grossesses compliquées par un GDM comparé à ceux de grossesses normales; (2) un rôle pour la mélatonine dans la régulation du processus de syncytialisation du trophoblaste villositaire; (3) une augmentation des marqueurs de stress oxydatif et une diminution des enzymes antioxydantes dans les placentas de GDM comparés à ceux de grossesses normales; et (4) que la mélatonine exerce une action protectrice contre le stress oxydatif induit par l'H/R dans le trophoblaste villositaire en primoculture. Ces travaux suggèrent que la mélatonine joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie oxydatif du trophoblaste villositaire et qu'une altération du système mélatonine associé à une augmentation du stress

oxydatif est impliquée dans la physiopathogenèse du DGM. Nous proposons que la mélatonine pourrait être utilisée pour prévenir les dommages causés par le stress oxydatif dans le DGM. Des auteurs ont d'ailleurs proposé l'utilisation de la mélatonine pour traiter le DGM (Figuerola-Quevedo *et al.*, 2011). Dans des essais cliniques, la mélatonine s'est d'ailleurs montrée efficace pour contrer les complications associées au diabète de type 2, dont le stress oxydatif (Hussain *et al.*, 2006, Kadhim *et al.*, 2006, Paskaloglu *et al.*, 2004, Sanchez-Barcelo *et al.*, 2010). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer le potentiel de la mélatonine pour traiter les complications associées au DGM. Il serait entre autre intéressant de comparer la production de mélatonine et l'expression de ses récepteurs ainsi que la génération des ROS de même que l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes dans les primocultures de trophoblaste villosus provenant de placentas de grossesses normales versus de DGM.

CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats obtenus au cours de cette maîtrise contribuent à l'avancement des connaissances de différentes manières. Ils ont tout d'abord permis de démontrer une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'une diminution de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes dans les placentas de DGM comparés à ceux de grossesses normales. De plus, cette étude a montré une réduction de l'expression de l'enzyme limitant de la synthèse de la mélatonine (AANAT) ainsi que de l'expression des récepteurs MT1 et MT2 dans le tissu placentaire provenant de grossesses compliquées par un DGM comparativement à ceux de grossesses normales. Ces altérations suggèrent une diminution du rôle protecteur de la mélatonine dans les placentas de DGM comparativement à ceux de grossesses normales. Cette étude a également montré notre modèle *in vitro* de primocultures de trophoblaste villosus en état d'H/R est valide et que la mélatonine peut prévenir le stress oxydatif grâce à sa capacité de maintenir l'équilibre entre les pro-oxydants et antioxydants. Ces données suggèrent un rôle protecteur pour la mélatonine dans la pathogénèse du DGM, qui est caractérisée par une augmentation du stress oxydatif maternel et placentaire. Des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux cerner quelle est l'implication exacte de cette altération du système mélatonine placentaire dans la physiopathogénèse du DGM. Les résultats de cette étude nous amènent à proposer qu'une diminution de la production placentaire (trophoblastique) de mélatonine entraîne une diminution des défenses antioxydantes placentaire ainsi qu'un plus haut risque de développement de complication de la grossesse associée à une augmentation du stress oxydatif, tels que le DGM. Dans l'ensemble, ces travaux représentent un avancement majeur dans la compréhension du rôle de la mélatonine au niveau placentaire dans la grossesse normale et compliquée par une DGM, et par conséquent dans la croissance fœtale. De plus, ces travaux soutiennent le potentiel thérapeutique de la mélatonine dans les grossesses compliquées par un DGM, qui affecte de 7 à 9% des grossesses au Québec.

**ANNEXE 1 – RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES:
CHARACTERIZATION OF THE PLACENTAL MELATONIN SYSTEM
DURING PREGNANCY AND VILLOUS TROPHOBLAST
DIFFERENTIATION**

MATERIAL AND METHODS

Placental tissues

This study was approved by the ethical committee of Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM)-Hospitals-Luc and Mother and Child University Hospital Center (CHU)-Sainte-Justine Hospital (Montreal, QC, Canada). Placental tissues of first (7-12 weeks) and second (14-34 weeks) trimesters of pregnancy were obtained at CHU-Sainte-Justine, from therapeutic abortion. Third (36-38 weeks) and term (39-41 weeks) placental tissues were obtained at CHUM-St-Luc, immediately after spontaneous vaginal deliveries from uncomplicated pregnancies. Human placentas were immediately immersed in Dulbecco's minimal essential medium-high glucose (DMEM-HG; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) containing a mixture of antibiotics (5 µg/ml amphotericin, 50 µg/ml gentamycin, 0.12 mg/ml penicillin), kept at 4°C and processed within 1h. Tissues were cut at 5-cm² sections of the trophoblast, following the removal of the amnion, chorion and decidual layer and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Isolation and purification of term villous cytotrophoblast

Villous cytotrophoblast cells from term placenta of uncomplicated pregnancy were isolated, with minor modification as described previously (Lanoix *et al.*, 2008), using the trypsin-DNase/Percoll method described by (Kliman *et al.*, 1986) and subsequently immunopurified according to (Petroff *et al.*, 2006). Briefly, following the isolation, villous cytotrophoblast cells were suspended in fetal bovine serum (FBS; Gibco, Burlington, ON, Canada) and the percentage of viability and cell numbers were assessed by trypan blue exclusion. An average of 1.4×10^8 cells was obtained from 30 to 35 g of villous tissue. Cells were aliquoted in cryovial in freezing medium (10% DMSO in FBS) at a density of 1×10^7 cells/ml and stored at -80°C for 4-12 h. Then, cells were transferred to the vapor phase of a liquid nitrogen freezer and stored until analysis.

Villous mononuclear cytotrophoblasts were purified by immunomagnetic purification using autoMACS™, as previously described (Lanoix *et al.*, 2008). Cells were selected negatively with mouse anti-human HLA-ABC (clone W6/32) antibody and autoMACS goat anti-mouse IgG microbeads. Typical yield after cryopreservation and immunopurification ranged from 75% to 85% of starting population. Cells were suspended in 37°C culture medium, consisting of DMEM-HG supplemented with 2mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 10% FBS and 1x penicillin-streptomycin-neomycin (PNS) antibiotic mixture and seeded at a density of 4.5×10^6 cell/well in CellBind six-wells microplate (Corning).

mRNA expression analyses

The reverse-transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR; qPCR) analyses were performed as described in (Lanoix *et al.*, 2012a). Briefly, total RNA from primary villous trophoblast and from placental tissues was extracted using Aurum Total mini kit (Bio-Rad, Mississauga, Canada) according to manufacturer's instructions. The Experion™ Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad) was used to determine RNA integrity. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 2 µg RNA with the iScript cDNA synthesis kit following the manufacturer's instructions (BioRad) and stored at -20°C until further analysis. Specific primers for MT1, MT2, HIOMT, AANAT, peptidyl prolyl isomerase A (PPIA), HPRT and TOP-1 were designed using Oligo 6 and software (Molecular Biology Insights, Cascade, USA), the specificity was determined with Primer-Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Validated primer sequences are shown in **table 1**. PPIA, HPRT and TOP-1 were selected according as demonstrated in (Lanoix *et al.*, 2012a). qPCR were conducted using the CFX-96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). Amplification was performed with the SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) from 0.5 µl of product as described previously (Lanoix *et al.*, 2012a).

Proteins expression analyses

Whole cell lysates from primary villous trophoblast and from placental tissues were extracted as described previously for cells (Lanoix *et al.*, 2008) and for tissues (Lanoix *et al.*, 2012b). Protein concentration from each sample was determined using BCA protein assay reagents according to manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, CA.). Forty µg of proteins were resolved on 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA).

