

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Centre Armand-Frappier Santé-Biotechnologie

**EFFET ANTI-TUMORAL DE LA MÉLATONINE DANS LE  
CHORIOCARCINOME PLACENTAIRE HUMAIN : RÔLE DU STRESS  
OXYDATIF ET DE L'ACTIVITÉ MITOCHONDRIALE**

Par

Fatma Kharrat

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
*Magister Scientiæ*, MSc.

Maîtrise en sciences expérimentales de la santé

**Jury d'évaluation**

**Cathy Vaillancourt** : Directrice de recherche  
INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Jacques Bernier** : Président du jury et examinateur interne  
INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Éric Asselin** : Examineur externe  
Université du Québec à Trois-Rivières

Mars 2020

© Fatma Kharrat, 2020

## **REMERCIEMENTS**

Ce mémoire est la conclusion d'une étape importante et tellement enrichissante dans ma vie. Il est le fruit d'efforts multiples de plusieurs personnes, dont particulièrement :

Ma chère professeure, Pr. Cathy Vaillancourt, que je remercie particulièrement pour m'avoir permis de réaliser ce projet et de le réussir ainsi que de m'avoir accordé la chance de faire preuve de mes compétences et de mon dévouement pour la recherche. Je la remercie pour sa patience, son humanité incomparable, ses encouragements et sa grande compréhension. Je veux aussi souligner mon grand estime pour sa grande curiosité et sa passion qui lui ont sans doute permis de laisser son empreinte dans le domaine de la reproduction et du placenta en particulier.

J'aimerais remercier aussi les membres de mon comité d'évaluation pour leur contribution à la réussite de ce travail et de m'avoir accordé de leur temps précieux afin de l'examiner.

Je tiens également à remercier mes collègues, les anciens membres du laboratoire comme les nouveaux. Josianne en particulier, qui est devenue une amie précieuse plutôt qu'une simple collègue. Je la remercie pour son grand soutien, son temps et son aide précieuse à réaliser ce projet. Sans oublier Guillaume, l'intrus du groupe qui a réussi à décrocher sa place parmi nous, Joey et son 'humour', la courageuse Linda, le bosseur Lucas et l'encyclopédie Morgane ainsi que tous les membres de l'institut.

Je dédie ce travail à mon exemple, mon cher père Yahya, qui a toujours cru en moi et qui m'apporte sans cesse tout l'amour, le courage et le soutien du monde. À ma mère Salma, pour ses encouragements et la passion qu'elle m'a transmise pour la science, à mon cher frère Mohamed et mes deux petits anges.

Merci beaucoup!

## RÉSUMÉ

Le choriocarcinome placentaire est une tumeur trophoblastique rare, mais hautement métastatique. La mélatonine exerce un puissant pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral. Les travaux de notre équipe ont montré que la mélatonine induit la mort de la lignée de choriocarcinome placentaire, BeWo, mais le mécanisme cellulaire n'a jamais été étudié. **Hypothèse et objectifs** : L'hypothèse de recherche de ce mémoire est que la mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules de choriocarcinome placentaire humaines entraînant des dommages cellulaires et mitochondriaux. Les objectifs spécifiques sont : de déterminer dans la lignée cellulaire de choriocarcinome placentaire humaines BeWo si la mélatonine (1) augmente les niveaux de stress oxydatif : les niveaux des espèces réactives de l'oxygène (EROs) cellulaires et l'expression de l'enzyme pro-oxydante xanthine oxydase (XO) et diminue l'expression des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase (SOD), glutathionne peroxydase (GPx) et la catalase (CAT)); (2) augmente la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines et (3) augmente la respiration mitochondriale. **Méthodologie** : Les cellules BeWo ont été cultivées en conditions de normoxie (8 % O<sub>2</sub>), ou dans des conditions d'hypoxie/réoxygénation (H/R), 4 h d'hypoxie (0,5 % O<sub>2</sub>) puis 20 h de normoxie (contrôle positif de stress oxydatif). Les cellules BeWo ont été traitées avec différentes concentrations de mélatonine (0, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> ou 10<sup>-9</sup> M) pendant 24h. Les niveaux d'EROs ont été analysés par la méthode Carboxy-H2DCFDA. L'expression protéique des enzymes pro- et anti-oxydantes a été analysée par immunobuvardage de type Western. La mesure de la peroxydation des lipides, ta été réalisée par le test de l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la carbonylation par spectrofluorimétrie. L'activité mitochondriale des cellules BeWo a été déterminée à l'aide de la technologie Seahorse XF96. **Résultats** : La mélatonine à 1 mM augmente significativement le taux des EROs en normoxie ( $P \leq 0,01$ ) et en H/R ( $P \leq 0,1$ ). Les taux protéiques de XO, sont aussi augmentés par la mélatonine en normoxie, ainsi que les taux de SOD2 (1nM;  $P \leq 0,05$ ), de la GPx (1µM;  $P \leq 0,05$ ) et de la CAT (1µM;  $P \leq 0,05$ ) en comparaison avec le véhicule contrôle. La mélatonine a également augmenté significativement la carbonylation des protéines, mais aucune différence n'a été observée au niveau de la peroxydation des lipides. Les résultats du Seahorse XF96 montrent que la mélatonine, augmente la respiration mitochondriale maximale, mimant les effets de la

H/R. Ces résultats montrent que la mélatonine augmente le stress oxydatif dans la lignée de choriocarcinome placentaire BeWo. Cette étude suggère alors que l'action anti-tumorale de la mélatonine dans les cellules BeWo est médiée par son effet pro-oxydant.

Mots clés: Mélatonine; stress oxydatif; choriocarcinome placentaire; enzymes pro- et anti-oxydantes; dommages oxydatifs; mitochondrie.

## ABSTRACT

Placental choriocarcinoma is a rare but highly metastatic trophoblastic tumor. Melatonin is produced by placental trophoblastic cells which express its receptors. It acts as a powerful antioxidant preventing oxidative stress-induced damages in cytotrophoblasts. Our previous studies demonstrated that this indolamine induces cell death in placental choriocarcinoma. However, the mechanism behind this action is yet unknown. **Hypothesis and objectives:** We hypothesize that melatonin increases oxidative stress in choriocarcinoma cells to stimulate intrinsic apoptosis. Our objectives are to determine in a human choriocarcinoma cell line, BeWo , (1) if melatonin increases oxidative stress: Reactive Oxygen Species (ROS), the prooxidant enzyme xanthine oxydase (XO) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase 1 (SOD1), Glutathion peroxidase (GPx) and catalase (CAT)) protein expression levels; (2) increases lipid peroxidation and protein carbonylation and (3) increases mitochondrial respiration. **Methodology:** BeWo cells underwent normoxia (8% O<sub>2</sub>) or hypoxia (0,5% O<sub>2</sub>) followed by reoxygenation (8% O<sub>2</sub>) (H/R), with or without melatonin (0-1mM). We first measured Reactive Oxygen Species (ROS) levels with the general oxidative stress indicator Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA, as well as the levels of reduced glutathione (GSH) with monochlorobimane (mCB). Then, we studied the protein expression of pro-oxidant (XO) and antioxidant enzymes (SOD), (GPx) and (CAT) using Western blot. Levels of lipid peroxidation were investigated with Thiobarbituric Assay Test (TBARS) and protein carbonyl content by spectrofluorimetry. Last, we measured mitochondrial activity with Seahorse XF96. **Results:** Melatonin significantly increase ROS levels in BeWo cells under normoxia ( $P \leq 0,01$ ) and under H/R ( $P \leq 0,1$ ) at 1mM concentration. The main ROS generator, XO, demonstrated also an increased expression with melatonin in normoxic condition, just as SODs (1nM;  $P \leq 0,05$ ), GPx (1 $\mu$ M;  $P \leq 0,05$ ) and CAT (1 $\mu$ M;  $P \leq 0,05$ ) expressions, miming H/R effect. Treating with different melatonin concentrations resulted also in an increase of lipid peroxidation and protein carbonylation levels in BeWo cells under normoxia. However, this increase was not detected in H/R condition, where melatonin seemed not having any effect on none of the tests.

Our data confirmed that melatonin increases oxidative stress and its major hallmarks in tumoral choriocarcinoma cells. Nevertheless, further research is needed to elucidate its exact anti-tumoral mechanism.

Key words: Melatonin; oxidative stress; choriocarcinoma; pro- and anti-oxidants enzymes; oxidative damage; mitochondria.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS _____	2
RÉSUMÉ _____	3
ABSTRACT _____	5
LISTE DES TABLEAUX _____	10
LISTE DES FIGURES _____	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS _____	13
ÉTAT DES CONNAISSANCES _____	18
1.1 Placenta humain _____	18
_____	19
1.1.2 Le Choriocarcinome Placentaire _____	19
1.2 LE STRESS OXYDATIF _____	21
1.2.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) et de l'Azote (ERAs) et radicaux libres _____	22
1.2.2 Enzymes pro-oxydantes _____	25
1.2.3 Défenses antioxydantes _____	26
1.2.3.1 Enzymes antioxydantes _____	27
1.2.3.2 Autres antioxydants _____	29
1.2.4 Stress oxydatif et mitochondrie _____	31
1.2.5 Stress oxydatif et cancer _____	33
1.2.6 Dommages du stress oxydatif _____	34
1.2.6.1 Peroxydation des lipides _____	35
1.2.6.2 Carbonylation et nitration des protéines _____	35
1.2.5.3 Oxydation et fragmentation de l'ADN _____	36
1.2.6 Stress oxydatif, grossesse et placenta _____	37
1.3 LA MÉLATONINE _____	39
1.3.1 Récepteurs de la mélatonine _____	40
1.3.2 Rôles non-circadiens de la mélatonine _____	41
1.3.2.1 La mélatonine antioxydante _____	41
1.3.2.1.1 Action directe ou récepteur-indépendant de la mélatonine _____	43

1.3.2.1.2 Action indirecte ou récepteur-dépendant de la mélatonine _____	44
1.3.2.2 La mélatonine pro-oxydante _____	45
1.3.2.3 Mélatonine et cancer _____	47
1.3.3 Mélatonine et mitochondrie _____	49
1.3.4 Mélatonine et stress oxydatif dans le système reproducteur _____	50
1.3.4.1 Mélatonine, grossesse et placenta _____	50
2. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS _____	54
2.1 Problématique _____	54
2.2 Hypothèse _____	54
2.3 Objectifs spécifiques _____	55
3. MÉTHODOLOGIE _____	56
3.1 Culture cellulaire _____	56
3.2 Analyse des niveaux des Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) _____	56
3.3 Mesure des niveaux cellulaires du Glutathion (GSH) réduit _____	57
3.4 Analyse des niveaux protéiques des enzymes pro- et anti-oxydantes par immunobuvardage de type Western _____	57
3.5 Analyse de la peroxydation des lipides _____	58
3.6 Mesure de la carbonylation des protéines _____	59
3.7 Évaluation de la respiration mitochondriale _____	60
3.8 Analyses statistiques _____	62
4. RÉSULTATS _____	63
4.1 La mélatonine augmente les niveaux de radicaux libres dans les cellules BeWo _____	63
4.2 La mélatonine mime les effets de l'H/R au niveau de l'expression des enzymes antioxydantes dans les cellules BeWo _____	66
4.3 Le traitement à la mélatonine cause des dommages cellulaires au niveau des cellules BeWo _____	67
4.4 Le traitement à la mélatonine augmente la respiration mitochondriale au niveau des cellules BeWo _____	69
4. DISCUSSION _____	71
5.1 La mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules BeWo _____	71
5.2 Action anti-tumorale de la mélatonine dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo par une augmentation du stress oxydatif _____	75
5.3 L'augmentation du stress oxydatif par la mélatonine induit des dommages cellulaires dans les cellules BeWo _____	78

5.4 L'induction du stress oxydatif par la mélatonine est associée à une augmentation de la respiration mitochondriale dans les cellules tumorales BeWo	79
5.5 L'effet Warburg, cellules tumorales et mélatonine	81
5.6 La mélatonine comme 'adjuvant' à la radiothérapie et la chimiothérapie?	84
6. CONCLUSION:	85
7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES :	86
8. RÉFÉRENCES:	88

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** : Effet pro-oxydant de la mélatonine\_\_\_\_\_ **46**

**Tableau 2.** : Anticorps utilisés pour l'immunobuvardage de type Western et les différentes concentrations utilisées\_\_\_\_\_ **58**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique de la villosité chorale placentaire	19
<b>Figure 2.</b> Oxydants et défenses antioxydantes endogènes	24
<b>Figure 3.</b> Formation des espèces réactives de l'oxygène par la xanthine oxydase (XO)	26
<b>Figure 4.</b> Réaction de la superoxyde dismutase 2 (SOD <sub>2</sub> )	27
<b>Figure 5.</b> Réaction de la Glutathion Peroxydase (GPx)	28
<b>Figure 6.</b> Réaction de la catalase (CAT)	29
<b>Figure 7.</b> Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes.	30
<b>Figure 8.</b> Chaîne respiratoire mitochondriale et génération des EROs	32
<b>Figure 9.</b> Comparaison de la villosité chorale d'une grossesse normale et d'une grossesse compliquée par une pré-éclampsie	38
<b>Figure 10.</b> Structure chimique de la mélatonine (C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	40
<b>Figure 11.</b> Cascade antioxydante de la mélatonine	42
<b>Figure 12.</b> Voies de signalisation modulées par la mélatonine et ses récepteurs. Voies de signalisation modulées par la mélatonine et ses récepteur	44
<b>Figure 13.</b> Mesure de la carbonylation des protéines	60
<b>Figure 14.</b> Fonctionnement de la méthode Seahorse de Agilent	61
<b>Figure 15.</b> La mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo	64
<b>Figure 16.</b> La mélatonine, tout comme l'H/R et le TBHP, diminue les niveaux intracellulaires de glutathion réduit, un dans les cellules BeWo	65

<b>Figure 17.</b> La mélatonine augmente les niveaux d'expression protéiques des enzymes antioxydantes dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo _____	<b>67</b>
<b>Figure 18.</b> L'effet de la mélatonine sur la peroxydation des lipides au niveau des cellules BeWo _____	<b>68</b>
<b>Figure 19.</b> La mélatonine augmente la carbonylation des protéines dans les cellules BeWo _____	<b>69</b>
<b>Figure 20.</b> La mélatonine augmente la respiration mitochondriale dans les cellules BeWo _____	<b>70</b>
<b>Figure 21.</b> Exemple de chambre incubatrice à concentration de gaz régulée _____	<b>75</b>
<b>Figure 22.</b> Hypothèse de la cascade de signalisation de production d'EROs par la mélatonine _____	<b>76</b>
<b>Figure 23.</b> La mélatonine agit différemment dans les cellules placentaires normales et tumorales _____	<b>77</b>
<b>Figure 24.</b> Métabolisme du glucose dans les cellules saines versus cancéreuses _____	<b>82</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide arachidonique

AANAT : Aralkylamine N-acétyltransférase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt: ADN mitochondrial

AFMK : N<sup>1</sup>-acétyle-N<sup>2</sup>-formyl-5-méthoxykynuramine

AGE: Advanced glycation end products

AMK : N<sup>1</sup>-acétyle-5-méthoxykynuramine

AMP: Adénosine Monophosphate

AMPC : Adénosine Monophosphate Cyclique

ALE: advanced lipoxidation end products

ATP: Adénosine triphosphate

ARN: Acide ribonucléique

BCA: Acide bicinconinique

CAT: Catalase

ClO<sup>-</sup> : Anion hypochloreux

COX: Cyclooxygénase

CP : Choriocarcinome placentaire

CTBv : Cytotrophoblaste villeux

CTBev : Cytotrophoblaste extravilleux

CTE : Chaîne de transport d'électrons

CytP450: Cytochrome P450

DMEM-HG: *Dulbeco's modified eagle medium – High glucose*

DMSO: Dimethylsulfoxyde

e- : Électron

EROs: Espèces Réactives de l'Oxygène

ERA: Espèces Réactives de l'Azote

FBS : Fetal bovine serum

GMP : Guanosine Monohosphate

GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique

GPx: Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H<sub>2</sub>O : Monoxyde d'hydrogène (Eau)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène

H/R: Hypoxie/réoxygénation

hCG: Hormone chorionique gonadotrope humaine

HIF-1 : Hypoxia Inductible Factor-1

HIOMT: Hydroxyindole-O-méthyltransférase aussi nommée Acétylsérotinine O-

Méthyltransférase (AMST)

HNE : 4-hydroxynonéanal

hPL : Lactogène placentaire humaine

HRP: Horseradish Peroxidase

iNOS: Inductible nitric oxyde synthase

eNOS: Endothelial nitric oxyde synthase

LOX : Lipoxygénase

MDA : Malondialdéhyde

MGT : Maladie Gestationnelle Trophoblastique

miARN : Micro ARN

MPO : Myéloperoxydase

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : Monoxyde d'azote

NO<sup>•</sup> : Oxyde nitrique

NOX : NADPH oxydase

Nrf2 : *Erythroid-2-related factor 2*

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anion superoxyde

ONOOH : Peroxynitrate

ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrite

OXPHOS: Phosphorylation oxydative

PE : Prééclampsie

PKC : Phosphokinase C

PLC : Phospholipase C

PLA2 : Phospholipase A2

PVDF : Polyfluorure de vinylidène polyvinylidene difluoride

RCIU : Restriction de croissance intra-utérine

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RIPA : Radioimmunoprécipitation

ROR/RZR : Retinoid orphan receptor et retinoid Z receptor

SOD1: Superoxyde Dismutase 1

SOD2: Superoxyde Dismutase 2

STB: Syncytiotrophoblaste

TBA: Acide thiobarbiturique

TBARS: ThioBarbituric Acid Reactive Substances

TB: Trophoblaste

TBHP : Hydroperoxyde de tert-butyle

TBev: Trophoblastes extra-villeux

TBv : Trophoblastes villeux

TBS: Tris-buffered saline

TBS-T: Tris-buffered saline (TBS) 0.1% Tween 20.