Release of hCG

For the evaluation of biochemical differentiation, primary villous trophoblast cell culture media were collected every 24 h (from 24 h to 96 h of culture) and centrifuged, after which supernatants were stored at -20°C until assayed. Cells were treated with increasing concentrations of melatonin (10 pM, 1 nM, 100 nM, 10 µM or 1 mM) or vehicle (0.1 % DMSO) as well as with 1 mM melatonin with or without 1 mM luzindole (Tocris Bioscience, Minneapolis, USA), 1 mM luzindole or vehicle. Melatonin (100 % pure chromatographically) was a generous gift from Pr Russel J Reiter (University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA). The secretion of hCG was evaluated in culture medium in triplicate by ELISA using EIA-1911 kits according to manufacturer's instruction (DRG International, Mountainside, USA). Results are normalized against protein content of whole cell lysate from corresponding culture well. Whole cell lysate were prepared as described above.

Assessment of syncytialisation

For the evaluation of morphological differentiation, primary villous trophoblast cells were treated with 1 mM melatonin and 1 mM luzindole as described above and stained for desmosomal protein and nuclei as described previously (Lanoix *et al.*, 2008). Briefly, cells were

fixed in methanol, blocked in 2 % donkey serum and incubated with mouse anti-desmoplakin antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), diluted to 1:800 in blocking buffer, overnight at 4°C. Cells were then incubated with donkey anti-mouse IgGAlexa Fluor 488 antibody (1:1000; Invitrogen, Burlington, Canada) for 1 h at room temperature in the dark. Nuclei were counterstained with propidium iodide (Invitrogen). Cells were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) and analyzed at 30x using a Leica DMRE fluorescence microscope (Deerfield, IL, USA) and photograph with a Cook Sensicam High Resolution Performance digital CCD camera (Romulus, MI, USA). From a random point near the uppermost edge of the well, three random fields were selected for analysis. The results are expressed as the percentage of nuclei contained in multinuclear (≥ 2 nuclei) syncytia.

Statistical analysis

All data are represented as mean $\pm$ S.D. Statistical significance between GDM pregnancies and their gestational-matched controls was determined by non-parametric Mann-Whitney U-test using Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Data were considered statistically significant at a *P* value < 0.05 .

RESULTS

Expression of melatonin receptors in placentas from different trimester of pregnancy

Figure 1 shows the RNA and protein expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in placentas from different trimesters of pregnancy. MT1 RNA expression in placentas varies significantly all along the pregnancy. MT1 RNA expression is significantly higher in 1st trimester than in 2nd, 3rd and in term placentas (**Fig. 1A**). However, RNA expression of MT2 was not significantly different between placentas from different trimesters of pregnancy (**Fig. 1B**). MT1 protein expression is significantly increased in 1st trimester compared to 3rd trimester placentas (**Fig. 1C**). As for RNA expression, protein expression of MT2 in placentas did not vary significantly between the different trimesters of pregnancy (**Fig. 1D**). To complete the analysis of melatonin in placentas from different trimester of pregnancies, the expression of its synthesizing enzymes was assessed. RNA expression of AANAT is significantly different between the 2nd and 3rd as well as 3rd and term (**Fig. 2C**). Nevertheless, no difference was observed in RNA expression of HIOMT (**Fig. 2B**).

Result show that during the differentiation of CTBv in STB melatonin receptors is expressed differently. RNA and protein of MT1 receptor is significantly more expressed at 96 h compare to 0 h (**Fig 3A-B**). In addition, MT2 RNA and protein expression was more expressed at 0h compare to 96 h (**Fig. 3C-D**). However, there is no difference in RNA expression of melatonin-synthesizing enzymes, AANAT and HIOMT (**Fig. 4**).

Figure 5A shows that 1 mM melatonin significantly increase hCG release during primary villous trophoblast differentiation from term placentas in comparison to vehicle at 72 h and 96 h of culture. Interestingly, luzindole, a selective MT1 and MT2 melatonin receptor antagonist did not block the stimulatory effect of melatonin on hCG release but it has a synergetic effect and increase hCG secretion (**Fig. 5B**). Hence, it has been demonstrated that luzindole is a powerful radical scavenger *in vitro* (Matheset *al.*, 2008). Syncytial fusion was also significantly increased by 1 mM melatonin treatment at 96 h of culture (**Fig 6A-B**). In addition, luzindole plays a similar

stimulatory effect on syncytialization when combined with melatonin (**Fig 6A**). Taken together, results from **Figure 5** and **6** indicate that melatonin significantly improve villous trophoblast biochemical and morphological differentiation.

REFERENCES

- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM & Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118(4):1567-1582.
- Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J & Vaillancourt C (2008) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res* 45(1):50-60.
- Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J & Vaillancourt C (2012a) Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Mol Biotechnol* 52(3):234-243.
- Lanoix D, St-Pierre J, Lacasse AA, Viau M, Lafond J & Vaillancourt C (2012b) Stability of reference proteins in human placenta: General protein stains are the benchmark. *Placenta* 33(3):151-156.
- Petroff MG, Phillips TA, Ka H, Pace JL & Hunt JS (2006) Isolation and culture of term human trophoblast cells. *Methods Mol Med* 121:203-217.

TABLES, FIGURES AND FIGURE LEGENDS

Table 1. Genes and primer sequences used for RT-qPCR.

Gene	Accession number	Primer sequence	
		Sense	Antisense
AANAT	NM_001088	GCTGTCAGCGCCTTT	ACGCCCAAGACGGA
HPRT1	NM_000194	GACCAGTCAACAGGGGACAT AA	AAGCTTGCGACCTTGACC
TOP-1	NM_003286	GGCAGAGTGAATCTAAGG	CTTAAAGGGTACAGGAATG
PPIA	NM_021130	GTTTGCAGACAAGGTCCCA	ACCCGTATGCTTTAGGATG
HIOMT	NM_004043	GGCGAGCGGCTACAGTT	ACAGGTCAAAGGCGGTCA
MT1	NM_005958	CCTGTCGGTGTATCGGAAC A	TGACTTGGCAGTGCAGATA GC
MT2	NM_005959	TACGACCCACGCATCTATTC C	AGGTAGCAGAAGGACACGA CA

AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase; HIOMT: hydroxyindole O-methyltransferase; PPIA: peptidylprolyl A; TOP-1 : topoisomerase1; HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1.

Table 2. Antibodies used for western blot analysis.

Antibody	Dilution	Incubation	Source
Primary antibody			
anti-AANAT	1:10 000	O/N at RT	Millipore (AB5467)
anti-HIOMT	1:40 000	O/N at 4°C	Abnova (H00000438-A01)
anti-MT1	1:1000	O/N at 4°C	Abnova (H00004543-A01)
Anti-MT2	1:1000	O/N at 4°C	Novus Biologicals (NBP1-00922)
Secondary antibody			
anti-mouse-HRP	1:10 000	1 h at RT	Millipore (AP192P)
anti-rabbit-HRP	1:10 000	1 h at RT	Millipore (AP182P)

AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase; HIOMT: hydroxyindole O-methyltransferase; HRP: horseradish peroxidase; O/N: overnight; RT: room temperature.