TCA: Acide trichloracétique

UV: Ultraviolet

XDH : Xanthine déshydrogénase

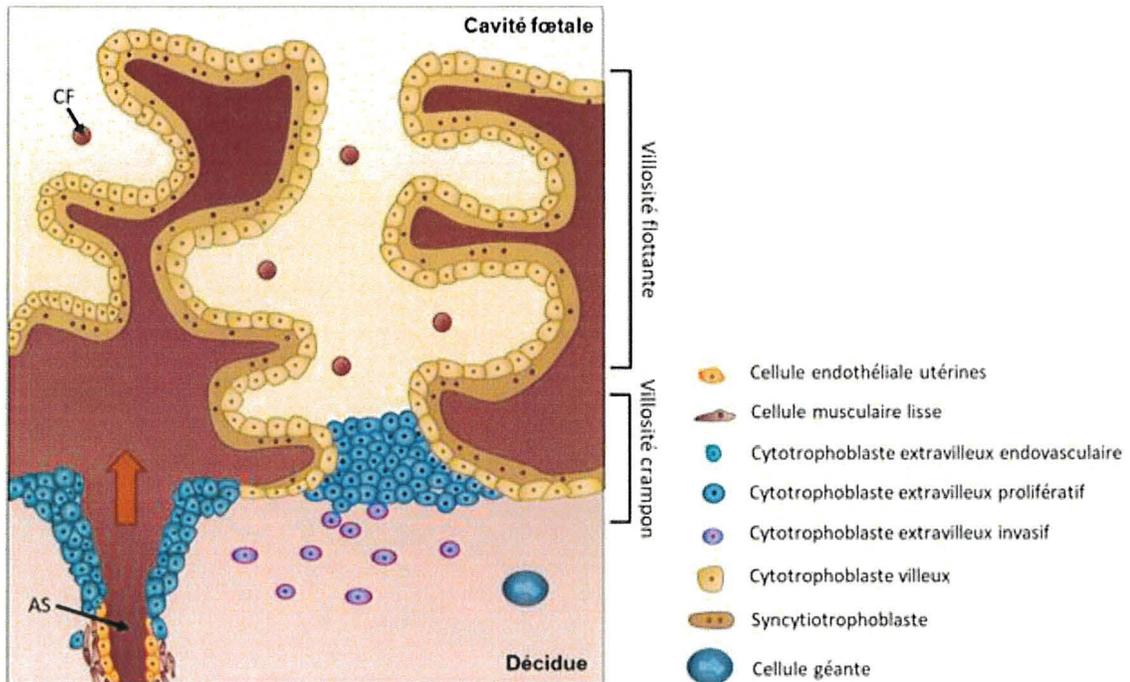
XO : Xanthine oxydase

## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1.1 Placenta humain

Le placenta, un organe autonome et transitoire, assure multiples fonctions indispensables au développement de l'embryon et du fœtus, notamment l'échange de nutriments et d'oxygène de la mère vers le fœtus grâce à une grande surface d'échange et à un large réseau sanguin (Gude *et al.*, 2004). Il est également un organe endocrine, sécrétant multiples hormones. De plus, le placenta métabolise certaines substances et élimine les déchets fœtaux toxiques, sans oublier qu'il assure la tolérance immunitaire, soit la protection du fœtus du rejet maternel (Bouteiller (2000);MORRISH *et al.* (1987)).

Le placenta humain est de type hémomonochorial: une caractéristique propre aux primates supérieurs, c'est à dire que le sang maternel est en contact direct avec les villosités choriales dans la chambre intervillieuse. Sur le plan anatomique, le placenta humain est de type vilieux. Il dérive du blastocyste, un stade de division de l'embryon, qui s'accôle à l'épiderme utérin et se différencie de manière invasive en cytotrophoblastes (CTB) qui fusionnent en syncytiotrophoblaste (STB). Cette invasion cellulaire permet la nidation du blastocyste dans la muqueuse utérine. Quelques jours après la nidation, les CTB continuent leur invasion et forment les villosités choriales placentaires, les unités structurales et fonctionnelles du placenta. Les villosités choriales peuvent être ancrées dans la cavité utérine ou flotter dans la chambre intervillieuse (Fig.1) (Malassiné *et al.*, 2000). À la base des villosités, les cellules trophoblastiques se différencient en cytotrophoblastes extra-villeux (CTBev) assurant l'ancrage du placenta à l'utérus et en cytotrophoblastes vilieux (CTBv) où se font les échanges fœto-maternels. Les CTBv, des cellules mononucléées prolifératives, se différencient et fusionnent en syncytiotrophoblaste (STB), une large cellule plurinucléée (Fig.1).



**Figure 1 : Représentation schématique de la villosité chorale placentaire. Elle est formée de villosité flottante et de villosité crampon.** La villosité flottante, en contact direct avec le sang maternel, est composée de cytotrophoblastes villositaires (CTBv) et du syncytiotrophoblaste (STB). La villosité crampon est composée de cytotrophoblastes extravilleux (CTBev) qui se différencient en CTBev prolifératifs. Les CTBev prolifératifs se différencient en CTBev invasifs, qui à leur tour peuvent devenir des CTBev endovasculaires. AS : Artère spiralee ; CF : Capillaire fœtal. (© Josianne Bienvenue-Pariseault)

Pour les biologistes cellulaires, le placenta centralise, au cours d'une durée de vie limitée, toutes les étapes essentielles de la vie d'une cellule que sont la prolifération, la migration, l'invasion, la différenciation et la mort cellulaire programmée. De plus, il représente un modèle unique d'invasion pseudo-tumorale mais limitée et dûment contrôlée.

### 1.1.2 Le Choriocarcinome Placentaire

Le choriocarcinome placentaire est une forme de maladie gestationnelle trophoblastique (MGT; (*gestational trophoblastic disease* (GTD)) agressive, à croissance rapide, maligne et hautement métastatique (National Cancer Institute, 2018). Selon Bagshawe, l'incidence du choriocarcinome est de 1/50 000 grossesses aux États-Unis, avec un taux plus élevé en Asie de 1/8000 grossesses (Bagshawe, 1983) et les principaux facteurs de

risque sont la présence d'une môle hydatiforme et l'âge maternel élevé (plus de 40 ans) (Mailly *et al.*, 2008). Il se développe à partir des cellules trophoblastiques à la suite d'une transformation maligne d'une môle hydatiforme complète dans 50% des cas, un avortement dans 25%, une grossesse normale dans 22,5% et une grossesse ectopique dans les 2,5% des cas restants (Wolf and Lage (1995), Benirschke and Driscoll (1967)).

Sur le plan histopathologique, le choriocarcinome placentaire est formé d'une juxtaposition de cellules du CTB et du STB avec disparition complète des villosités choriales et envahissement du myomètre (Jacques *et al.*, 1998). Au cours d'une grossesse, le diagnostic du choriocarcinome placentaire est extrêmement rare vu que les premiers symptômes peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies. Mais, il est généralement détecté chez les femmes non-enceintes par une élévation des niveaux de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG). Des femmes peuvent présenter de hauts niveaux de hCG plusieurs semaines après l'accouchement. Un examen anatomopathologique et une étude immunohistochimique confirment la présence de la tumeur (Mailly *et al.*, 2008). Le choriocarcinome est une tumeur invasive. Il diffuse à partir de l'utérus à travers le sang à d'autres organes, le plus souvent vers les poumons, le vagin le foie et le cerveau (Mailly *et al.*, 2008).

Le choriocarcinome se développe même chez des mères sans antécédents de MGT. Les placentas atteints peuvent avoir de petites lésions macroscopiques suggérant de petits infarctus et des régions d'infarctus entourées de choriocarcinome. Le choriocarcinome peut aussi être non métastatique, mais, au moment de l'accouchement, certaines femmes atteintes ont eu des métastases pulmonaires. Leurs choriocarcinomes ont été visibles macroscopiquement vu qu'ils présentaient de larges lésions identifiables comme des choriocarcinomes. Dans d'autres cas, le placenta peut présenter des foci (foyers) de choriocarcinome accompagnés de feuillets de choriocarcinome nécrotique.

Le choriocarcinome placentaire est chimio-sensible. Une chimiothérapie de type EMA/CO (Étoposide, Méthotrexate et Actinomycine D alternant à intervalles hebdomadaires avec Vincristine et Cyclophosphamide) est généralement utilisée (Mailly *et al.*, 2008).

## 1.2 LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et de l'azote (ERAs) et les défenses antioxydantes endogènes (Fig. 2). Ce concept de balance est central pour comprendre le phénomène de stress oxydatif. En effet, quand les espèces oxydantes surpassent les défenses antioxydantes, celles-ci entraînent différents dommages aux biomolécules essentielles (d'une façon directe ou indirecte) soient les protéines, les lipides, les glucides et l'acide désoxyribonucléique (ADN) menant jusqu'à la mort cellulaire (Burton & Jauniaux, 2011). Il faut donc maintenir l'équilibre entre les espèces réactives et les défenses endogènes afin d'éviter les dommages cellulaires. Les mitochondries sont les principales sources endogènes de synthèse des EROs et des ERAs, même dans des conditions non-pathologiques, étant donné qu'elles se forment à la suite de la respiration cellulaire au niveau de la chaîne de transport des électrons (CTE). Le stress oxydatif est donc une conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène. Les EROs normalement produits via la respiration mitochondriale sont nécessaires à différents processus cellulaires et physiologiques (Gracy *et al.*, 1999), incluant l'expression génique, en interagissant avec des facteurs de transcription (Apel & Hirt, 2004), et la transduction du signal étant donné que les radicaux libres agissent comme des seconds messagers (Sauer *et al.*, 2001).

Il a été estimé que sous des conditions normales, jusqu'à 1% du flux d'électrons mitochondrial mène à la production d'anions superoxydes (Ott *et al.*, 2007), considérés comme les précurseurs majeurs des EROs. En effet, la CTE contient des centres redox, lieu de la fuite des électrons ( $e^-$ ) s'associant avec l'oxygène moléculaire, formant ainsi les anions superoxydes (Andreyev *et al.*, 2005). La formation des différents radicaux libres provient d'une série de réactions d'oxydoréduction à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Lorsqu'elles rencontrent certaines molécules ou atomes, les espèces oxydantes peuvent transférer de l'énergie ou des électrons et produire des EROs et des ERAs.

### 1.2.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) et de l'Azote (ERAs) et radicaux libres

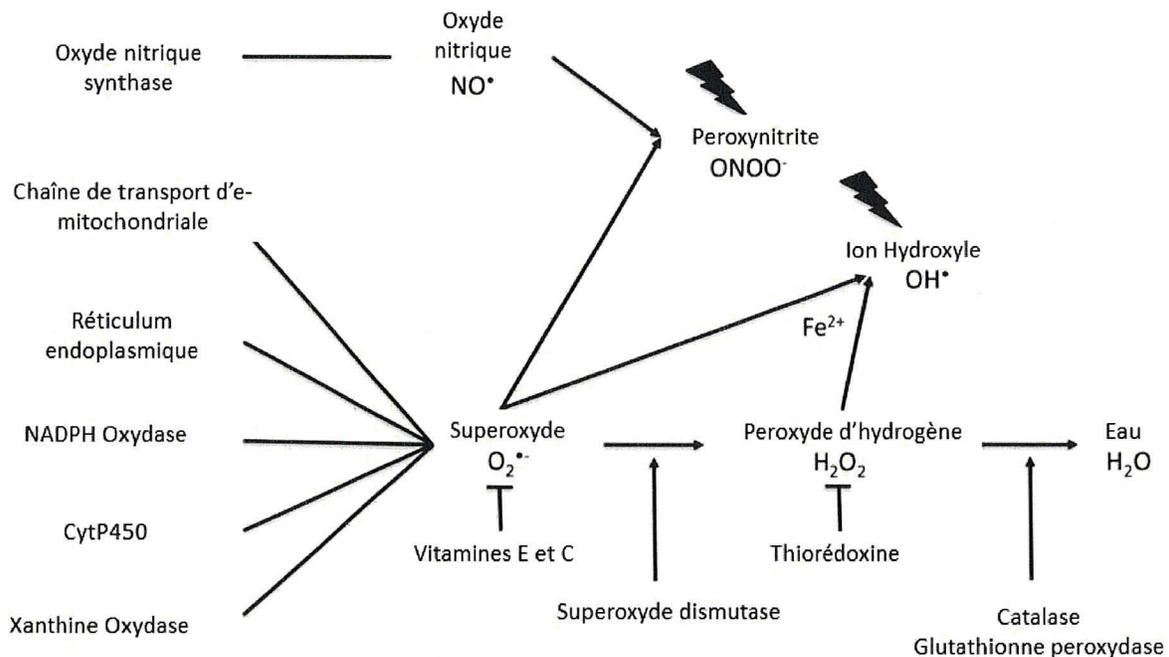
Le terme EROs englobe à la fois les radicaux libres et leurs intermédiaires non-radicaux. On définit par le terme de radicaux libres, tout atome, groupe d'atomes ou molécules qui possède sur son orbital externe un électron ( $e^-$ ) célibataire non-apparié. Les radicaux libres sont des substances chimiques très instables, de durée de vie très courte ( $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  secondes) et très réactives grâce à leur électron non-apparié qui cherche à se ré-apparier. Le radical libre va donc chercher à se stabiliser au détriment des molécules environnantes, soit en perdant un électron (il est donc réducteur) ou en gagnant un (il est oxydant). Ceci dépend de la molécule qui va le stabiliser. Dans le corps humain, les radicaux libres sont généralement oxydants (Bigard & Guezennec, 2017).

Plusieurs fonctions cellulaires incluant la transduction des voies de signalisation, la défense de l'hôte contre les pathogènes, l'autophagie, la prolifération cellulaire et l'apoptose sont régulées par les quantités physiologiques des EROs (Droge, 2002; Lee *et al.*, 2011). Sous les conditions physiologiques, le plus commun des radicaux libres incorporant l'oxygène est l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et les mitochondries sont considérées les sources principales de sa production (Droge, 2002). Il est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par les superoxydes dismutases (SODs) (Fig. 2) localisés dans différents compartiments cellulaires (voir Section 1.2.2.2: Enzymes antioxydantes). Le  $H_2O_2$  peut être métabolisé en  $H_2O$  ou transformé en radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) nocif (Fig. 2). Il est formé durant la réaction de Fenton où le  $H_2O_2$  interagit avec les métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ , etc.). Le radical hydroxyle a tendance à abstraire un atome d'hydrogène à chaque fois qu'il en a l'occasion, afin de former une molécule d'eau stable. Il attaque alors l'ADN, précisément le désoxyribose, causant un bris du brin d'ADN ou une excision de la base (Balasubramanian *et al.*, 1998). Il est le radical libre ayant le plus grand potentiel d'oxydation parmi les EROs et il est responsable de la majorité des dommages cellulaires.

Les ERAs incluent l'oxyde nitrique  $NO^{\cdot}$ , le peroxydinitrite  $ONOO^{\cdot}$  et le peroxydinitrate  $ONOOH$  (Fig. 2), ce dernier étant le plus toxique des ERAs. Le  $NO^{\cdot}$  est généré catalytiquement par l'acide aminé L-arginine sous l'action de l'oxyde nitrique synthase. Il peut être par la suite

couplé avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) pour générer le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Fig. 2). Ce produit est éventuellement dégradé en  $ONOO^-$  et  $\cdot OH$ .