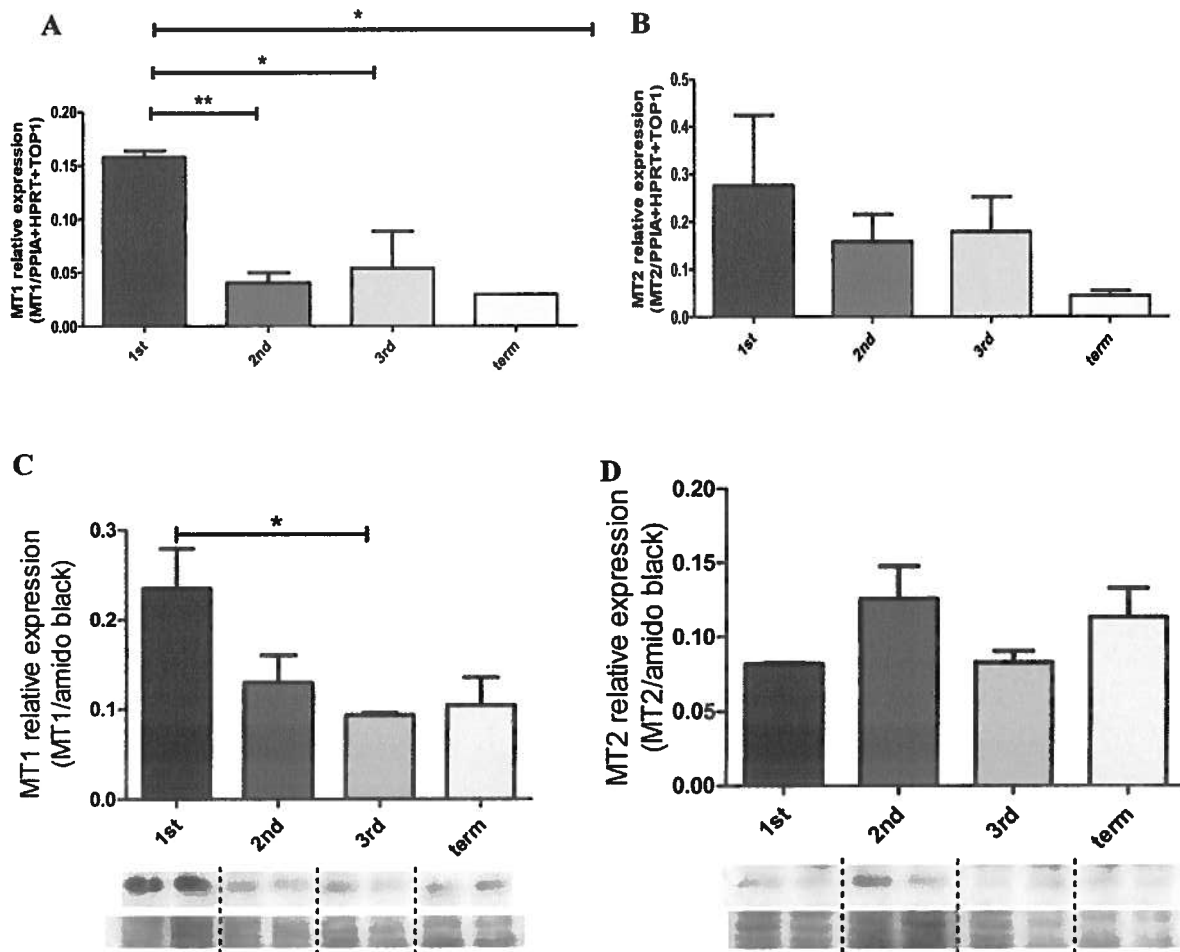


Figure 1. Expression of melatonin receptors in human placenta between different trimesters of pregnancy. RNA from MT1 (A) and MT2 (B) melatonin receptors were amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of PPIA, HPRT1 and TOP1 was used to normalize gene expression. Protein expression of MT1 (C) and MT2 (D) was determined using semi-quantitative Western Blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. PPIA: peptidylprolyl isomerase A; HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1; TOP-1: topoisomerase-1. 1st trimester (7-12weeks): n=3; 2nd trimester (14-34 weeks): n=6; 3rd trimester (36-38 weeks): n=3; term (39-41 weeks): n=3. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

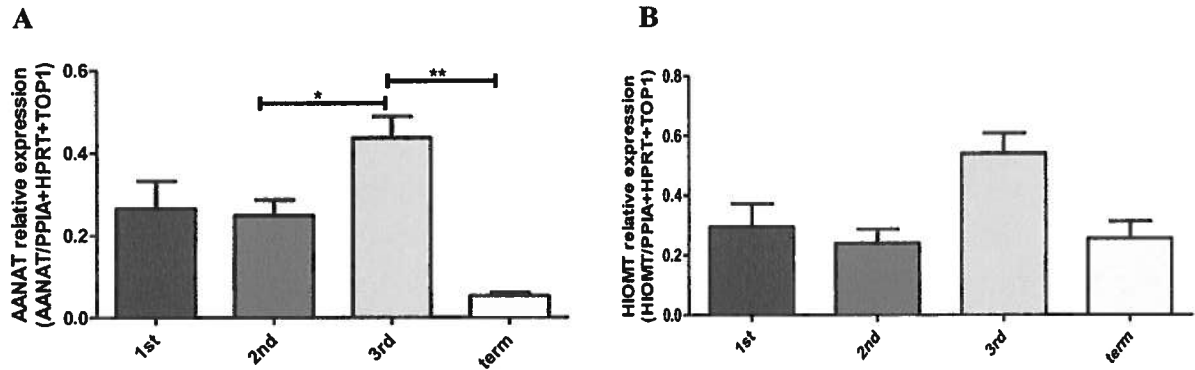


Figure 2. Expression of melatonin-synthesizing enzymes in human placentas between different trimesters of pregnancy. AANAT (A) and HIOMT (B) melatonin-synthesizing enzymes RNA were amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of PPIA, HPRT1 and TOP-1 was used to normalize gene expression. AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase, HIOMT: hydroxyindole O-methyl transferase, PPIA: peptidylprolyl isomerase A, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1, TOP1: topoisomerase-1. 1st trimester (7-12 weeks): n=3; 2nd trimester (14-34 weeks): n=6; 3rd trimester (36-38 weeks): n=3; term (39-41 weeks): n=3. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