Les mitochondries et les peroxysomes sont la principale source endogène des radicaux libres (Orrenius *et al.* (2007); Turrens (2003)). Les radicaux sont formés au cours du métabolisme normal à la suite d'une fuite d'électrons de la CTE mitochondriale. Des réactions de réductions subséquentes génèrent aussi d'autres types d'EROs. L'interaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène, par exemple, peut générer des radicaux hautement réactifs et toxiques (Imlay (2003); Mikkelsen and Wardman (2003)). Autre que les mitochondries et les peroxysomes, les radicaux libres sont générés à partir d'une variété de systèmes enzymatiques cytosoliques, telles que les lipoxgénases, la NADPH oxydase et le cytochrome P450 et la myéloperoxydase (MPO) (Burton & Jauniaux, 2011). En outre, le système enzymatique: NADPH oxydase joue un rôle majeur. L'activation de la NADPH oxydase est responsable de la production d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) qui peut être transformé en  $H_2O_2$ . Ce peroxyde d'hydrogène peut être par la suite transformé en anion hypochloreux  $ClO^-$  et en oxydants chlorés par la MPO (Podrez *et al.*, 2000). La toxicité du  $ClO^-$  est tellement accrue à cause du déficit de tous les systèmes antioxydants enzymatiques (SOD, glutathionne peroxydase (GPx)) ou non enzymatiques (vitamine C, vitamine E érythrocytaire, etc.) à le dégrader. Le  $ClO^-$  sera donc dégradé par dissociation (Cristol *et al.* (1997); Morena *et al.* (2002); PubChem, Hypochlorite). De nombreux agents externes peuvent mener aussi à la production des EROs, tels que les radiations ionisantes, les rayons ultraviolets, les toxines environnementales et les cytokines inflammatoires (Burton & Jauniaux, 2011).



**Figure 2 : Oxydants et défenses antioxydantes endogènes.** À gauche, on peut voir les différentes sources d'oxydants (les enzymes : Oxyde nitrique synthase, NADPH Oxydase, xanthine oxydase...) ou d'autres sources (chaîne de transport des e-, réticulum endoplasmique), produisant le NO•, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ainsi que les autres oxydants générés par des réactions subséquentes. Différents antioxydants (vitamines, enzymes : superoxyde dismutase, catalase, glutathionne peroxydase...) peuvent éliminer les différents radicaux libres générés. Adapté de (Burton & Jauniaux, 2011).

Les radicaux libres fonctionnent comme des armes à double tranchant au niveau des systèmes biologiques vu qu'ils peuvent être nocifs ou bénéfiques aux systèmes vivants, dépendamment de leurs sites de production, ainsi que leurs concentrations, leurs demi-vies, et la durée de leur production. Généralement, à concentrations élevées, les radicaux libres des familles EROs et ERAs sont d'importants médiateurs des dommages cellulaires (lipides, protéines et ADN). L'oxydation ou la nitrosylation des biomolécules altère leurs structures par l'incorporation de nouveaux groupements fonctionnels. Il y a génération d'hydroxyles, d'aldéhydes et de cétones modifiant l'activité biologique comme le gain ou la perte de fonctions. Les conséquences délétères englobent la mort cellulaire, la sénescence ou la tumorigenèse. Les radicaux libres promeuvent la libération du cytochrome C par les mitochondries, l'activation des caspases, celle de la protéine

'gardien du génome' p53 et d'autres protéines de signalisation apoptotique impliquant ou pas la mitochondrie.

De nombreuses études ont aussi montré les effets bénéfiques des EROs et des ERAs au niveau des cellules. Ils sont des puissants agents anti-infectieux: première ligne de défense anti-infectieuse (Kohchi *et al.*, 2009). Une explosion oxydative survient pendant la phagocytose d'agents infectieux par une cellule phagocytaire (macrophage, neutrophile), protégeant ainsi contre ces agents (Nathan and Hibbs Jr (1991); Shepherd (1986)). Ils sont aussi d'importants messagers secondaires pour de multiples voies de signalisation cellulaires impliquées dans la croissance cellulaire, la différenciation et les réponses inflammatoires. Par exemple, l'oxydoréduction des résidus cystéine des protéines régule les voies de signalisation par l'activation ou l'inactivation de protéines / enzymes. De plus, l'oxyde nitrique est connu pour jouer un rôle important dans la voie de transduction du signal guanosine monophosphate (GMP) cyclique (Murad, 1994). Le monoxyde d'azote (NO) de l'enzyme oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) jouent diverses fonctions dont la vasodilatation, anti-inflammatoire, anti-thrombose, et pro-angiogénique. La balance entre les effets bénéfiques et délétères des EROs/ERAs dépend de multiples facteurs incluant leurs concentrations, le type cellulaire et des composants subcellulaires où ils sont produits. Les travaux cités dans ce mémoire se concentrent sur les EROs.

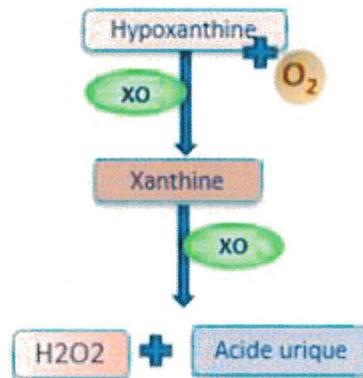
### **1.2.2 Enzymes pro-oxydantes**

Dans ce travail, nous nous concentrons sur la xanthine oxydase (XO) puisqu'elle est le générateur majeur d'EROs dans le placenta (Many *et al.*, 1996).

La XO est l'enzyme qui produit l'acide urique en décomposant les nucléotides puriques (Fig. 3). L'acide urique, ainsi que les EROs libérées lors de la réaction enzymatique, peuvent avoir des effets néfastes sur l'organisme, dont 'la goutte', une maladie chronique fréquente due à une production élevée d'acide urique via ce mécanisme (Battelli *et al.*, 2016). Par une série de réactions, les purines, la GMP et l'adénosine monophosphate (AMP), sont converties en hypoxanthine ou xanthine. Le catabolisme de la xanthine et de

l'hypoxanthine est catalysé par la XO en acide urique et  $H_2O_2$ , qui est converti en allantoïne, excrétée dans l'urine.

Une autre forme de la XO est la xanthine déshydrogénase (XDH), les deux formes sont inter-convertibles et catalysent les mêmes réactions, elles diffèrent par les cofacteurs qu'elles utilisent: de l' $O_2$  pour la XO et du NADPH pour la XDH. La réaction de la XO réduit l'oxygène en anion superoxyde qui est converti plus tard en  $H_2O_2$  (Fig. 3). Les produits de cette réaction sont donc tous des espèces nocives (acide urique,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ). L'acide urique agit comme un pro-oxydant et induit la formation d'autres radicaux.



**Figure 3: Formation des espèces réactives de l'oxygène par la xanthine oxydase (XO).** La Xanthine oxydase catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Figure par Fatma Kharrat.

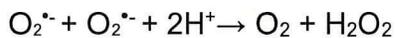
### 1.2.3 Défenses antioxydantes

Pour combattre les dommages causés par les radicaux libres, les cellules ont développé différents systèmes de défense. Ceci inclut les neutralisateurs ou piègeurs de radicaux libres ainsi que les systèmes enzymatiques antioxydants qui convertissent les radicaux libres toxiques en molécules non-toxiques. Les cellules possèdent également des systèmes pour réparer et/ou éliminer les molécules ou les structures endommagées par les radicaux libres.

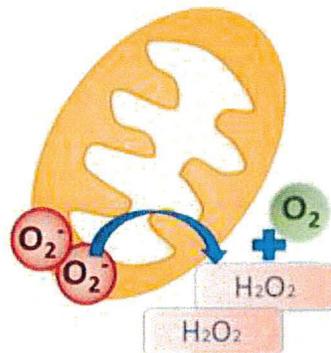
### 1.2.3.1 Enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes incluent les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), la glutathionne peroxydase (GPx) et les peroxyrédoxines. Il existe aussi le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase et l'hème oxygénase (Pincemail *et al.*, 2002).

Les SODs est une famille de trois isoformes ayant des activités similaires: La SOD cuivre-zinc (SOD<sub>1</sub>), la SOD manganèse (SOD<sub>2</sub>), connue aussi comme la SOD mitochondriale et la SOD extracellulaire (SOD<sub>3</sub>). Les trois isoformes diffèrent par leurs positions chromosomiques, leurs structures protéiques, leurs localisations cellulaires et les cofacteurs requis pour la réaction (Dosunmu-Ogunbi *et al.*, 2019). Ces enzymes sont spécialisées dans l'élimination du stress oxydatif via l'attaque des anions superoxydes par la réaction:



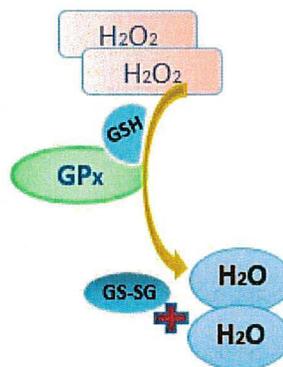
Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré est ensuite transformé en eau par l'activité de la catalase, les peroxyredoxines ou la glutathionne peroxydase (Fig. 4).



**Figure 4:** Réaction de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) mitochondriale. La superoxyde dismutase 2 catalyse la transformation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et oxygène (O<sub>2</sub>). Figure par Fatma Kharrat.

La plus importante des trois SODs est la SOD<sub>2</sub>. Elle est synthétisée dans le cytoplasme et est localisée dans la matrice mitochondriale (Fig.4). Elle neutralise directement les anions superoxydes qui sont produits par la chaîne de respiration. L'expression de cette enzyme est aussi régulée par les EROs. L'augmentation de peroxynitrite entraîne la nitration de la SOD<sub>2</sub> sur une tyrosine et cause l'inhibition de son activité. Les superoxydes d'autre part, régulent à la hausse son expression (Dosunmu-Ogunbi *et al.*, 2019).

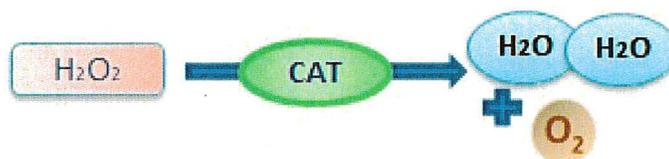
Les GPx sont une famille d'enzymes hydrolysant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Fig.5) et les peroxydes lipidiques en leurs alcools correspondants surtout dans les mitochondries et parfois dans le cytosol. Généralement, l'activité d'une GPx est dépendante du cofacteur sélénium. Les GPx jouent un rôle crucial dans l'inhibition de la peroxydation des lipides, protégeant ainsi des dommages du stress oxydatif (Ighodaro & Akinloye, 2018). Selon Morón et Cortázar, il y en a huit (de GPx<sub>1</sub> à GPx<sub>8</sub>) chez l'humain et la GPx<sub>1</sub> est la plus abondante (Morón & Castilla-Cortázar, 2012).



**Figure 5 : Réaction de la glutathionne peroxydase (GPx).** La GPx utilise le glutathion réduit (GSH) pour l'hydrolyse du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elle le transforme en eau avec une oxydation du glutathion (GSSG). Figure par Fatma Kharrat.

La CAT est une enzyme antioxydante utilisant l'oxygène. Elle utilise aussi le fer ou le manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et oxygène

moléculaire (Fig.6), complétant ainsi le processus de détoxification des SODs. Elle est très efficace et peut hydrolyser des millions de molécules de  $H_2O_2$  en une seconde. La CAT est surtout localisée au niveau des peroxysomes et est absente de la mitochondrie. Les  $H_2O_2$  présents au niveau de la mitochondrie sont plutôt dégradés par la GPx (Ighodaro & Akinloye, 2018).



**Figure 6 : Réaction de la catalase (CAT).** La CAT transforme une molécule de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en deux molécules d'eau ( $H_2O$ ) et une molécule de dioxygène ( $O_2$ ). Figure par Fatma Kharrat.

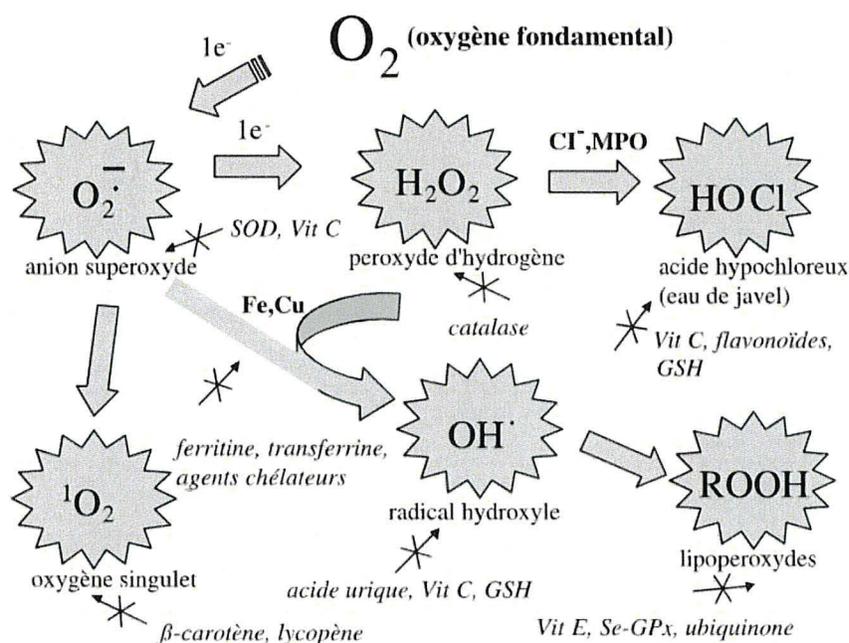
### 1.2.3.2 Autres antioxydants

Les antioxydants physiologiques non-enzymatiques incluent plusieurs catégories de molécules: les vitamines (C, riboflavine ou B2, A, E), les oligoéléments (sélénium, zinc), certaines protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine/ferroxidase), des molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, le GSH, la bilirubine, l'acide lipoïque...) (Fig. 7) (Chirico and Pialoux (2012); Pincemail *et al.* (2002)) et certaines indoles, comme la mélatonine, le puissant antioxydant dont ce travail détaille les fonctions. Les oligoéléments sont des cofacteurs nécessaires à certaines enzymes antioxydantes, dont le zinc, un inducteur des métallothionéines, des protéines à activité antioxydante et un inhibiteur des réactions de production d'EROs induite par le cuivre.

Le glutathion (GSH) est un important antioxydant dans plusieurs processus cellulaires, et sa concentration intra- et extra-cellulaire est hautement régulée. Il joue un rôle important dans le métabolisme, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. Un déséquilibre de sa concentration est à l'origine du vieillissement ainsi que la

progression de différentes maladies, dont le cancer, l'inflammation, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires. Le GSH est synthétisé dans le cytosol et dégradé dans le milieu extracellulaire. Il joue également un rôle dans la transcription de gènes pro- et anti-inflammatoires ou de gènes codant pour l'expression d'enzymes antioxydantes (Pincemail *et al.*, 2002).

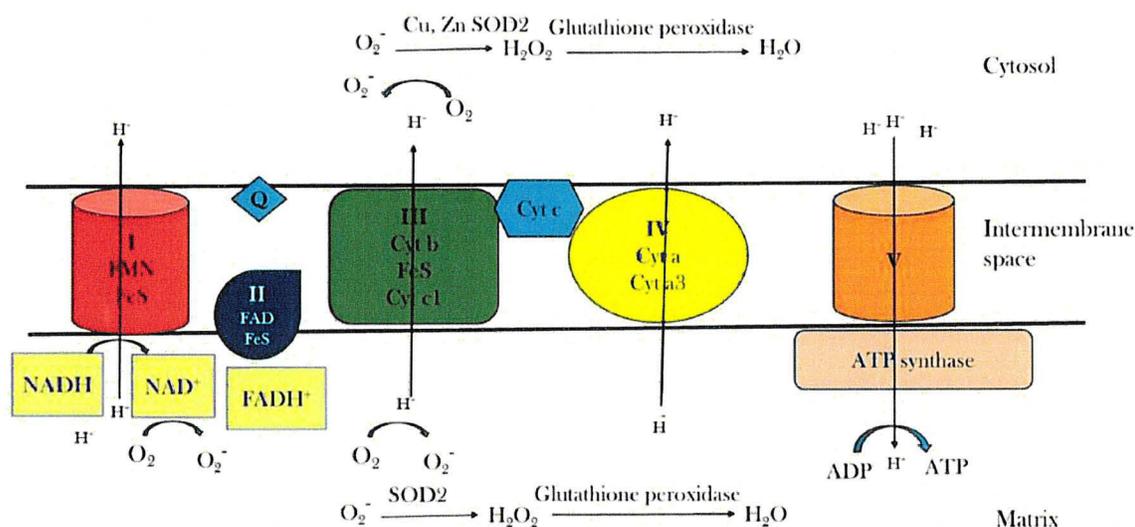
Un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail *et al.*, 2002).