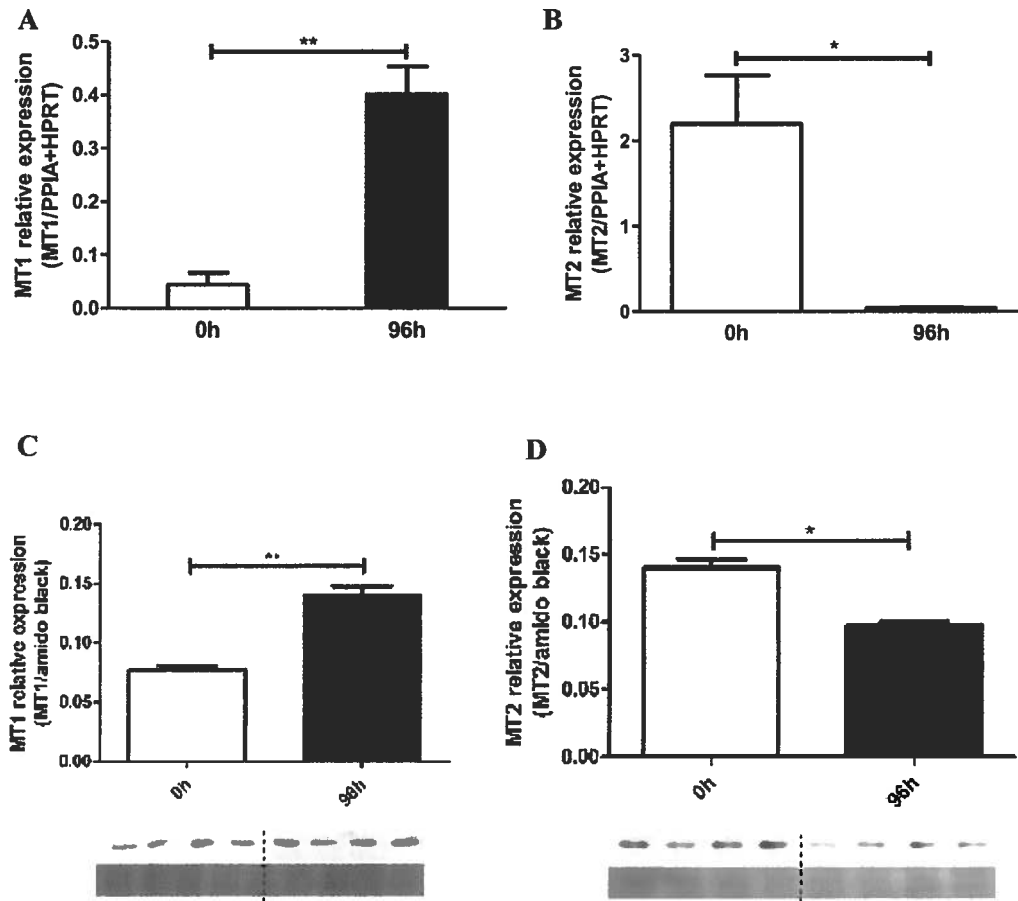


Figure 3. Expression of melatonin receptors RNA and proteins during villous trophoblast differentiation. Villous cytotrophoblasts were isolated and purified from normal human term placentas. Cells were seed and melatonin receptor expression was determined at 0h (villous cytotrophoblast) and 96h (syncytiotrophoblast) of culture. MT1 (**A**) and MT2 (**B**) melatonin receptors RNA were amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of PPIA and HPRT1 was used to normalize gene expression. Protein expression of MT1 (**C**) and MT2 (**D**) was determined using semi-quantitative Western Blot. Amido black stain was used to normalize protein expression. PPIA: peptidylprolyl isomerase A, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1. 0h: n=3; 96h: n=3. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

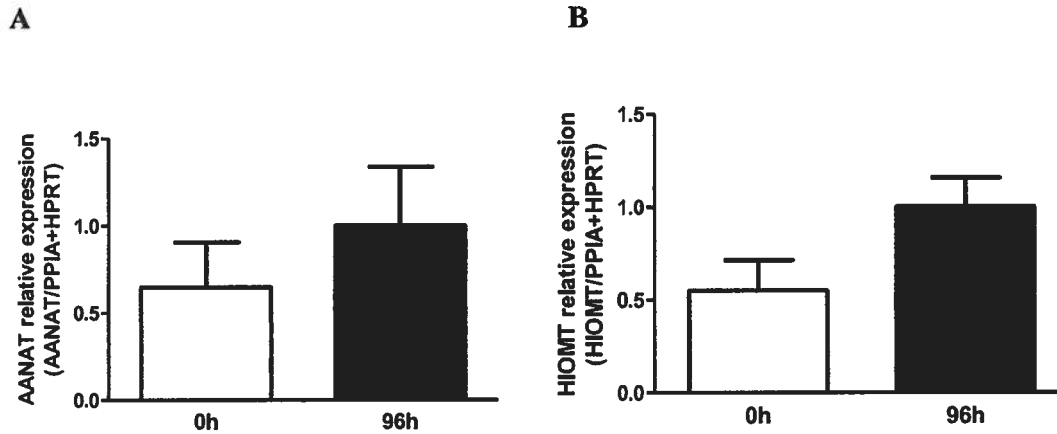


Figure 4. Expression of melatonin-synthesizing enzymes during villous trophoblast differentiation. Villous cytotrophoblasts were isolated and purified from normal human term placentas. Cells were seed and melatonin receptor expression was determined at 0h (villous cytotrophoblast) and 96h (syncytiotrophoblast) of culture. AANAT (**A**) and HIOMT (**B**) RNAs were amplified by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The geometric average of PPIA and HPRT1 was used to normalize gene expression. AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase, HIOMT: hydroxyindole O-methyltransferase, PPIA: peptidylprolyl isomerase A, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1. 0h: n=3; 96h: n=3.

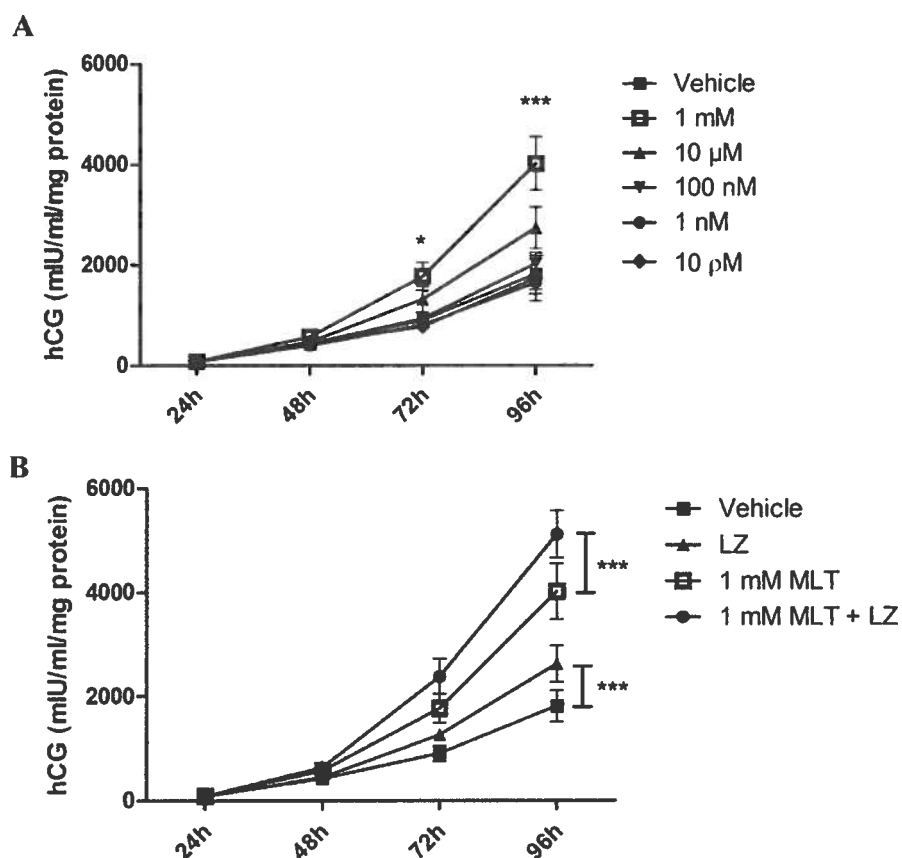


Figure 5 : hCG release in villous cytotrophoblast primary culture isolated from human term placentas at 24 h to 96 h of culture. (A) Cells were treated with increasing concentrations of melatonin or with vehicle (0.1 % DMSO). **(B)** Cells were treated with 1 mM melatonin (MLT), 1 mM melatonin combined with 1 mM luzindole, a selective MT1 and MT2 receptor antagonist, (MLT + LZ), 1mM luzindole (LZ) or with vehicle. All treatments were replenished daily. Values represent are mean $\pm$ S.D. $n=3$ and data have been normalized against protein content of whole cell lysate from corresponding culture well. : * $P < 0.05$; *** : $P < 0.001$. In **A**, the statistical difference is determined between vehicle and 1 mM melatonin.

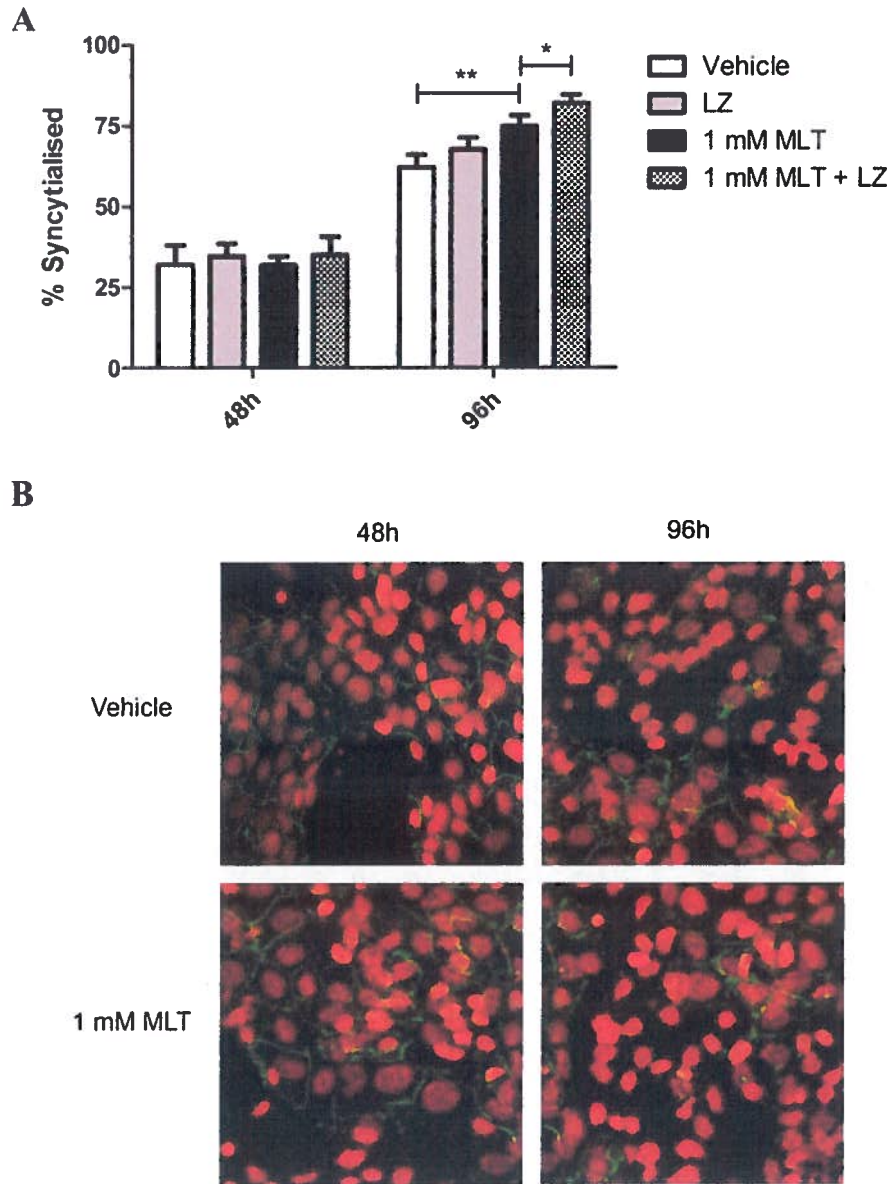


Figure 6: Assessment of fusion during villous trophoblast syncytialisation. Villous cytotrophoblast cells were isolated from human term placentas. **(A)** Graph showing the extent of syncytialisation at 48 h and 96 h of culture in the presence of 1 mM melatonin (MLT), 1 mM luzindole, a selective MT1 and MT2 receptor antagonist, (MLT + LZ), 1mM luzindole (LZ) or with vehicle (0.1 % DMSO). Values present mean $\pm$ S.D. $n=3$. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$. **(B)** Representative immunofluorescence staining of desmosomal protein in untreated and in 1 mM

melatonin treat primary villous trophoblasts, fixed in methanol, after 48 h and 96 h in culture.

Magnification, x30. All treatments were replenished daily.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L & Shah R (2008) Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10(8):1375-1403.
- Akbulut KG, Gonul B & Akbulut H (2009) The role of melatonin on gastric mucosal cell proliferation and telomerase activity in ageing. *J Pineal Res* 47(4):308-312.
- Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K & Walter P (2004) *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 4
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L & Livrea MA (2003) The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 34(1):1-10.
- Alsat E, Malassiné A, Tarrade A, Merviel P & Évain-Brion D (1999) Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *Médecine/Science* 15:1236-1243.
- Alsat E, Wyplosz P, Malassine A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C & Evain-Brion D (1996) Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *Journal of cellular physiology* 168(2):346-353.
- Andersson AK & Sandler S (2001) Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1 β -induced damage of rodent pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 30(3):157-165.
- AOGQ (2012) *Diabète gestationnel*. Association des obstétriciens et gynécologues du Québec), <http://www.gynecoquebec.com/gynecologie/santedelafemme/sujets-7-diabete-gestationnel.php> (Consulté le 15 juillet 2013)
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.

- Azzam EI, Jay-Gerin JP & Pain D (2012) Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 327(1-2):48-60.
- Baydas G, Reiter RJ, Yasar A, Tuzcu M, Akdemir I & Nedzvetskii VS (2003) Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 35(7):797-804.
- Baydas G, Tuzcu M, Yasar A & Baydas B (2004) Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. *Acta Diabetol* 41(3):123-128.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH & Carlberg C (1994) Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *The Journal of biological chemistry* 269(46):28531-28534.
- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA & Rodriguez AB (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 46(4):392-400.
- Benirschke K, Kaufmann P & Baergen RN (2006) Pathology of the human placenta. Springer, New York, 5th Ed. p 42-120.
- Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M & Durak I (2006) Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 27(2-3):327-332.
- Bishnupuri KS & Haldar C (1999) Maternal photoperiodic exposures alter the neonatal growth, pineal functions and sexual development of the Indian palm squirrel *F. pennanti*. Short communication. *J Neural Transm* 106(9-10):869-881.
- Bishnupuri KS & Haldar C (2000) Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Indian J Exp Biol* 38(10):974-981.
- Bishnupuri KS & Haldar C (2001) Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Biol Signals Recept* 10(5):317-325.

- Bitsch F, Aichholz R, Kallen J, Geisse S, Fournier B & Schlaeppli JM (2003) Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ligand-binding domain expressed in Sf9 cells—a mass spectrometry approach. *Anal Biochem* 323(1):139-149.
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N & Huppertz B (2004) Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 11(1):90-98.
- Boczek-Leszczyk E & Juszczak M (2007) [The influence of melatonin on human reproduction]. *Pol Merkur Lekarski* 23(134):128-130.
- Boisvert MR, Koski KG & Skinner CD (2010) Increased oxidative modifications of amniotic fluid albumin in pregnancies associated with gestational diabetes mellitus. *Anal Chem* 82(3):1133-1137.
- Bonnefond A, Clement N, Fawcett K, Yengo L, Vaillant E, Guillaume JL, Dechaume A, Payne F, Roussel R, Czernichow S, Hercberg S, Hadjadj S, Balkau B, Marre M, Lantieri O, Langenberg C, Bouatia-Naji N, Charpentier G, Vaxillaire M, Rocheleau G, Wareham NJ, Sladek R, McCarthy MI, Dina C, Barroso I, Jockers R & Froguel P (2012) Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* 44(3):297-301.
- Bonnefont-Rousselot D & Collin F (2010) Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 278(1):55-67.
- Bottalico JN (2007) Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications. *Semin Perinatol* 31(3):176-184.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chevre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruukonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jorgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Levy-Marchal C, Pattou F, Meyre D,

- Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O & Froguel P (2009) A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41(1):89-94.
- Brauer R, Wang LC, Woon ST, Bridewell DJ, Henare K, Malinger D, Palmer BD, Vogel SN, Kieda C, Tijono SM & Ching LM (2010) Labeling of Oxidizable Proteins with a Photoactivatable Analog of the Antitumor Agent DMXAA: Evidence for Redox Signaling in Its Mode of Action. *Neoplasia* 12(9):755-765.
- Bromme HJ, Morke W, Peschke D & Ebel H (2000) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 29(4):201-208.
- Burton GJ & Jauniaux E (2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11(6):342-352.
- Burton GJ & Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25(3):287-299.
- Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N & Ustundag N (2003) Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 35(3):212-220.
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M & Post M (2000) Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 105(5):577-587.
- Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF & Becker-Andre M (1994) RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 8(6):757-770.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ & Reiter RJ (2005) A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27(2):189-200.
- Casarett LJ, Doull J & Curtis KD (2001) *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. 1310 p