**Figure 7 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) par les systèmes de défenses antioxydantes.** Le dioxygène est transformé lors du métabolisme cellulaire en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), qui est transformé à son tour en oxygène singulet ou en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  par l'action de la superoxyde dismutase ( $SOD_2$ ) ou la Vitamine C (Vit C). Le  $H_2O_2$  peut être hydrolysé par l'action de la catalase ou transformé en acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase (MPO). Les antioxydants aidant à se débarrasser de ce dernier sont la Vit C, les flavonoïdes et glutathion réduit (GSH). L'anion  $O_2^{\cdot-}$  et le  $H_2O_2$  peuvent donner le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , réduit par l'acide urique, la Vit C et le GSH. Le  $OH^{\cdot}$  est transformé en lipopéroxydes (R-OOH), réduits par la vitamine E (Vit E), la glutathionne peroxydase sélénium-dépendante (Se-GPx) et l'ubiquinone. L'oxygène singulet, dérivant de l'anion  $O_2^{\cdot-}$  est détecté par le  $\beta$ -carotène ou les lycopènes (Pincemail *et al.*, 2002).

#### 1.2.4 Stress oxydatif et mitochondrie

La mitochondrie est une organelle dont la fonction principale est la production d'énergie sous forme d'ATP à partir du dioxygène ( $O_2$ ). La Chaîne de Transport d'électrons (CTE) au niveau de la membrane mitochondriale est composée de quatre complexes enzymatiques: C-I : NADH déshydrogénase, C-II : la succinate déshydrogénase, C-III : la coenzyme Q-cytochrome C réductase et le C-IV : la cytochrome C oxydase. Un cinquième complexe est aussi présent, l'ATP synthase (Fig. 8) (Esposito & Cuzzocrea, 2010). Au fil de la chaîne de réduction monovalente de l'oxygène, par addition de quatre  $e^-$  conduisant à la formation d'une molécule de  $H_2O$ , on passe d'une molécule d' $O_2$  à une chaîne de radicaux libres, soit le radical  $O_2^{\cdot-}$ , au  $H_2O_2$  puis au  $OH^{\cdot}$ , pour produire enfin le  $H_2O$  (Moussard, 2006). La mitochondrie est donc la source majeure de production de radicaux libres, mais aussi leur cible majeure (Paradies *et al.*, 2015). En effet, la fonction mitochondriale est altérée lors d'un stress oxydatif exacerbé. En outre, les EROs diminuent la respiration mitochondriale, réduisent la production d'ATP, répriment l'expression des différents complexes de la CTE (I à V) et inhibent l'activité du complexe I de la CTE. Dans les cellules placentaires, les mitochondries sont connues comme les sites majeurs de production d'EROs en plus d'être des cibles des dommages oxydatifs (Ireland *et al.*, 2017). Les EROs sont produits lorsque les électrons des substrats métaboliques sont transférés à la molécule de dioxygène via les complexes de la CTE, produisant ainsi un gradient de protons pour la synthèse d'ATP par le complexe V. Durant ce processus, une partie du dioxygène est convertie en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Ce dernier est converti en  $H_2O_2$  et  $\cdot OH$ . Les dommages à la CTE causent une altération du gradient de protons et conduit alors à la synthèse de plus en plus d'EROs, perturbant l'homéostasie (Esposito & Cuzzocrea, 2010).



**Figure 8: Chaîne respiratoire mitochondriale et génération des Espèces Réactives de l'Oxygène EROs.** Le complexe I est la NADH déshydrogénase, on a la réduction du NADH en NAD<sup>+</sup> avec un relargage de protons H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire. Ce complexe est une source principale d'ions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Le complexe II est la succinate déshydrogénase, à coenzyme FAD, convertissant l'ubiquinone en ubiquinol. Plusieurs protéines à centre Fer-Soufre (FeS) y sont impliquées. Le complexe III, la coenzyme Q-cytochrome c réductase, assemble 2 cytochrome b (Cyt b), une protéine à centre FeS et le cytochrome c<sub>1</sub> (c<sub>1</sub>). Un transfert d'électrons se fait vers les Cyt C en injectant quatre H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire. Ce complexe génère également des O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et des peroxydes d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le complexe IV, ou la cytochrome C oxydase, assemble un cytochrome a (Cyt a) et un Cyt a<sub>3</sub>. On a transfert quatre électrons de quatre Cyt C à une molécule de dioxygène pour produire du H<sub>2</sub>O et 4 H<sup>+</sup> sont pompés. Le dernier complexe (V) est l'ATP synthase, phosphorylant l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP en utilisant un gradient de H<sup>+</sup> (Kumari *et al.*, 2018).

Étant donné que les mitochondries sont à la fois une source et une cible des oxydants, l'amplification des dommages oxydatifs peut avoir lieu lorsque les niveaux d'EROs endommagent les mitochondries et augmentent davantage la production des EROs (Ramachandran *et al.* (2002); Dranka *et al.* (2011)). Mais, la compréhension des réponses mitochondriales aux EROs dans les cellules saines et tumorales est incomplète.

### 1.2.5 Stress oxydatif et cancer

L'oxydation est, à la fois, une des plus importantes réactions cellulaires permettant entre-autres la production d'énergie, et une des plus dangereuses à la cellule étant donné qu'elle participe à l'établissement du stress oxydatif. Ce dernier cause différents dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires (détaillés dans la section 1.2.6), responsables de l'induction d'une multitude de maladies, dont le cancer.

Le cancer est une maladie très hétérogène et hautement morbide, et plusieurs études affirment qu'un déséquilibre de la balance oxydative est grandement impliqué dans l'initiation, la promotion et la progression du cancer ainsi que dans la résistance aux thérapies. Les plus grands dommages du stress oxydatif sont ceux affectant l'ADN, dont les anomalies chromosomiques et l'activation des oncogènes favorisant l'apparition des cancers. En effet, la modification des bases azotées, la création de sites abasiques (apuriques et apyrimidiques) où les bases azotées manquent et les bris simple et double-brins sont les plus importants. Ces modifications altèrent la croissance cellulaire normale en modifiant le profil transcriptomique, ce qui provoque différentes mutations et dysfonctionnements géniques impliqués dans l'initiation des tumeurs. (Pizzino *et al.*, 2017; Valko *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006).

Les cellules cancéreuses montrent un stress oxydatif métabolique persistant, en comparaison avec les cellules normales, une conséquence de l'instabilité génétique, métabolique et des transformations oncogéniques qu'elles ont subies (Kim *et al.*, 2016). Cependant, les antioxydants environnants ces tumeurs (enzymes et autres molécules) sont réduits. Ceci est dû à leur recrutement accru ou à leur séquestration par les cellules tumorales (Shafabakhsh *et al.*, 2019). En effet, les cellules tumorales s'adaptent aux taux élevés des EROs via l'activation des voies antioxydantes. Ce qui mène de plus en plus de chercheurs à cibler les voies de signalisation des EROs impliquées dans le développement du cancer, afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques (Kumari *et al.*, 2018).

D'un côté, les niveaux basaux d'EROs sont nécessaires pour la prolifération de la cellule cancéreuse, alors que des niveaux plus hauts d'EROs peuvent induire la mort de cette

cellule, via une des voies apoptotiques (Pelicano *et al.*, 2004). Ce qui explique le fait que les molécules antioxydantes diminuent généralement la prolifération des cellules tumorales, alors que la chimiothérapie induit plutôt leur mort par apoptose.

Dans le cancer du col de l'utérus par exemple, il est connu que le virus du papillome humain (VPH) est la cause majeure, mais, il a aussi été confirmé que le stress oxydatif et l'altération des défenses antioxydantes y sont impliqués aussi. En effet, des études ont rapporté la diminution des niveaux et de l'activité des antioxydants en cas de cancer du col de l'utérus, en circulation sanguine ou dans le tissu cancéreux (Balasubramaniyan *et al.*, 1994).

La diminution des concentrations des antioxydants résulte en un recrutement accru et une séquestration de ces derniers par les cellules tumorales. La diminution des niveaux de GSH, SOD et de l'activité de la CAT ont été observés au niveau des érythrocytes de patientes atteintes du cancer du col de l'utérus (Kolanjiappan *et al.*, 2002; Manju *et al.*, 2002), ces diminutions peuvent être dues à l'augmentation des niveaux des EROs conduisant aux dommages de l'ADN et des enzymes (Naidu *et al.*, 2007).

### **1.2.6 Dommages du stress oxydatif**

Les EROs ont la capacité d'endommager directement ou indirectement toutes les biomolécules, incluant les lipides, les protéines, les carbohydrates et l'ADN (Halliwell (2007); Kohen and Nyska (2002)). Les EROs ont été démontrés comme étant impliqués dans plus de 200 maladies et cancers (Halliwell, 2007), d'arrêts cardiaques (Eleuteri *et al.*, 2009), de dysfonctions endothéliales (Mattaliano *et al.*, 2009), dans l'athérosclérose (Shao *et al.*, 2006), d'inflammation (Tripathy & Grammas, 2009), des maladies du tractus intestinal (Senoglu *et al.*, 2008), de déficiences cérébrales dégénératives (Barnham *et al.* (2004); Butterfield and Sultana (2008)), du diabète (Reddy *et al.*, 2009), de maladies de l'œil (Ferreira *et al.*, 2004), et de pathologies ischémiques et post-ischémiques (Levine, 1993).

### 1.2.6.1 Peroxydation des lipides

Lorsque les EROs attaquent les lipides des membranes plasmiques, ceci entraîne la peroxydation des lipides. Ce processus engendre la diminution de la fluidité des membranes plasmiques et de celles des organelles et par conséquent, endommage les gradients ioniques, la transduction des signaux. (Lampiao & PLESSIS, 2013).

La peroxydation lipidique conduit à la formation de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxynonenal (4-HNE) qui forment les ALE (MDA-Lysine et HNE-Lysine). Le HNE peut être détoxifié par la glutathionne-S-transférase. L'accumulation de HNE est associée à une fluidité et liquéfaction des membranes et à l'activation de la cascade apoptotique.

Les radicaux hydroxyles causent la peroxydation des lipides dans la membrane plasmique ou celle de n'importe quelle organelle cellulaire qui contient des chaînes latérales riche en acides gras polyinsaturés. En supprimant l'hydrogène de la chaîne latérale hydrocarbonée d'un acide gras, il y a création d'un radical carboné centralisé 'C•'. Si l'oxygène est présent, ceci peut former un radical hydroxyle ( $-C-O-O^*$ ), qui à son tour est capable de supprimer un hydrogène d'un acide gras adjacent, et donc une propagation de la réaction. Étant donné que la vitamine E est liposoluble et possède une queue hydrophobe, elle a tendance à s'accumuler dans la membrane interne lipidique ou elle agit comme un 'briseur de chaîne' vu qu'elle interagit avec les radicaux peroxydes jusqu'à quatre fois plus que ces derniers peuvent réagir avec les chaînes latérales des acides gras (Halliwell, 1999).

### 1.2.6.2 Carbonylation et nitration des protéines

La carbonylation des biomolécules par les EROs est connue comme l'un des plus importants marqueurs du stress oxydatif (Yao & Rahman, 2011). Les oxydations menant à la création de groupements carbonyles (aldéhydes, les cétones et les lactames), peuvent toucher les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Fedorova *et al.*, 2014). Différentes molécules peuvent être générées comme les groupements carbonyles à haut

poids moléculaire, soient des aldéhydes, cétones ou lactames ainsi que des carbonyles à faible poids moléculaire résultant des réactions de clivage oxydatives.

Le stress carbonyle caractérisé par une accumulation d'espèces carbonylées réactives résulte en des dysfonctionnements biomoléculaires et une toxicité accrue et peut même conduire à la mort cellulaire par apoptose (Curtis *et al.*, 2012). C'est une modification post-traductionnelle irréversible. Les protéines sont modifiées directement par les EROs ce qui provoquent l'oxydation des acides aminés formant les composés carbonylés ou à la formation de sulfoxydes et des ponts disulfures. Les protéines sont aussi sujettes à des modifications indirectes par les composés carbonylés réactifs de la glyco-oxydation et de la peroxydation lipidique.

Les composés carbonylés réactifs peuvent réagir avec certains résidus d'acides aminés et former les AGE (*advanced glycation end products*) et les ALE (*advanced lipoxidation end products*) (Weiss *et al.*, 2000). La proline, l'arginine, la lysine et la thréonine sont particulièrement vulnérables à ces attaques. Les autres acides aminés aussi sont sujets à la carbonylation. Par exemple, l'abstraction des ions hydrogène (protons) du groupe thiol de la cystéine peut mener à la formation de ponts disulfures et un repliement aberrant des protéines ce qui mène ultérieurement à la perte de fonction protéique, mais aussi à l'agrégation des protéines et ultimement à la mort cellulaire. Le peroxy-nitrite réagit avec les résidus tyrosine pour former des 3-nitrotyrosine. À des taux physiologiques, la nitration des protéines est sélective et un processus réversible qui conduit à l'activation d'une manière analogue à la phosphorylation, mais à des taux plus élevés, elle peut être préjudiciable. La nitration des protéines au niveau du placenta par exemple, peut avoir des effets divers, soit un gain ou une perte de fonction (Webster *et al.*, 2008).

### **1.2.5.3 Oxydation et fragmentation de l'ADN**

L'ADN est attaqué principalement par les radicaux hydroxyles  $\bullet\text{OH}$  et plusieurs produits peuvent être générés suite à des réactions soit avec les bases azotées de l'ADN ou avec les sucres désoxyriboses (Halliwell, 1999). Par exemple, un radical hydroxyle peut s'ajouter sur une guanine et produire une 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine qui peut être mesurée biochimiquement ou détectée par immunohistochimie. Les attaques sur les

fragments de sucre peuvent provoquer des ruptures dans les brins d'ADN et celles pouvant affecter les histones mènent à la réticulation d'ADN, c'est à dire à la formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels, créant des liaisons entre les chaînes ce qui peut interférer avec repliement de la chromatine, la réparation d'ADN et la transcription.

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est particulièrement vulnérable à l'attaque d'EROs à cause de sa proximité du site de relargage des anions superoxydes, la chaîne de transport d'électrons, du manque de la protection de ses histones, et le peu de mécanismes de réparation qui s'y trouve. L'ADN mitochondrial est donc soumis à l'attaque des radicaux libres même en conditions normales non-stressantes, ce qui explique que les mutations ont lieu 5 à 10 fois plus que dans l'ADN nucléaire (Richter *et al.* (1988); Burton and Jauniaux (2011)). L'ADNmt encode plusieurs protéines incluant les enzymes de la chaîne de transport d'électrons, les mutations peuvent mener à une production d'énergie altérée et un risque accru de fuite d'électrons.

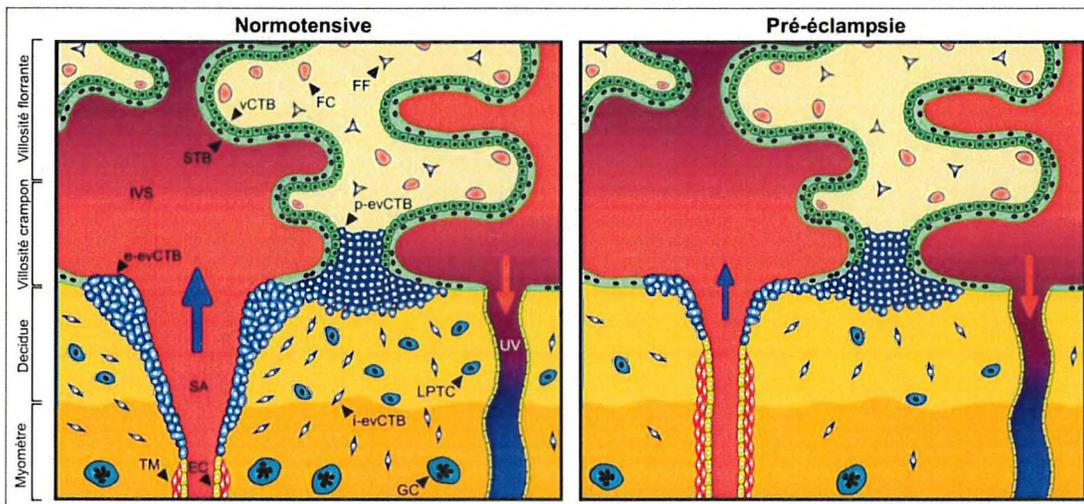
### **1.2.6 Stress oxydatif, grossesse et placenta**

La grossesse est un état de stress oxydatif (Wisdom *et al.*, 1991). En effet, plusieurs processus physiologiques sont modifiés chez la femme enceinte, provoquant une augmentation de l'activité métabolique et de la consommation cellulaire basale d'oxygène (Casanueva & Viteri, 2003). Ceci est dû entre autres à une augmentation du volume sanguin, au volume placentaire, à l'importante vascularisation du placenta ainsi qu'à sa richesse en mitochondries (Casanueva and Viteri (2003); Sies (1997)). 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 une surproduction d'EROs ainsi qu'un bon déroulement de la grossesse.

Le développement placentaire est aussi interrelié avec la concentration en oxygène. En effet, le développement embryonnaire a lieu dans un environnement faible en oxygène jusqu'au deuxième trimestre de grossesse, où de grandes quantités d'O<sub>2</sub> se mettent en place pour répondre aux exigences de la croissance fœtale (Wu *et al.*, 2015). Cette importante oxygénation placentaire est souvent accompagnée par un stress oxydatif

(Jauniaux *et al.*, 2000). Les radicaux libres sont générés par la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que par les enzymes pro-oxydantes XO et la NADPH oxydase (NOX). La formation de ce stress provient de la périphérie placentaire et s'étend progressivement au reste du placenta avec l'entrée du sang dans cet organe. Cette lente propagation de la périphérie vers le centre protège le fœtus d'une augmentation soudaine du stress oxydatif, car une entrée prématurée d'une grande quantité de radicaux libres est l'une des causes d'échec précoce de grossesse ou fausse couche (Jauniaux *et al.*, 2003).

Le stress oxydatif est crucial dans une grossesse. Les EROs régulent la transcription de gènes et sont d'importantes molécules de signalisations pour la prolifération et l'invasion trophoblastiques mais aussi pour l'angiogenèse et le développement vasculaire. En revanche, un excès de stress oxydatif est aussi impliqué dans diverses pathologies de la grossesse telles que la prééclampsie (PE) et la restriction de croissance intra-utérine (RCIU) (Wu *et al.*, 2015).

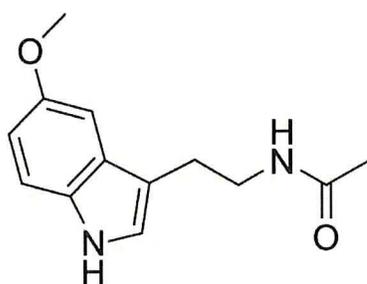


**Figure 9 : Comparaison de la villosité chorale d'une grossesse normale et d'une grossesse compliquée par une pré-éclampsie.** Les grossesses compliquées par la pré-éclampsie sont caractérisées par un défaut d'invasion des artères spiralées par les cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires. Les artères spiralées demeurent contractiles et de petite taille causant une perfusion inadéquate du placenta. EC : cellule endothéliale; FF : fibroblaste fœtal; FC : capillaire fœtal; SA : artère spiralée utérine; IVS : espace intervilloux; vCTB : cytotrophoblaste villositaire; ev-CTB : cytotrophoblaste extravilloux; GC : cellule géante; LPTC : grande cellule polygonale trophoblastique; TM : tunique musculaire. Tirée de (Lanoix *et al.*, 2012b).

Des études *in vitro* ont aussi montré que le stress oxydatif peut causer une inhibition de la différenciation et de la fusion des cytotrophoblastes CTBv en syncytiotrophoblastes STB ainsi qu'une augmentation de leur apoptose (Alsat *et al.* (1996); Heazell *et al.* (2008)). De plus, il a été suggéré que le stress oxydatif impliqué dans les pathologies de la grossesse est dû à une altération du remodelage des artères spiralées, provoquant une ischémie/reperfusion (ou hypoxie/réoxygénation) et donc une teneur en oxygène variable (Fig. 9) (Hung and Burton (2006); Scifres and Nelson (2009)). Les dommages du stress oxydatif sont d'ailleurs présents au niveau de ces placentas pathologiques : dans les placentas pré-éclampsiques, la peroxydation des lipides et les protéines carbonylées augmentent significativement en comparaison aux placentas non-pathologiques (Vanderlelie *et al.*, 2005; Zusterzeel *et al.*, 2001).

### 1.3 LA MÉLATONINE

La mélatonine est une indolamine qui a été isolée à partir de glandes pinéales bovines et sa structure a été identifiée en 1958 (Fig.10) (Lerner *et al.*, 1958). Elle a initialement été caractérisée comme une hormone principalement impliquée dans la régulation circadienne des fonctions physiologiques et neuroendocrines et le cycle éveil-sommeil (Cajochen *et al.*, 2003; Reiter, 1991)). Sa synthèse a par la suite été démontrée dans plusieurs tissus et cellules extra-pinéaux comme la rétine, le tractus gastro-intestinal, la peau, les plaquettes sanguines, les testicules, les ovaires, les lymphocytes et le placenta (Reiter *et al.*, 2013;(Lanoix *et al.*, 2008b)). Sa production pinéale est contrôlée par la photopériode, en revanche, sa sécrétion périphérique ne l'est pas et sa concentration surpasse celle produite par la glande pinéale en période d'obscurité (Pandi-perumal *et al.*, 2006). Notre laboratoire a démontré la production *de novo* de la mélatonine par le placenta durant la grossesse, estimée à 225 fois plus élevée que celle des pinéalocytes (Lanoix *et al.*, 2008b).



**Figure 10:** Structure chimique de la mélatonine (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La mélatonine dérive de l'acide aminé essentiel L-tryptophane qui est d'abord transformé en sérotonine, convertie ensuite en N-acétyl-5-méthoxytryptamine (mélatonine), grâce à une cascade enzymatique orchestrée par l'aralkylamine-N-acétyltransférase (AANAT) et l'acétylsérotonine-O-méthyltransférase (ASMT ou HIOMT; hydroxyindole-O-méthyltransférase) respectivement (Tan *et al.* (2013); Wurtman *et al.* (1968)).

### 1.3.1 Récepteurs de la mélatonine

La mélatonine possède deux récepteurs, MT1 et MT2, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), appelés aussi récepteurs à sept domaines transmembranaires. Ils possèdent une homologie de séquence en acides aminés de 60% (Stankov *et al.*, 1990; Jockers *et al.*, 2016; Luchetti *et al.*, 2010). Ils sont exprimés dans plusieurs tissus comme la rétine, le foie, le thymus, les ovaires, la prostate, le cerveau, et le placenta (Dubocovich *et al.* 2005). Le MT3, que l'on croyait être un troisième récepteur de la mélatonine, est en fait l'enzyme quinone réductase 2 (NQO2) possédant un site de liaison pour la mélatonine. Le transcrit de NQO2 n'est pas exprimé dans le placenta humain (Nosjean *et al.*, 2000). MT1 et MT2 sont exprimés dans les cellules au niveau de la membrane cytoplasmique, au niveau nucléaire et au niveau mitochondrial.

Chez les mammifères, la mélatonine, via l'activation ou l'inhibition de MT1 et MT2, régule une variété de processus cellulaires et physiologiques incluant la vasoconstriction (Nelson *et al.*, 2001), la prolifération et la différenciation cellulaire (Fukunaga *et al.*, 2002), une action-anti-

inflammatoire (diminution du facteur de transcription pro-inflammatoire NFkB (nuclear factor B) et de la synthèse de cytokines) ainsi que les fonctions reproductives et métaboliques via différentes voies de signalisation (Stankov et al., 1990; Dubocovich et al., 2005). L'interaction entre la mélatonine et la quinone réductase (MT3), une enzyme détoxifiante, est possiblement impliquée dans la régulation du statut redox cellulaire, mais le rôle de cette interaction reste encore à étudier. L'interaction entre la mélatonine et la calmoduline est de faible affinité, mais elle peut être impliquée dans son action antioxydante et dans d'autres voies de signalisation tel que les réarrangements du cytosquelette et l'assemblage de microtubules (Tan et al., 2007; Luchetti et al., 2010, (Huerto-Delgado *et al.*, 1994)).

### 1.3.2 Rôles non-circadiens de la mélatonine

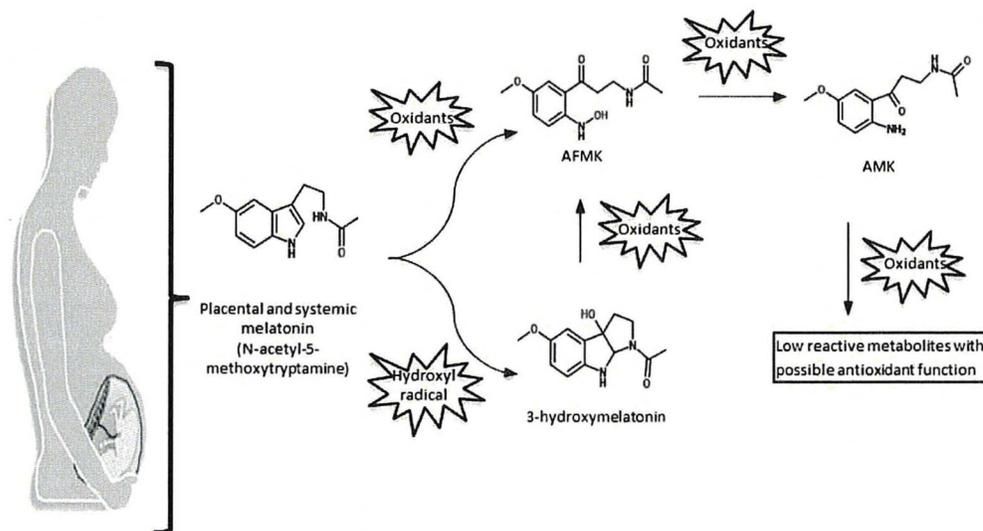
La mélatonine est amphiphile, soit hydrophile et lipophile à la fois, ce qui lui permet d'agir dans tous les compartiments cellulaires. Elle passe toutes les membranes biologiques, incluant la barrière hémato-encéphalique et le placenta (Reiter et al., 1997). La mélatonine est surtout connue pour ses propriétés antioxydantes (Galano et al., 2011) mais dans certaines circonstances, elle peut aussi être pro-oxydante. Ceci est au coeur du sujet de ce mémoire, qui va se concentrer sur le rôle de la mélatonine et son action anti-tumorale en relation avec le stress oxydatif.

#### 1.3.2.1 La mélatonine antioxydante

La mélatonine est un puissant antioxydant. Elle agit de façon **directe** sur les radicaux libres, mais elle peut aussi agir de façon **indirecte**, via l'activation de ses récepteurs qui stimulent l'expression des enzymes antioxydantes (Richter et al., 2009; Rodriguez et al., 2004). Les métabolites de la mélatonine sont également des piègeurs d'EROs et d'ERAs. La mélatonine et ses métabolites créent une cascade d'antioxydants pour prévenir les dommages causés par l'excès de stress oxydatif (Fig. 11) (Tan et al., 2002; Sagrillo-Fagundes et al., 2014).

En effet, non seulement la mélatonine, mais aussi ses métabolites sont des 'scavengers'/neutralisateurs de radicaux libres : Elle est alors la progénitrice d'une série

de désactivateurs de radicaux libres fonctionnant en cascade afin de prévenir les dommages causés par les radicaux libres (Fig. 11) (Tan et al., 2002). Par exemple, lorsque la mélatonine capte une molécule de  $\bullet\text{OH}$ , elle est convertie en 3-hydroxymélatonine, un métabolite non-réactif, qui réagit avec un autre radical libre. Ceci génère une N<sup>1</sup>-acétyle-N<sup>2</sup>-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK) qui est aussi un puissant antioxydant. L'AFMK capte les EROs et forme une N<sup>1</sup>-acétyle-5-méthoxykynuramine (AMK) (Fig.11).



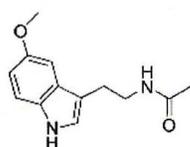
**Figure 11: Cascade antioxydante de la mélatonine.** Activité antioxydante retrouvée au niveau de plusieurs organes, dont le placenta. Les métabolites de la mélatonine possèdent également une action antioxydante importante. AFMK : N<sup>1</sup>-acétyle-N<sup>2</sup>-formyl-5-méthoxykynuramine, AMK: N<sup>1</sup>-acétyl-5-méthoxykynuramine. Tirée de (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2014).

Les mécanismes par lesquels la mélatonine et ses dérivés protègent contre le stress oxydatif incluent la neutralisation directe des radicaux libres et leurs produits, l'induction de l'expression des enzymes antioxydantes, la réduction de l'activation des enzymes pro-oxydantes ainsi que la régulation de l'homéostasie mitochondriale (Tan *et al.*, 2016).

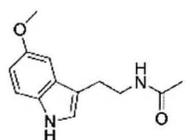
### 1.3.2.1.1 Action directe ou récepteur-indépendant de la mélatonine

La mélatonine est une molécule polyvalente et est capable de neutraliser plusieurs radicaux libres par deux mécanismes essentiellement:

- 1) Le transfert d'électron unique (*single electron transfer* ; SET): (R=Radical).



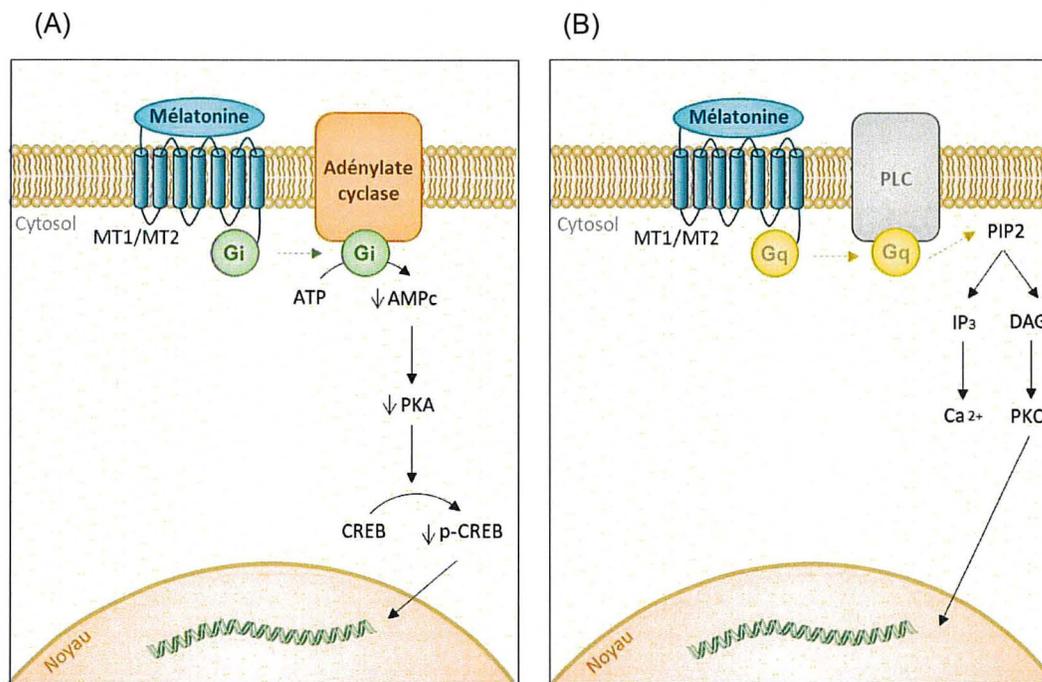
- 2) La Réaction d'addition et formation d'adduit intramoléculaire (*Radical adduct formation* ; RAF).



Le transfert d'électron unique (SET) est considéré comme le principal mécanisme antioxydant de la mélatonine et ses dérivés (L-tryptophane, sérotonine). Ce mécanisme se caractérise par le don d'un électron de la mélatonine au radical et la réduction conséquente de la réactivité de celui-ci et la formation d'un radical moins réactif de la mélatonine (mélatonine<sup>·+</sup>). Le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) produit dans l'espace intracellulaire, par les UV ou les radiations ionisantes, est connu comme étant le plus néfaste des EROs et la mélatonine le neutralise par la réaction RAF. Ce radical est inactivé par son association aux sites carbone de la mélatonine (Sagrillo-Fagundes et al., 2014). Enfin, la mélatonine a accès aux sites majeurs de la production des EROs; la mitochondrie où la synthèse de cette indolamine a été démontrée (Reiter et al, 2014).

### 1.3.2.1.2 Action indirecte ou récepteur-dépendant de la mélatonine

La mélatonine via l'activation de ses récepteurs MT1 et MT2, augmente l'expression et l'activité des différentes enzymes antioxydantes selon deux voies (Richter *et al.* (2009); Rodriguez *et al.* (2004)). L'activation de ces récepteurs, via la protéine G inhibitrice (Gi), inhibe l'adénylate cyclase et réduit l'AMP cyclique (AMPc). Ce qui résulte en une inhibition de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle des facteurs de transcription des enzymes antioxydantes. MT1 et MT2 peuvent aussi activer la protéine Gq, induisant l'activation de la voie de la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC) (Fig.12).



**Figure 12: Voies de signalisation modulées par la mélatonine et ses récepteurs.** (A) La mélatonine active les récepteurs MT1 et MT2 via la protéine G inhibitrice (Gi). Ceci inhibe l'adénylate cyclase et réduit l'AMP cyclique (AMPc). Ceci résulte en une inhibition de la protéine kinase K (PKA) et la protéine ubiquitaire CREB agissant comme facteur de transcription. Cette voie active la transcription des gènes des enzymes antioxydantes et l'augmentation de leurs concentrations. (B) La liaison de la mélatonine aux récepteurs MT1/MT2 peut aussi activer la voie de la phospholipase C (PLC) via la protéine Gq. Ceci induit une augmentation de la concentration de calcium Ca<sup>2+</sup> et une phosphorylation de la protéine kinase C (PKC) et une induction de la transcription des gènes d'enzymes antioxydantes (Rodriguez *et al.*, 2004). Figure par Josianne Bienvenue-Pariseault.