- Castellucci M & Kaufmann P (2006) Basic structure of the villous trees. *Pathology of the human placenta*, Benirschke K, Kaufmann P & Baergen R (Édit.) Springer, New York.
- Castellucci M, Kaufmann P & Bischof P (1990) Extracellular matrix influences hormone and protein production by human chorionic villi. *Cell Tissue Res* 262(1):135-142.
- Centlow M, Junus K, Nystrom H, May K, Larsson I, Olsson MG, Akerstrom B, Sager R, Schneider H & Hansson SR (2009) Perfusion of the human placenta with red blood cells and xanthine oxidase mimics preeclampsia in-vitro. *Z Geburtshilfe Neonatol* 213(3):89-95.
- Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N & Agarwal N (2003) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol* 47(4):441-446.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C & Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101(8):2449-2476.
- Choi SI, Dadakhujaev S, Ryu H, Im Kim T & Kim EK (2011) Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors. *J Pineal Res*.
- Cillard J & Cillard P (2006) Mécanisme de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *John Libbey Eurotext* 13:24-29.
- Cindrova-Davies T (2009) Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta* 30 Suppl A:S55-65.
- Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol* 170(5):1511-1520.

- Claustrat B, Brun J & Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews* 9(1):11-24.
- Colantuoni A, Longoni B & Marchiafava PL (2002) Retinal photoreceptors of Syrian hamsters undergo oxidative stress during streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 45(1):121-124.
- Cos S, Fernandez R, Guezmes A & Sanchez-Barcelo EJ (1998) Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research* 58(19):4383-4390.
- Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM & Rice GE (2004) Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 25(1):78-84.
- Crocker IP, Strachan BK, Lash GE, Cooper S, Warren AY & Baker PN (2001) Vascular endothelial growth factor but not placental growth factor promotes trophoblast syncytialization in vitro. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 8(6):341-346.
- Crocker IP, Tansinda DM, Jones CJ & Baker PN (2004) The influence of oxygen and tumor necrosis factor-alpha on the cellular kinetics of term placental villous explants in culture. *J Histochem Cytochem* 52(6):749-757.
- Cronier L, Alsat E, Hervé J, Delèze J & Malassiné A (1998) Dexamethasone stimulates Gap junctional communication peptide hormone production and differentiation in human term trophoblast. *Trophoblast Research* 11:35-49.
- Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J & Malassine A (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135(1):402-408.
- Cronier L, Dubut A, Guibourdenche J & Malassine A (1999a) Effects of endothelin on villous trophoblast differentiation and free intracellular calcium. *Trophoblast Research* 13:69-86.

- Cronier L, Guibourdenche J, Niger C & Malassine A (1999b) Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 20(8):669-676.
- D'Elia JA, Bayliss G, Roshan B, Maski M, Gleason RE & Weinrauch LA (2011) Diabetic microvascular complications: possible targets for improved macrovascular outcomes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 4:1-15.
- Dai J, Ram PT, Yuan L, Spriggs LL & Hill SM (2001) Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin. *Mol Cell Endocrinol* 176(1-2):111-120.
- Derlacz RA, Poplawski P, Napierala M, Jagielski AK & Bryla J (2005) Melatonin-induced modulation of glucose metabolism in primary cultures of rabbit kidney-cortex tubules. *J Pineal Res* 38(3):164-169.
- Dubocovich ML (1995) Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16(2):50-56.
- Edeas M, Attaf D, Mailfert AS, Nasu M & Joubet R (2009) Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol Biol (Paris)* 58(3):220-225.
- Ekmekcioglu C (2006) Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 60(3):97-108.
- Esterman A, Greco MA, Mitani Y, Finlay TH, Ismail-Beigi F & Dancis J (1997) The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* 18(2-3):129-136.
- Fernandez-Bachiller MI, Perez C, Campillo NE, Paez JA, Gonzalez-Munoz GC, Usan P, Garcia-Palomero E, Lopez MG, Villarroja M, Garcia AG, Martinez A & Rodriguez-Franco MI (2009) Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *ChemMedChem* 4(5):828-841.
- Figuerola-Quevedo A & Agil A (2011) Changes in plasma's oxidative stress and antioxidant activity, measured with melatonin levels, and its relationship to newborns from obese and diabetic pregnancies. *J Diabetes Metab* S4:002-012.

- Figuerola R, Martinez E, Fayngersh RP, Tejani N, Mohazzab HK & Wolin MS (2000) Alterations in relaxation to lactate and H(2)O(2) in human placental vessels from gestational diabetic pregnancies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(3):H706-713.
- Figuerola R, Omar HA, Tejani N & Wolin MS (1993) Gestational diabetes alters human placental vascular responses to changes in oxygen tension. *Am J Obstet Gynecol* 168(5):1616-1622.
- Fukutomi J, Fukuda A, Fukuda S, Hara M, Terada A & Yoshida M (2006) Scavenging activity of indole compounds against cisplatin-induced reactive oxygen species. *Life Sci* 80(3):254-257.
- Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR & Guilbert LJ (1994) Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Experimental cell research* 214(1):46-54.
- Giguere V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine reviews* 20(5):689-725.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E & Offen D (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 251(3):261-268.
- Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I & Reiter RJ (2009) Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res* 46(2):128-139.
- Granger DN, Hollwarth ME & Parks DA (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 548:47-63.
- Grissa O, Ategbo JM, Yessoufou A, Tabka Z, Miled A, Jerbi M, Dramane KL, Moutairou K, Prost J, Hichami A & Khan NA (2007) Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. *Transl Res* 150(3):164-171.

- Guney M, Erdemoglu E & Mungan T (2011) Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. *Biol Trace Elem Res* 143(2):1091-1102.
- Haddad JJ (2002) Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 14(11):879-897.
- Hardeland R, Tan DX & Reiter RJ (2009) Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 47(2):109-126.
- He T, Joyner MJ & Katusic ZS (2009) Aging decreases expression and activity of glutathione peroxidase-1 in human endothelial progenitor cells. *Microvasc Res* 78(3):447-452.
- Heazell AE, Lacey HA, Jones CJ, Huppertz B, Baker PN & Crocker IP (2008) Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta* 29(2):175-186.
- Hubel C, Roberts J, Taylor R, Musci T, Rogers G & McLaughlin M (1989) Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 161:1025-1034.
- Huether G (1993) The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49(8):665-670.
- Hung TH & Burton GJ (2006a) Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45(3):189-200.
- Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Li MJ, Yeh YL, Chen SF & Hsieh TT (2006b) A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci* 17(4):401-409.
- Hung TH, Skepper JN & Burton GJ (2001) In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol* 159(3):1031-1043.

- Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2002) Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 90(12):1274-1281.
- Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H & Kaufmann P (1999) Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 79(12):1687-1702.
- Hussain SA, Khadim HM, Khalaf BH, Ismail SH, Hussein KI & Sahib AS (2006) Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. *Saudi Med J* 27(10):1483-1488.
- Jackson MJ (2009) Skeletal muscle aging: role of reactive oxygen species. *Crit Care Med* 37(10 Suppl):S368-371.
- Jauniaux E, Jurkovic D & Campbell S (1995) Current topic: in vivo investigation of the placental circulations by Doppler echography. *Placenta* 16(4):323-331.
- Jauniaux E, Ramsay B & Campbell S (1994) Ultrasonographic investigation of placental morphologic characteristics and size during the second trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170(1 Pt 1):130-137.
- Jetten AM (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 7:e003.
- Jou MJ, Peng TI, Hsu LF, Jou SB, Reiter RJ, Yang CM, Chiao CC, Lin YF & Chen CC (2010) Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 48(1):20-38.
- Kadhim HM, Ismail SH, Hussein KI, Bakir IH, Sahib AS, Khalaf BH & Hussain SA (2006) Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. *J Pineal Res* 41(2):189-193.