En résumé, la mélatonine possède les meilleures caractéristiques d'un neutralisateur de radicaux libres: (1) elle est largement distribuée dans le corps et est présente en concentrations adéquates; (2) elle est un antioxydant à large spectre; (3) elle est facilement transportée à travers les membranes cellulaires; (4) elle peut être régénérée après neutralisation de radicaux libres et ses métabolites sont aussi des antioxydants.

### 1.3.2.2 La mélatonine pro-oxydante

Bien que la majorité des études ont montré la capacité antioxydante de la mélatonine et ses métabolites, d'autres études utilisant ont trouvé que la mélatonine, à des concentrations pharmacologiques de l'ordre des  $10^{-6}$  M à  $10^{-3}$  M, induit la production des EROs dans les cellules tumorales et non-tumorales (Tableau 1). En outre, l'action pro-oxydante dans les cellules tumorales de la mélatonine passe par l'induction du stress oxydatif les menant ainsi à la mort par apoptose (Casado-Zapico *et al.*, 2010); Dziegiel *et al.*, 2003).

Medina-Navarro *et al.*, ont été les premiers à démontrer une action pro-oxydante de la mélatonine dans les érythrocytes (Medina-Navarro *et al.*, 1999). Les auteurs suggèrent que cette action pro-oxydante n'est pas médiée par une interaction directe de la mélatonine avec les radicaux libres, mais plutôt par une régulation des systèmes de défense antioxydants. Wolfler *et al.*, ont montré que des concentrations élevées de mélatonine (10 à 1000 $\mu$ M) induisent la production des EROs ainsi que l'apoptose via la voie Fas (CD95) dans des cellules leucémiques Jurkat (Wölfler *et al.*, 2001). À des concentrations plus faibles, moins de 10  $\mu$ M, la mélatonine n'induit pas une production d'EROs dans ces cellules (Wölfler *et al.*, 2001). L'équipe de Clapp-Lilly *et al.*, ont montré que cette indolamine augmente les marqueurs du stress oxydatif : une augmentation des niveaux de l'enzyme hème oxygénase et du fer redox- dans une culture d'explants de cerveau de rats atteints de la maladie d'Alzheimer. Cependant, à moins de 100  $\mu$ M, la mélatonine diminue plutôt ces dommages cellulaire (Clapp-Lilly *et al.*, 2001)

Tableau 1 : Études dans lesquelles la mélatonine a été rapportée en tant que pro-oxydant.

Type cellulaire	Concentration de mélatonine	Effet observé	Référence
<b>HepG2</b>	0,1-10 µM 1-10 mM	↓ viabilité cellulaire (96h) ↓GSH, ↑EROs (15 min)	(Osseni <i>et al.</i> , 2000)
<b>Jurkat</b>	0,1-1 mM	↑EROs, ↓GSH, ↑Apoptose induite par Fas	(Wölfler <i>et al.</i> , 2001)
<b>Explants de cerveau de rat Alzheimer</b>	1 mM	↑Fer redox-actif; ↑ Hème oxygénase	(Clapp-Lilly <i>et al.</i> , 2001)
<b>CMK, Jurkat, MOLT-4</b>	1 mM	↑ Cytotoxicité, ↑EROs, ↑ Peroxydation des lipides	(Büyükcavcı <i>et al.</i> , 2006)
<b>U937</b>	1 mM	↑EROs, ↓GSH ↑EROs, ↑ 5-LOX, ↑PLA2, ↑ Ac.arachidonique, ↔ stress oxydatif, ↔ viabilité cellulaire ↑ NFκB	(Albertini <i>et al.</i> , 2006) (Radogna <i>et al.</i> , 2009a) (Cristofanon <i>et al.</i> , 2009)
<b>Lignée de cellules hématopoïétiques tumorales</b>	1 mM	↓ viabilité cellulaire, ↑EROs, ↑ activité des caspases	(Bejarano <i>et al.</i> , 2009)
<b>KKU-M055, KKU-M214</b>	0,5-2 mM	↑EROs	(Laothong <i>et al.</i> , 2015)
<b>Lignée de cancer colorectal</b>	1mM	↑ O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	(Wenzel <i>et al.</i> , 2005)
<b>Cellule parasitaire : Leishmania</b>	25-50 µM	↑ toxicité parasitaire, ↓ respiration mitochondriale, ↑ ouverture du canal mitochondriale induite par Ca <sup>2+</sup>	(Elmahallawy <i>et al.</i> , 2014)

HepG2 : lignée cancéreuse hépatique, U937 : Lignée de leucémie, CMK : *human myeloid leukemia cell line*, KKU-M055, KKU-M214 : lignées cellulaires de cholangiocarcinome.

La mélatonine fonctionnerait ainsi comme un pro-oxydant conditionnel. Les mécanismes derrière cette action restent à être étudiés, mais certaines hypothèses ont été émises. La mélatonine stimulerait la production des EROs via une inhibition directe de la calmoduline. L'étude de Radogna et al., a montré que la mélatonine se lie à la calmoduline et induit une augmentation des EROs dans les leucocytes U937 (Radogna *et al.*, 2009a). La

mélatonine interagit aussi avec le troisième complexe mitochondrial (C III) et le pore de transition mitochondrial entraînant une augmentation de la production des EROs. Un autre mécanisme connu implique l'activation de la phospholipase PLA2 médiée par la calmoduline menant à la production d'EROs induite par la lipoxigénase 5-LOX. L'induction de la production des EROs par la mélatonine dans un contexte in-vivo n'est pas encore documentée (Zhang & Zhang, 2014).

### 1.3.2.3 Mélatonine et cancer

En ayant une activité anti-oxydante, la mélatonine a un effet protecteur du cancer dans les cellules saines, étant donné que le stress oxydatif est impliqué dans les phases d'initiation, de promotion et de progression de la carcinogenèse. Cette même action a aussi été observée dans certains types de cancers tels que le cancer des ovaires (Barberino *et al.*, 2017) et d'autres où la mélatonine inhibait la prolifération de ces cellules cancéreuses. Cependant, dans d'autres types de cancers, dont la leucémie aigüe (Wölfler *et al.*, 2001), le cancer hépatique (Osseni *et al.*, 2000); les lymphomes (Radogna *et al.*, 2009a) et le cancer colorectal (García-Navarro *et al.*, 2007), l'action anti-tumorale est médiée par une induction du stress oxydatif afin d'induire des dommages cellulaires menant à l'apoptose des cellules. Dans ces mêmes organes, la mélatonine protège les cellules saines par son action antioxydante. La mélatonine régule alors différemment le statut redox cellulaire, dépendamment du type de tumeurs (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

Dans les cellules tumorales, la mélatonine exerce des actions inverses à celles qu'elle possède au niveau des cellules normales. Elle est pro-oxydante, pro-inflammatoire, inductrice de dysfonctions mitochondriales et du stress du réticulum endoplasmique (RE) et agit, par conséquent, comme une molécule pro-apoptotique (Reiter *et al.*, 2017). Cette indolamine induit donc l'apoptose, via l'augmentation du stress oxydatif, l'inflammation, le stress du RE et les dysfonctions mitochondriales. Ceci a été rapporté, entre autres, dans le cancer colorectal, hépatocellulaire, le cancer du sein ainsi que des carcinomes ovariens, le neuroblastome, les mélanomes et la leucémie (Cutando *et al.*, 2012). Dans les cellules du cancer du sein, il a été démontré que la mélatonine influence aussi le

microenvironnement immunitaire afin de limiter la croissance de ces cellules et altère les fonctions bioénergétiques des mitochondries. (Blask *et al.*, 1997; Kubatka *et al.*, 2018).

La mélatonine agit comme une 'tueuse intelligente'. Elle module les processus anti-apoptotiques dans les cellules normales et induit ceux pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses (Lanoix *et al.*, 2012). Dans des cellules tumorales en culture, il a été rapporté que la mélatonine inhibe la prolifération ou favorise l'apoptose et que parfois, elle présente ces deux effets à la fois. La mort cellulaire programmée ou l'apoptose est un processus dans lequel des stimuli du développement ou de l'environnement activent un programme génétique pour mettre en œuvre une série spécifique d'événements qui aboutissent à la mort cellulaire. La mélatonine induit la mort cellulaire programmée dans différents types de cellules cancéreuses comme les cellules myéloïdes HL-60 (Bejarano *et al.*, 2009), du cancer colorectal (García-Navarro *et al.*, 2007), du cancer de la prostate (Kim C *et al.*, 2010) et du lymphome B (Radogna *et al.*, 2009a). Bien que le mécanisme exact par lequel la mélatonine induit l'apoptose reste à être élucidé, son activité pro-oxydante constitue un mécanisme pouvant être impliqué dans la mort par apoptose des cellules tumorales via l'apoptose mitochondriale et le stress oxydatif.

Dans certains types de cancers, les tumeurs sont peu sensibles à la mélatonine. Celle-ci exerce alors un effet oncostatique, inhibant la prolifération des tumeurs (Bondy & Campbell, 2018). Ceci a été démontré au niveau de certaines tumeurs où, à faibles concentrations, la mélatonine freine le développement des tumeurs sans induire l'apoptose, alors qu'à des concentrations plus élevées, cette indolamine induit plutôt la mort cellulaire. Des faibles concentrations de mélatonine peuvent inhiber la croissance ainsi que la prolifération dans plusieurs cellules cancéreuses, mais certaines exceptions se présentent. En effet, certaines lignées cancéreuses sont peu ou insensibles aux faibles concentrations mélatoninergiques, en revanche, elles répondent à des concentrations plus élevées et voient leur prolifération diminuée (Bizzarri *et al.*, 2013).

Au niveau du placenta et de manière intéressante, les cellules cancéreuses trophoblastiques dont la lignée BeWo, répondent différemment à la mélatonine (1mM) en comparaison aux primocultures de cellules trophoblastiques (Lanoix *et al.*, 2012). Dans

les BeWo, la mélatonine induit l'apoptose, tandis que dans les primocultures en situation de stress hypoxique, elle l'inhibe. (Lanoix, Lacasse et al. 2012; Choi et al., 2008; Proietti et al., 2013; Rodriguez et al., 2013). Le mécanisme derrière cette action est le cœur du sujet de ce mémoire.

### **1.3.3 Mélatonine et mitochondrie**

En 2013, Tan et collaborateurs ont émis l'hypothèse que les mitochondries seraient de point de vue évolutif, le site original de la production de mélatonine dans les cellules eucaryotes. L'effet de la mélatonine sur la mitochondrie serait donc conservé au cours de l'évolution. Ils ont suggéré que la mélatonine a été premièrement produite dans l'espace intermembranaire mitochondrial puis a migré au cytoplasme avec l'évolution des eucaryotes (Tan *et al.*, 2013). Depuis 1975, il a aussi été rapporté que l'une des enzymes fonctionnelles, l'AANAT de la production de mélatonine est présente au niveau des mitochondries (Kerenyi *et al.*, 1975). Ceci a aussi été démontré au niveau des mitochondries des oocytes de souris (He *et al.*, 2016). En 2017, on a également démontré la présence des récepteurs MT1 et MT2 au niveau de la membrane mitochondriale des cellules neuronales (Suofu *et al.*, 2017).

La production de mélatonine au niveau mitochondrial est très intéressante. Comme les mitochondries sont la source majeure de production de radicaux libres, la mélatonine, ayant un pouvoir antioxydant, est idéalement localisée pour maintenir l'homéostasie dans cette organelle (Tan *et al.* (2013); Sagrillo-Fagundes *et al.* (2014)). De plus, les membranes mitochondriales, riches en phospholipides, sont très sujettes à l'oxydation. La mélatonine les protège alors contre la peroxydation lipidique et empêche, par conséquent, la liquéfaction des membranes mitochondriales.

Dans les cellules neuronales, hépatiques et cardiaques soumises à une H/R, on a aussi démontré que la mélatonine protège de la dysfonction mitochondriale en rétablissant les fonctions bioénergétiques (Petrosillo *et al.*, 2006).

L'effet protecteur de la mélatonine a aussi été observé dans des cas d'obésité maternelle, associée à une augmentation du stress oxydatif et une diminution de la respiration mitochondriale placentaire. Au niveau de cultures de placentas obtenus de femmes enceintes obèses, Ireland et al., ont démontré qu'un traitement à la mélatonine améliore la respiration mitochondriale au niveau de primo-cultures de syncytiotrophoblastes des placentas de ces femmes. (Ireland *et al.*, 2018). En revanche, au niveau de cellules cancéreuses du sein, on a plutôt démontré qu'un traitement la mélatonine altère la respiration mitochondriale afin de mener à l'apoptose (Scott *et al.*, 2001). Des études *in-vitro* et *in-vivo* ont démontré que la mélatonine exogène renverse les dysfonctions mitochondriales en diminuant le stress oxydatif et l'inhibition de l'ouverture du pore de transition mitochondrial (mPTP) qui module la mort cellulaire par la libération du cytochrome c (Govender *et al.*, 2014).

#### **1.3.4 Mélatonine et stress oxydatif dans le système reproducteur**

Les EROs sont localement produites lors de la rupture du follicule mature au moment de l'ovulation où ils jouent également un rôle important comme seconds messagers (Brännström and Norman (1993); Hensley *et al.* (2000)). Mais, une augmentation anormale des radicaux libres peut induire un stress oxydatif endommageant les différentes structures ovocytaires et folliculaires. Les EROs doivent alors être constamment neutralisées afin d'éviter leurs dommages cellulaires et étant donné que la mélatonine est produite par les ovaires et qu'elle est connue pour ses importantes propriétés antioxydantes, elle aide à les neutraliser. Dans la majorité des cas, la mélatonine exerce ses effets antioxydants via ses récepteurs, mais, comme décrit auparavant (Sections 1.3.2.1.1, et 1.3.2.1.2), elle peut également exercer sa fonction de neutralisateur d'EROs de façon récepteur-indépendante.

##### **1.3.4.1 Mélatonine, grossesse et placenta**

Durant la grossesse, plusieurs changements physiologiques chez la femme enceinte ont lieu afin de supporter le développement fœtal et de s'adapter au stress imposé par la

grossesse. La mélatonine joue d'importants rôles, surtout quant aux changements touchant les systèmes endocriniens, le métabolisme et la température corporelle (Mark *et al.*, 2017). Elle est aussi importante pour assurer une bonne qualité de l'oocyte, elle intervient dans l'implantation de l'embryon, au développement embryonnaire et la parturition (Carlomagno *et al.*, 2018).

Il a été remarqué que les taux de cette indolamine augmentent au cours de la grossesse jusqu'à atteindre un maximum à terme. Les niveaux plasmatiques de mélatonine sont aussi plus élevés chez les femmes enceintes, en comparaison avec ceux des femmes non-enceintes (Kivelä (1991); Ogasawara *et al.* (1991)). Les grossesses gémellaires présentent des taux nocturnes de mélatonine plus élevés que les grossesses non-gémellaires. Il est aussi à noter que les taux de la mélatonine chutent après l'accouchement, suggérant alors que l'élévation des taux plasmatiques mélatoninergiques durant la grossesse sont placentaires (Nakamura *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2008). Dans ce sens, notre équipe a montré en 2008 que la mélatonine est produite par les cellules trophoblastiques du placenta, qui expriment également ses récepteurs MT1 et MT2 (Lanoix *et al.*, 2008a; Soliman *et al.*, 2015). En 2005, l'équipe de Iwasaki *et al.*, ont démontré l'expression des ARNm des enzymes de synthèse de la mélatonine AANAT et ASMT au niveau du placenta de premier trimestre de grossesse (Iwasaki *et al.*, 2005). Ceci suggère que l'élévation continue des niveaux mélatoninergiques tout au long de la grossesse et la chute de ces niveaux après l'accouchement est d'origine placentaire. Notre équipe a aussi que la production de la mélatonine et l'expression de ses récepteurs MT1 et MT2 sont altérés en cas de prééclampsie. En cas de cette maladie, les niveaux mélatoninergiques maternels sont plus bas comparés à ceux des grossesses normo-tensives. Cette chute est due à une inhibition de l'expression et l'activité respectives de l'enzyme limitante de synthèse de la mélatonine AANAT (Lanoix, Guérin, and Vaillancourt 2012).

Les effets de la mélatonine sont innombrables durant la grossesse, allant de la régulation circadienne jusqu'à la protection fœtale. En effet, la grossesse est influencée par le système circadien. Ce dernier coordonne la physiologie et le comportement en fonction des changements environnementaux quotidiens prévisibles, tels que les cycles

lumière/obscurité. Par exemple, la plupart des espèces accouchent à une heure précise de la journée (McCarthy *et al.*, 2019). Un désalignement circadien, dont la synthèse de mélatonine, provoque des perturbations maternelles dans l'organisation temporelle de nombreux processus physiologiques qui ont été associés à un risque accru de complications de la grossesse. McCarthy *et al.*, ont énuméré les preuves que la mélatonine aide à réguler les systèmes circadiens maternels et fœtaux ainsi que le moment de la naissance (McCarthy *et al.*, 2019). On a longtemps considéré que la synchronisation des rythmes de mélatonine maternels et fœtaux reflète le passage transplacentaire de la mélatonine maternelle au fœtus (Mark *et al.*, 2017). En 2005, Iwasaki *et al.* ont démontré l'expression de l'ARNm des enzymes de synthèse de la mélatonine (AANAT et ASMT) dans le tissu placentaire de premier trimestre de la grossesse (Iwasaki *et al.*, 2005) et en 2008, notre laboratoire a montré que la mélatonine est produite par les cellules placentaires qui expriment aussi ses récepteurs MT1 et MT2. (Lanoix *et al.*, 2006; (Lanoix *et al.*, 2008b) Soliman *et al.*, 2015). Cette indolamine possède une action autocrine, paracrine et intracrine au niveau du placenta. La mélatonine diminue la perte des CTBv en augmentant leur résistance au processus d'apoptose intrinsèque (Lanoix *et al.*, 2012) de manière MT1 MT2 dépendante.

Par conséquent, la mélatonine est considérée comme un agent maternel clé qui transmet les informations circadiennes au fœtus (McMillen and Nowak (1989); Kennaway *et al.* (1992); Serón-Ferré *et al.* (2012)). Des séries d'études ont démontré d'importants effets régulateurs de la mélatonine sur le SNC fœtal chez l'humain (Torres-Farfan *et al.* (2011); Mendez *et al.* (2012); Serón-Ferré *et al.* (2012)), que l'administration de mélatonine exogène à des hamsters en gestation présentant des lésions du SNC peut entraîner une rythmicité de la progéniture (Davis & Mannion, 1988), que la mélatonine exogène synchronise l'expression des gènes d'horloge biologique au niveau du SNC fœtal mais pas dans le foie fœtal (Mark *et al.*, 2017).

En outre, la mélatonine participe aussi aux contractions utérines. En effet, l'activation du récepteur MT2 et de celui de l'ocytocine (OTR) augmente la disponibilité de l'actine. Cette dernière se lie à la myosine et induit la contractilité musculaire. On a alors une activation, au niveau des cellules du myomètre, de la voie de la phospholipase C (PLC)/

phosphokinase C (PKC) (Sharkey *et al.* (2010); Sharkey *et al.* (2009)). *In vitro*, cette contractilité des cellules du myomètre a été mise en évidence par des co-traitements d'ocytocine et mélatonine.

## **2. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS**

### **2.1 Problématique**

Notre équipe a précédemment démontré que la mélatonine est produite par le placenta, au niveau duquel elle assure différents rôles. En effet, dans les cellules placentaires saines, la mélatonine a démontré une action antioxydante (Lanoix *et al.*, 2013), anti-tumorale (Lanoix *et al.*, 2012) et anti-inflammatoire (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2018).

Le stress oxydatif est un phénomène cellulaire ayant lieu lorsque les défenses antioxydatives endogènes ne peuvent contrecarrer les espèces oxydatives (EROs et ERAs), causant ainsi différents dommages aux protéines, lipides et ADN et altérant les fonctions mitochondriales. La mélatonine a été longtemps décrite comme un puissant antioxydant capable d'assurer une protection des cellules saines contre le stress oxydatif assurant leur homéostasie ainsi que leur survie. Cependant, dans plusieurs cas de cancers tel que le cancer hépatique (Osseni *et al.*, 2000) ou la leucémie (Wölfler *et al.*, 2001) et plusieurs autres, la mélatonine a démontré un rôle antitumoral par une augmentation du stress oxydatif au niveau de ces cellules. Mais, cette action n'a jamais été démontrée au niveau des cellules de choriocarcinome placentaire humaines. Dans cette étude on a utilisé la lignée de choriocarcinome placentaire, BeWo, car c'est l'un des meilleurs modèles d'étude de cette tumeur ainsi que l'un des plus utilisés.

### **2.2 Hypothèse**

En tenant compte des résultats précédents de notre équipe de recherche ainsi que les données de la littérature, l'hypothèse de recherche de cette maîtrise est:

- La mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules de choriocarcinome placentaire humaines entraînant des dommages cellulaires et mitochondriaux.

### 2.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont de déterminer dans la lignée cellulaire de choriocarcinome placentaire humain BeWo si la mélatonine :

1. Augmente les niveaux de stress oxydatif : les niveaux d'EROs cellulaires et l'expression de l'enzyme pro-oxydante (XO) et diminue l'expression des enzymes antioxydantes.
2. Augmente la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines.
3. Augmente la respiration mitochondriale.

### **3.MÉTHODOLOGIE**

#### **3.1 Culture cellulaire**

Les cellules BeWo clone CCL-98 (passage P7 à P17) de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 sans rouge de phénol, supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS; Hyclone, Tempe, AZ). Les cellules BeWo ont été cultivées dans des plaques 6 puits (Corning, NY, USA) à une densité de 600 000 cellules/puits ou en plaques 96 puits à une densité de 25 000 cellules/puits, en condition de normoxie (8% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 87% N<sub>2</sub>) dans les chambres incubatrices (*Modular Incubator Chambers*) pendant 24 h pour assurer leur adhérence. Les cellules ont ensuite été traitées avec différentes concentrations de mélatonine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) : 0, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> ou 10<sup>-9</sup> M diluée dans le véhicule diméthyl sulfoxyde (DMSO; Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 0,1%. Les cellules ont été soumises ou pas à 4 h d'hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) suivies d'une réoxygénation de 20 h (8% O<sub>2</sub>) dans des chambres incubatrices (Billups-Rothenberg, San Diego, CA). L'hypoxie/réoxygénation (H/R), un puissant stimulant du stress oxydatif et de l'apoptose mitochondriale, est utilisée dans cette étude comme contrôle positive de stress oxydatif.

#### **3.2 Analyse des niveaux des Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs)**

Les niveaux des EROs ont été mesurés par le réactif Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen, Burlington, ON) détectant le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le peroxyne ONOO<sup>-</sup> et l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Après 24 h de traitement à la mélatonine, les cellules BeWo ont été rincées au tampon phosphate salin PBS 1X et incubées avec 10 µM de diacétate de 5-(et-6)-carboxy-20,70-dichlorodihydrofluorescéine, diluée dans du DMSO, pendant 40 minutes à 37°C conditions normoxiques (8% O<sub>2</sub>). La fluorescence a été mesurée au fluorimètre (SpectraMax M5, Molecular devices, San Jose, CA) aux longueurs d'ondes Ex/Em= 485/535 nm.

### **3.3 Mesure des niveaux cellulaires du Glutathion (GSH) réduit**

Une solution stock de monochlorobimane 100mM (mCB, #69899 Sigma) a été diluée dans du DMSO et conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La solution de mCB a été fraîchement diluée dans du milieu DMEM complet à  $100\ \mu\text{M}$ . Après 24 h de traitement à la mélatonine, les cellules BeWo ont été rincées au PBS 1X milieu et incubées avec le milieu contenant la sonde mCB à  $8\% \text{O}_2$  à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h de temps. Les cellules ont été rincées au PBS 1X et la fluorescence a été mesurée au fluorimètre (SpectraMax M5, Molecular devices, San Jose, CA) aux longueurs d'ondes Ex: 390 nm /Em: 478 nm.

Les niveaux de GSH-réduit diminuent lorsque ceux des radicaux libres augmentent. La quantité de GSH-réduit est donc inversement proportionnelle à la quantité d'EROs. En présence de GSH-réduit, la sonde mCB forme des adduits qui émettant de la fluorescence. L'émission fluorescente est donc inversement proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents.

### **3.4 Analyse des niveaux protéiques des enzymes pro- et anti-oxydantes par immunobuvardage de type Western**

Les cellules BeWo ont été rincées au PBS et lysées sur glace avec un tampon RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0,25% désoxycholate de sodium, 150 mmol/L NaCl and 1 mmol/L EDTA) contenant un cocktail d'anti-protéases et anti-phosphatases (Sigma-Aldrich). Les cellules ont ensuite été transférées dans des tubes froids et vortexées toutes les cinq minutes pendant 30 min. Pour s'assurer que la lyse cellulaire est complète, les cellules ont été passées au sonicateur 3 fois (Paramètres : pulse 05, 30 sec, amplification 50%).

La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA; Pierce Biotechnology, Waltham, MA). Par la suite, 30-40  $\mu\text{g}$  de protéines ont été séparées sur un gel gradient de polyacrylamide, *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels* (4–15%) (Bio-Rad, Saint-Laurent, QC). Les protéines séparées ont été transférées sur des membranes de Polyfluorure de vinylidène (PVDF, Bio-Rad) à l'aide du *TransBlot Turbo Transfer Pack* (BioRad). Les membranes ont ensuite été bloquées dans 5% de lait

écrémé dilué dans du tampon tris salin supplémenté de 0.1% du détergent Tween 20 (*Tris-buffered saline (TBS) 0.1% Tween 20, TBS-T*) pendant 1 h puis incubées toute la nuit avec les différents anticorps primaires (tableau 2). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin HRP (tableau 2) pendant 1 h. La révélation des membranes a été réalisée avec le Chemidoc XRS+ (Bio-Rad) avec le réactif de chimioluminescence ECL Clarity ou Clarity max (Bio-Rad). Les bandes obtenues ont été quantifiées en utilisant le logiciel Image Lab 6.0 (Bio-Rad) et normalisées par rapport au protéines totales.

Tableau 2: Anticorps utilisés pour l'immunobuvardage de type Western.

Anticorps	Dilution	Source
<b>Anticorps primaires</b>		
Anti-GPx	1 :500	Abcam (ab22604)
Anti-SOD1	1 :500	Abcam (ab16831)
Anti-CAT	1 :1000	Abcam (ab16731)
Anti-XO	1 :500	Abcam (ab109235)
<b>Anticorps secondaire</b>		
Anti-rabbit-HRP	1 :2500	Millipore (AP307P)

GPx: Glutathione Peroxidase; SOD1: Superoxide Dismutase 1; CAT: Catalase; XO: Xanthine oxydase.

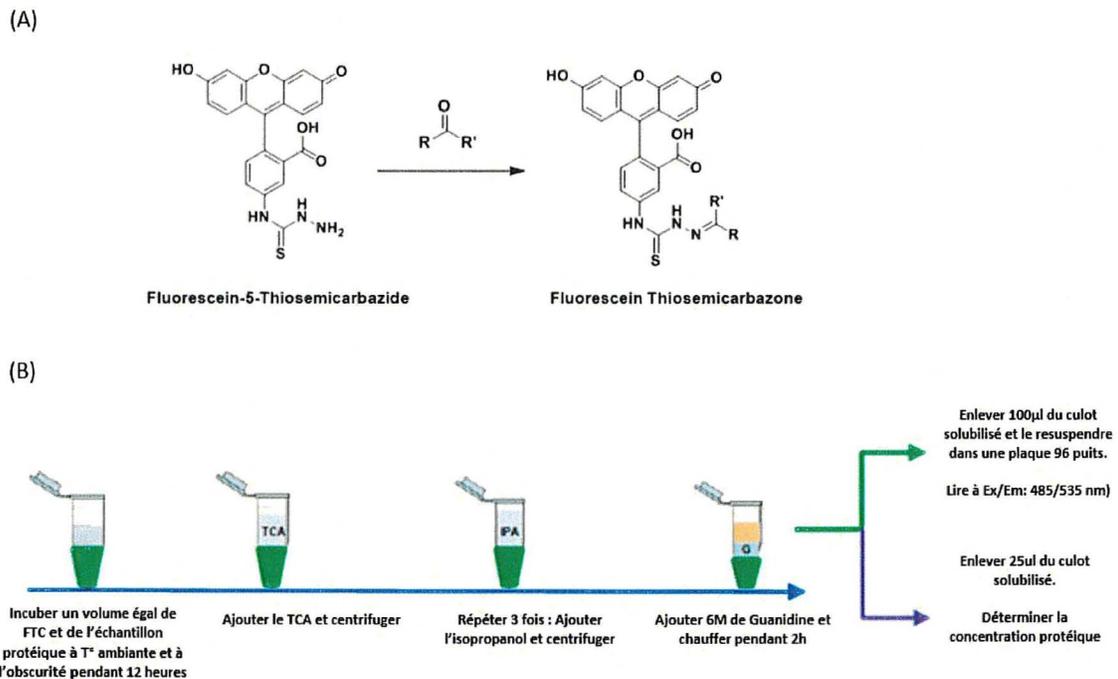
### 3.5 Analyse de la peroxydation des lipides

Les cellules BeWo ont été rincées au PBS 1X, décollées avec la trypsine TrypLE™Express (Life technologies, Carlsbad, CA) puis centrifugées à 438 x g pendant 8 min. Les cellules ont ensuite été suspendues dans 200 µl d'eau déionisée puis passées au sonicateur (pulse 05, 30 sec, amplification 50%). Les lysats cellulaires ont été traitées à l'acide trichloracétique TCA 10% (FisherScientific, Fisher) supplémenté de 1 mM FeSO<sub>4</sub>. Les échantillons ont été incubés 15 min à 95°C dans un bain-marie sec, puis refroidies dans un bain de glace afin de précipiter les protéines. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 8 min. à 986 x g. De l'acide thiobarbiturique (TBA; 2-thiobarbituric acid, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; Sigma Aldrich) a été ajouté et les échantillons ont été incubés à 95°C

durant 20 min. avant d'être transférés dans un bain de glace. 150ul d'échantillons ont été déposés dans une microplaque noire de 96 puits. La fluorescence a été mesurée au fluorimètre (SpectraMax M5, Molecular devices, San Jose, CA) aux longueurs d'ondes Ex: 535/Em: 635.

### **3.6 Mesure de la carbonylation des protéines**

La carbonylation des protéines des cellules BeWo traitées à la mélatonine a été mesurée à l'aide du kit *Protein Carbonyl Content Assay* (K563, BioVision, Milpitas, CA) comme décrit dans le protocole de la compagnie (Fig. 13.B). En bref, les cellules ont été décollées, récoltées et la concentration protéique a été mesurée par la méthode BCA. La concentration protéique de tous les échantillons a ensuite été ajustée avec le tampon (*protein carbonyl assay buffer*). Puis, les cellules ont été incubés avec la sonde FTC (Fluoroscéine-5-Thiosemicarbazide) 0,2 mM, diluée dans du DMSO, toute la nuit à l'obscurité. Cette sonde devient fluorescente lorsqu'elle rencontre un groupement carbonyle (Fig. 13.A) Le lendemain, les protéines ont été précipitées avec du TCA 20% et centrifugées 10 min à 10 000 x g. Après une dilution dans de l'isopropanol et la centrifugation, les culots protéiques ont été séchés à l'air libre à température ambiante avant d'être resuspendus avec une solution de guanidine 6 M puis dilués avec un tampon (*sample dilution buffer*). La fluorescence a été mesurée au fluorimètre (SpectraMax M5, Molecular devices, San Jose, CA) à Ex/Em 485/535nm. Les valeurs de fluorescence ont été normalisées par rapport à la concentration en protéines, déterminée par la méthode BCA.