- Karabulut AB, Kafkasli A, Burak F & Gozukara EM (2005) Maternal and fetal plasma adenosine deaminase, xanthine oxidase and malondialdehyde levels in pre-eclampsia. *Cell Biochem Funct* 23(4):279-283.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K & Evain-Brion D (1998) Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *Journal of cell science* 111 (Pt 7):995-1004.
- Kim JY, Cheong HS, Park BL, Baik SH, Park S, Lee SW, Kim MH, Chung JH, Choi JS, Kim MY, Yang JH, Cho DH, Shin HD & Kim SH (2011) Melatonin receptor 1 B polymorphisms associated with the risk of gestational diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 12:82.
- Kivela A (1991) Serum melatonin during human pregnancy. *Acta endocrinologica* 124(3):233-237.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM & Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52:307-357; discussion 357-308.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM & Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118(4):1567-1582.
- Koechlin-Ramonatxo C (2006) Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases *Nutrition Clinique et Métabolisme* 20(4):165-177.
- Korkmaz A, Tamura H, Manchester LC, Ogden GB, Tan DX & Reiter RJ (2009a) Combination of melatonin and a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist induces apoptosis in a breast cancer cell line. *J Pineal Res* 46(1):115-116.

- Korkmaz A, Topal T, Tan DX & Reiter RJ (2009b) Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 10(4):261-270.
- Lagod L, Paszkowski T, Sikorski R & Rola R (2001) [The antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion]. *Ginekol Pol* 72(12):1073-1078.
- Lanoix D (2013) *Effet protecteur de la mélatonine sur l'homéostasie du trophoblaste villositaire : implications dans la grossesse normale et compliquée par la prééclampsie* Philosophiae Doctor (INRS-Institut Armand-Frappier, Montréal). 290 p
- Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J & Vaillancourt C (2008) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res* 45(1):50-60.
- Lanoix D, Guérin P & Vaillancourt C (2012a) Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. *Journal of Pineal Research* 53(4):417-425.
- Lanoix D, Haché S, Dubé E, Lafond J & Vaillancourt C (2012b) Placental Disorders in Preeclampsia: Maternal and Perinatal Outcomes. in *Pregnancy Disorders and Perinatal Outcomes*, Édité Lafond J & Vaillancourt C (Bentham Science Publishers, Sharjah), p 97-128.
- Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ & Vaillancourt C (2012c) Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol* 348(1):1-11.
- Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J & Vaillancourt C (2012d) Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Mol Biotechnol* 52(3):234-243.
- Lanoix D, Ouellette R & Vaillancourt C (2006) Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum Reprod* 21(8):1981-1989.
- Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S & Jawerbaum A (2011) The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 15(12):3061-3100.

- Lappas M, Mitton A & Permezel M (2010) In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *J Endocrinol* 204(1):75-84.
- Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS & Kang SG (1999) Effects of dopamine and melatonin on the regulation of the PIT-1 isotype, placental growth hormone and lactogen gene expressions in the rat placenta. *Molecules and cells* 9(6):646-651.
- Lee CK, Moon DH, Shin CS, Kim H, Yoon YD, Kang HS, Lee BJ & Kang SG (2003) Circadian expression of Mel1a and PL-II genes in placenta: effects of melatonin on the PL-II gene expression in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 200(1-2):57-66.
- Leisser C, Saleh L, Haider S, Husslein H, Sonderegger S & Knofler M (2006) Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Molecular Human Reproduction* 12(10):601-609.
- Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y & Nelson DM (2000) Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(5):C982-988.
- Lew GM (1987) Morphological and biochemical changes in the pineal gland in pregnancy. *Life Sci* 41(24):2589-2596.
- Li HP, Chen X & Li MQ (2013) Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int J Clin Exp Pathol* 6(4):650-659.
- Ling Y, Li X, Gu Q, Chen H, Lu D & Gao X (2011) A common polymorphism rs3781637 in MTNR1B is associated with type 2 diabetes and lipids levels in Han Chinese individuals. *Cardiovasc Diabetol* 10:27.
- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spegel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM,

- Mulder H & Groop L (2009) Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41(1):82-88.
- Madonna R & De Caterina R (2011) Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part II: cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascul Pharmacol* 54(3-6):75-79.
- Malassiné A, Tarrade A, Guibourdenche J, Rochette-Égly C & Évain-Brion D (2000) Le placenta. *Médecine-Science* 16:329-335.
- Manda K & Reiter RJ (2010) Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Prog Neurobiol* 90(1):60-68.
- Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM & Zhou Y (2000) Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 156(1):321-331.
- Many A, Hubel CA & Roberts JM (1996a) Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol* 174(1 Pt 1):288-291.
- Many A, Westerhausen-Larson A, Kanbour-Shakir A & Roberts JM (1996b) Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta* 17(5-6):361-365.
- Marseille-Tremblay C, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguere Y, Masse A, Mounier C & Lafond J (2008) Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Mol Reprod Dev* 75(6):1054-1062.
- Matsunami T, Sato Y, Sato T, Ariga S, Shimomura T & Yukawa M (2009) Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol* 3(2):177-188.
- Matsuzawa A & Ichijo H (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):472-481.
- Matuszak Z, Reszka K & Chignell CF (1997) Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic Biol Med* 23(3):367-372.

- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312(3):159-163.
- McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, Hu FB & Forman JP (2013) Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA* 309(13):1388-1396.
- Menveille-Bourg FJ (2005) La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie* 3:118-121.
- Milczarek R, Hallmann A, Sokolowska E, Kaletha K & Klimek J (2010) Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J Pineal Res* 49(2):149-155.
- Mitanchez D (2010) [Fetal and neonatal complications of gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal outcomes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 39(8 Suppl 2):S189-199.
- Mitchell MD, Bibby JG, Sayers L, Anderson AB & Turnbull AC (1979) Melatonin in the maternal and umbilical circulations during human parturition. *Br J Obstet Gynaecol* 86(1):29-31.
- Montilla PL, Vargas JF, Tunez IF, Munoz de Agueda MC, Valdelvira ME & Cabrera ES (1998) Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 25(2):94-100.
- Morrish DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H & Siy O (1987) Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 65(6):1282-1290.
- Muhlbauer E & Peschke E (2007) Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42(1):105-106.

- Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I & Lyall F (1996) Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* 28(3):488-493.
- Nagi MN, Mansour MA, Al-Shabanah OA & El-Kashef HA (2002) Melatonin inhibits the contractile effect of vanadate in the isolated pulmonary arterial rings of rats: possible role of hydrogen peroxide. *J Biochem Mol Toxicol* 16(6):273-278.
- Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube AS, N. & Kato H (2001) Change of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J Pineal Res* 301:29-33.
- Nakazawa K, Kanakura Y, Kometani K, Iwasaki S & Yosimura Y (1999) Study on melatonin in human and rat placental tissue. *Trophoblast Research* 13:467-474.
- Nelson DM, Johnson RD, Smith SD, Anteby EY & Sadovsky Y (1999) Hypoxia limits differentiation and up-regulates expression and activity of prostaglandin H synthase 2 in cultured trophoblast from term human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 180(4):896-902.
- Niles LP, Armstrong KJ, Rincon Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, Doering LC & Kirkham DL (2004) Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neurosci* 5:41.
- Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Mizushima J, Hori H, Iwasaki T, Ichimori K & Nakazawa H (1997) Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem Soc Trans* 25(3):783-786.
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangre P, Canet E & Boutin JA (2001) Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 61(11):1369-1379.
- Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S & Sagara Y (1998) Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 25(3):129-134.

- Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara K, Taniguchi K & Fukaya T (2001) Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. *J Pineal Res* 31(2):173-178.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B & Hardeland R (2006) Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273(13):2813-2838.
- Paredes SD, Marchena AM, Bejarano I, Espino J, Barriga C, Rial RV, Reiter RJ & Rodriguez AB (2009) Melatonin and tryptophan affect the activity-rest rhythm, core and peripheral temperatures, and interleukin levels in the ringdove: changes with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64(3):340-350.
- Paskaloglu K, Sener G & Ayangolu-Dulger G (2004) Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 499(3):345-354.
- Peschke E, Bach AG & Muhlbauer E (2006a) Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40(2):184-191.
- Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R & Muhlbauer E (2006b) Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40(2):135-143.
- Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, Leng JJ & Gin H (2004) Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 37(4):293-298.
- Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva

- V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orru M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB & Abecasis GR (2009) Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41(1):77-81.
- Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrance P, Renard P, Casteilla L & Penicaud L (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144(12):5347-5352.
- Qiu C, Hevner K, Abetew D, Enquobahrie DA & Williams MA (2011) Oxidative DNA damage in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: A pilot study. *Clin Biochem* 44(10-11):804-808.
- Querfurth HW & LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362(4):329-344.
- Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P & Hauguel-de Mouzon S (2003) Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 52(12):2951-2958.
- Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L & Hill SM (2002) Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 179(2):141-150.
- Redman CW & Sargent IL (2000) Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 21(7):597-602.

- Reichlin S (1998) Neuroendocrinology. *Williams textbook of endocrinology*, Larsen P, Wilson I & Kronenberg H (Édit.) Saunders, Philadelphia.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W & Tan DX (2000) Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917:376-386.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC & Sainz RM (2009) Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 81(3):445-456.
- Renzing J, Hansen S & Lane DP (1996) Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J Cell Sci* 109 (Pt 5):1105-1112.
- Reppert SM, Weaver DR & Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17(3):100-102.
- Reyes-Toso CF, Linares LM, Ricci CR, Aran M, Pinto JE, Rodriguez RR & Cardinali DP (2004) Effect of melatonin on vascular reactivity in pancreatectomized rats. *Life Sci* 74(25):3085-3092.
- Richter HG, Hansell JA, Raut S & Giussani DA (2009) Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *J Pineal Res* 46(4):357-364.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V & Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36(1):1-9.
- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Leon J, Manchester L & Reiter RJ (2005) Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *The Prostate* 63(1):29-43.
- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Lopez-Burillo S, Natarajan M & Reiter RJ (2003) Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 302(3):625-634.

- Sainz RM, Reiter RJ, Mayo JC, Cabrera J, Tan DX, Qi W & Garcia JJ (2000) Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *J Reprod Fertil* 119(1):143-149.
- Salem AH, Nosseir NS, El Badawi MG, Shoair MI & Fadel RA (2010) Growth assessment of diabetic rat fetuses under the influence of insulin and melatonin: a morphologic study. *Anthropol Anz* 68(2):129-138.
- Sallinen P, Manttari S, Leskinen H, Ilves M, Vakkuri O, Ruskoaho H & Saarela S (2007) The effect of myocardial infarction on the synthesis, concentration and receptor expression of endogenous melatonin. *J Pineal Res* 42(3):254-260.
- Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX & Reiter RJ (2010) Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem* 17(19):2070-2095.
- Shi QJ, Lei ZM, Rao CV & Lin J (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132(3):1387-1395.
- Shiu SY, Xi SC, Xu JN, Mei L, Pang SF, Yao KM & Wong JT (2000) Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation in vitro and in vivo by melatonin. *Life Sci* 67(17):2059-2074.
- Shyy W, Wang K, Gurnett CA, Dobbs MB, Miller NH, Wise C, Sheffield VC & Morcuende JA (2010) Evaluation of GPR50, hMel-1B, and ROR-alpha melatonin-related receptors and the etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* 30(6):539-543.
- Siega-Riz AM & Laraia B (2006) The implications of maternal overweight and obesity on the course of pregnancy and birth outcomes. *Matern Child Health J* 10(5 Suppl):S153-156.
- Simpson JL, Elias S, Martin AO, Palmer MS, Ogata ES & Radvany RA (1983) Diabetes in pregnancy, Northwestern University series (1977-1981). I. Prospective study of anomalies in offspring of mothers with diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 146(3):263-270.
- Smirnov AN (2001) Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry* 66(1):19-26.

- Sofic E, Rimpapa Z, Kundurovic Z, Sapcanin A, Tahirovic I, Rustembegovic A & Cao G (2005) Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm* 112(3):349-358.
- Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaia SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryszewska M, Reiter RJ & Zavodnik IB (2007) Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol* 569(3):180-187.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S & Konishi I (2004) Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 444(1):49-55.
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, Sugino N & Reiter RJ (2008) Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol* 25(3):291-303.
- Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD & Reiter RJ (2011) Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev* 12(3):167-188.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ & Plummer BF (1999) Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals Recept* 8(1-2):70-74.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ & Plummer BF (1999) Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals Recept* 8(1-2):70-74.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi & Shepherd AM (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochemical and biophysical research communications* 253(3):614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi & Shepherd AM (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a

- biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochemical and biophysical research communications* 253(3):614-620.
- Tastsaris V, Malassin. A, LeBellgo F, Daoud G & Lafond J (2006) Placenta humain *EMC*:22.
- Telfer JF, Thomson AJ, Cameron IT, Greer IA & Norman JE (1997) Expression of superoxide dismutase and xanthine oxidase in myometrium, fetal membranes and placenta during normal human pregnancy and parturition. *Hum Reprod* 12(10):2306-2312.
- Tomas-Zapico C & Coto-Montes A (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39(2):99-104.
- Turkoz Y, Celik O, Hascalik S, Cigremis Y, Hascalik M, Mizrak B & Yologlu S (2004) Melatonin reduces torsion-detorsion injury in rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pineal Res* 37(2):137-141.
- Unger RH, Clark GO, Scherer PE & Orci L (2010) Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801(3):209-214.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P & Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology* 7(1):65-74.
- Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G & Lafond J (2009) Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev Med Chem* 9(8):962-973.
- Valko M, Morris H & Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12(10):1161-1208.
- Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A & Mastorakos G (2006) Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092:138-147.
- Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K & Fukaya T (2001) Melatonin protects against oxidized low-density lipoprotein-induced inhibition of nitric oxide production in human umbilical artery. *J Pineal Res* 31(3):281-288.

- Wang Y & Walsh SW (2001) Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 22(2-3):206-212.
- Wehr TA (1997) Melatonin and seasonal rhythms. *J Biol Rhythms* 12(6):518-527.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M & Carlberg C (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 23(3):327-333.
- Wurtman RJ & Axelrod J (1968) The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin. *Adv Pharmacol* 6(Pt A):141-151.
- Yavuz O, Cam M, Bukan N, Guven A & Silan F (2003) Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta Histochem* 105(3):261-266.
- Yerer MK, M.D.P. AD, Aydoğané S & Garcia-Palmer F-J (2010) Regulation of MT1 and MT2 Receptors in Pineal Gland with Light/Dark Cycle: A Novel Approach. *Turk J Biochem* 35(3):256-261.
- Yildirim A, Altinkaynak K, Aksoy H, Sahin YN & Akcay F (2004) Plasma xanthine oxidase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities and uric acid levels in severe and mild pre-eclampsia. *Cell Biochem Funct* 22(4):213-217.
- Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y & Nelson DM (2002) Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatr Res* 52(3):411-415.
- Zhou J, Zhang S, Zhao X & Wei T (2008) Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-beta1-42. *J Pineal Res* 45(2):157-165.