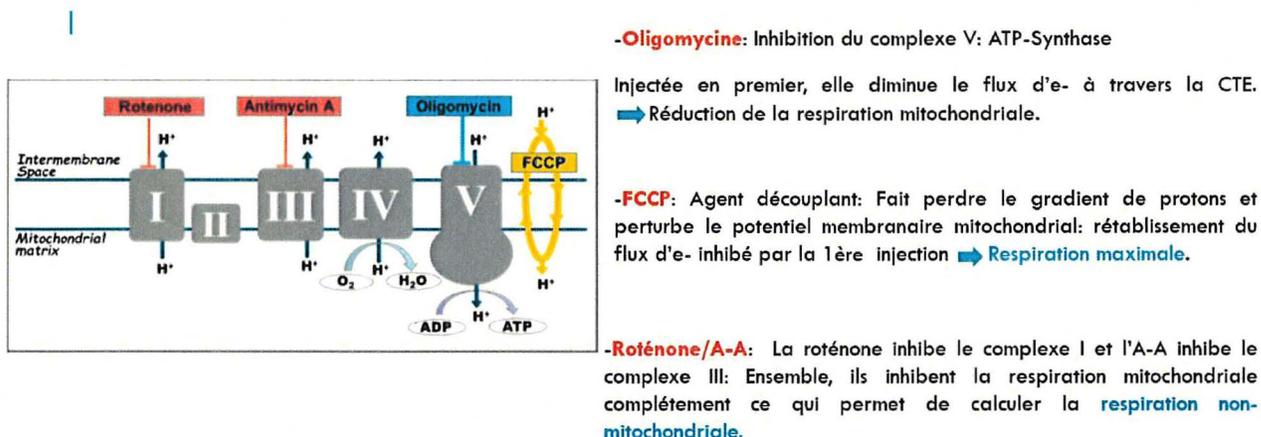


**Figure 13: Mesure de la carbonylation des protéines.** Adapté du protocole du kit de Biovision K563-100.

### 3.7 Évaluation de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale des cellules BeWo a été mesurée à l'aide de la technique Seahorse XF96 (Seahorse Bioscience, Agilent, Santa Clara, CA). Les cellules BeWo ont été cultivées à une densité de  $2,5 \times 10^4$  cellules/puits dans des plaques Seahorse 96XF et incubées pendant 24 h en normoxie (8%  $O_2$ ), puis traitées avec différentes concentrations de mélatonine. Une des plaques a ensuite été incubée en normoxie pour 24 h et la deuxième en H/R (4h à 0,5%  $O_2$  et 18h à 8%  $O_2$ ). Une heure avant l'essai Seahorse, le milieu des BeWo a été changé avec le milieu Seahorse XF (DMEM sans bicarbonate, non-tamponné, sans rouge de phénol) supplémenté de 10 mM de D-glucose, 2 mM de L-glutamine et 2 mM de pyruvate de sodium. Elles ont été incubées à 37°C pendant 1 h. Suite aux mesures de la respiration mitochondriale basale, les différents indicateurs de la fonction mitochondriale ont été mesurés, soient le taux de consommation d'oxygène, OCR (*Oxygen consumption rate*) par l'injection d'inhibiteurs sélectifs des complexes de la CTE et d'agents découplants : Oligomycine (1 µM), FCCP ou Cyanure de p-trifluoro méthoxyphényl hydrazone carbonyle (0,5 µM) et un mélange de roténone

(0,5  $\mu\text{M}$ ) et d'antimycine A (0,5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 14). Les valeurs d'OCR ont été normalisées par rapport à la quantité de protéines déterminée par la méthode BCA dans chaque puits.



**Figure 14: Fonctionnement de la méthode Seahorse de Agilent®. Créée par Fatma Kharrat.**

Les 3 injections effectuées aux cellules durant l'expérience sont des inhibiteurs de complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et des agents découplants. L'oligomycine, injectée en premier, inhibe l'ATP synthase ou le complexe V et réduit alors la respiration mitochondriale. Le FCCP, un agent découplant, fait perdre le gradient de protons et perturbe le potentiel membranaire mais lève l'inhibition causée par l'oligomycine. La 3<sup>e</sup> injection est un mélange de roténone, une molécule organique toxique inhibant le complexe I, et de l'antimycine A, une molécule bactérienne, inhibant le complexe III ou l'enzyme ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase (Image tirée du protocole du *Seahorse de Agilent®*).

Les cellules subissent trois différentes injections au cours de l'expérience (Fig. 14). L'injection d'oligomycine, inhibitrice du complexe V, diminue l'OCR et donc la respiration mitochondriale ce qui reflète la respiration indépendante de la phosphorylation oxydative. L'addition de l'agent découplant FCCP rétablit l'activité de la CTE et montre la respiration maximale. L'ajout de roténone/antimycine A inhibant les complexes mitochondriaux I et III respectivement, renseignent sur la respiration indépendante de la CTE (non-mitochondriale).

### **3.8 Analyses statistiques**

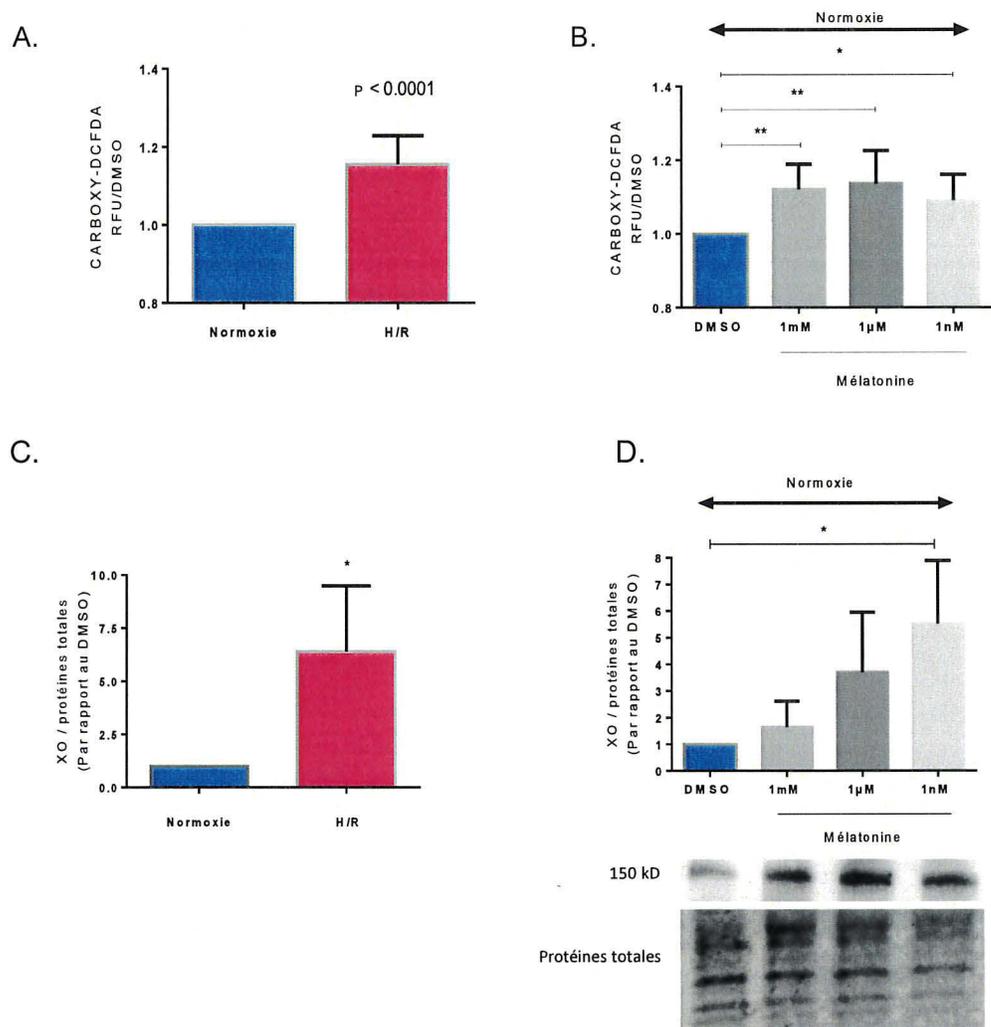
Les données sont issues de minimum 3 passages cellulaires différents de cellules BeWo. Les résultats sont exprimés par rapport au DMSO (véhicule contrôle) en normoxie. Les différences statistiques ( $P < 0,05$ ) des résultats paramétriques ont été déterminées par des tests t de Student suivis de tests post hoc de Dunn ou Kruskal Wallis. Les données ont été analysées en utilisant GraphPad Prism (version 6.0).

## 4. RÉSULTATS

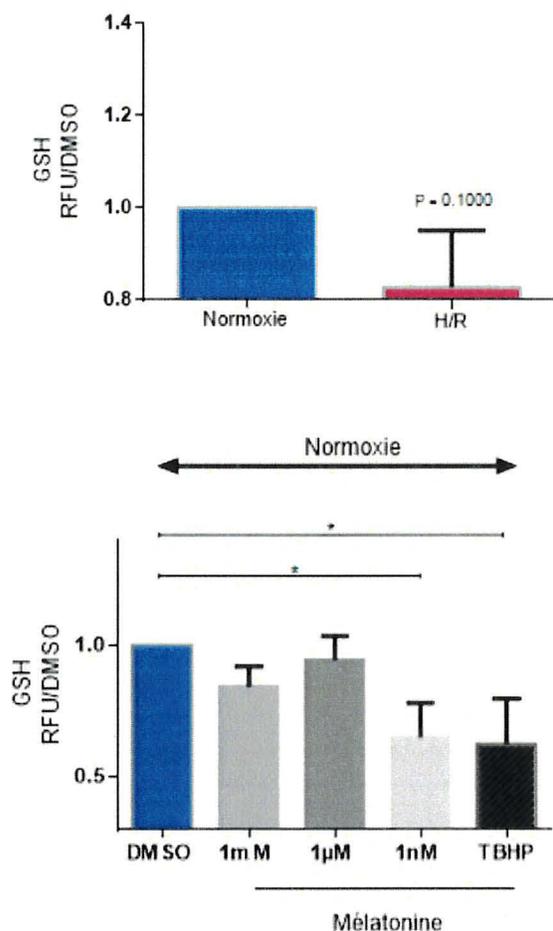
### 4.1 La mélatonine augmente les niveaux de radicaux libres dans les cellules BeWo

La fluorescence du Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA a montré que l'H/R augmente significativement les niveaux d'EROs par rapport à la normoxie ( $P < 0,0001$ ) et que cet effet est aussi observé avec un traitement de mélatonine à 1 mM ( $P \leq 0,01$ ), 1  $\mu$ M ( $P \leq 0,01$ ) et 1 nM ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 15A et 15B). La figure supplémentaire 1A a montré qu'un traitement à la mélatonine à 1 mM en H/R augmente significativement le niveau des EROs ( $P \leq 0,01$ ).

Étant donné que la XO est le générateur majeur d'EROs dans le placenta (Many *et al.*, 1996), son expression protéique a été déterminée par immunobuvardage de type Western. La figure 15C montre que son expression a été significativement augmentée en H/R ( $P = 0,0286$ ) en comparaison à la normoxie. En conditions normoxiques, la mélatonine a tendance à augmenter les niveaux de XO à 1 mM ainsi qu'à 1  $\mu$ m et significativement à 1 nM ( $P \leq 0,05$ ). L'effet de la mélatonine observé n'est pas dose-dépendant. La figure supplémentaire 1B montre que ses niveaux augmentent à 1 mM de mélatonine en H/R mais son effet est renversé à 1  $\mu$ M et 1 nM.



**Figure 15 : La mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo.** (A) Les niveaux relatifs des espèces réactives de l'oxygène EROs en condition de normoxie et d'hypoxie/réoxygénation H/R ont été déterminés par fluorimétrie grâce à la sonde 5-(6)-carboxy-20,70-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (carboxy-H2DCFDA) comme décrit dans la section de méthodologie. (B) Les niveaux relatifs des EROs après traitement à la mélatonine (1 mM, 1 μM et 1 nM) ont été mesurés en normoxie par Carboxy-H2DCFDA. (C) L'expression protéique de la xanthine oxydase XO a été déterminée par immunobuvardage de type Western en normoxie et en H/R. Les protéines totales ont été utilisées pour normaliser l'expression protéique, qui a été ensuite normalisée par rapport au DMSO. (D) Les taux de protéines de la XO après traitement à la mélatonine en normoxie déterminée par immunobuvardage de type western. Normoxie (8% O<sub>2</sub>) ; H/R (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8% O<sub>2</sub>). (A) et (B): Moyenne ± SD, N = 9; \*\*\*\*P≤0,0001; \*\*P≤0,01, \*P≤ 0,05. (C) et (D): Moyenne ± SD, N = 3; \*P≤ 0,05.



**Figure 16 : La mélatonine, tout comme l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP) diminue les niveaux intracellulaires de glutathion réduit (GSH), un dans les cellules BeWo.** (A) Les niveaux relatifs de GSH en condition de normoxie et d'H/R ont été déterminés par fluorimétrie grâce à la sonde de monochlorobimane mCB comme décrit dans la section de méthodologie. (B) Les niveaux de GSH après traitement à la mélatonine (1 mM, 1 µM et 1 nM) ont été mesurés en normoxie par fluorimétrie également. Normoxie (8%O<sub>2</sub>) ; H/R (4h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20h de 8%O<sub>2</sub>). (A) et (B): Moyenne ± SD, N = 3; \*P ≤ 0,05.

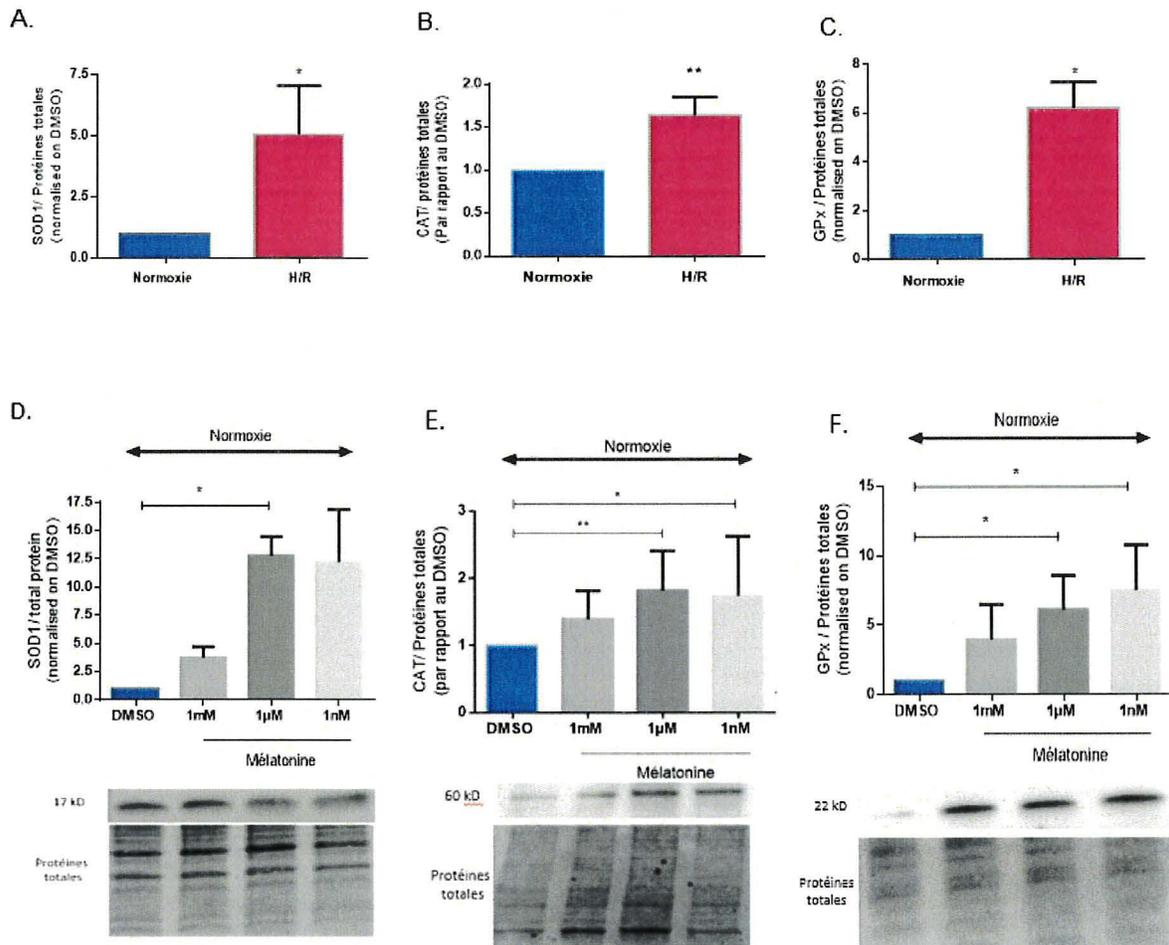
Les niveaux de glutathion réduit (GSH) sont inversement proportionnels aux niveaux des espèces réactives de l'oxygène. La figure 16 montre que les niveaux de glutathion, mesurés grâce à la sonde mCB, diminuent en H/R ainsi qu'avec les traitements à la mélatonine et que cet effet n'est pas dose-dépendant.

Les figures 15 et 16 montrent donc que la mélatonine, tout comme l'H/R exerce des effets pro-oxydants dans les cellules BeWo. Pour voir si la balance oxydative est maintenue au niveau de ces cellules, les niveaux des enzymes antioxydantes on a aussi analysés.

#### **4.2 La mélatonine mime les effets de l'H/R au niveau de l'expression des enzymes antioxydantes dans les cellules BeWo**

Les niveaux protéiques des enzymes antioxydantes SOD<sub>1</sub>, CAT et GPx sont respectivement augmentés par l'H/R ( $P = 0,0286$ ;  $P = 0,0048$ ;  $P = 0,0286$ ) (Fig. 17 A, B et C). Les figures 17D, E et F démontrent que la mélatonine en normoxie augmente significativement les niveaux d'expression protéique de la SOD1 à 1 $\mu$ M ( $P \leq 0,05$ ), de la CAT à 1 $\mu$ M ( $P \leq 0,01$ ) et à 1nM ( $P \leq 0,05$ ) et de la GPx à 1 $\mu$ M et 1nM ( $P \leq 0,05$ ) respectivement. L'effet observé de la mélatonine n'est pas dose-dépendant.

La mélatonine à une dose de 1 mM a le même effet que l'H/R sur les enzymes antioxydantes dans les cellules BeWo. Elle ne reverse alors pas les effets de l'H/R dans ces cellules, mais plutôt les mime.



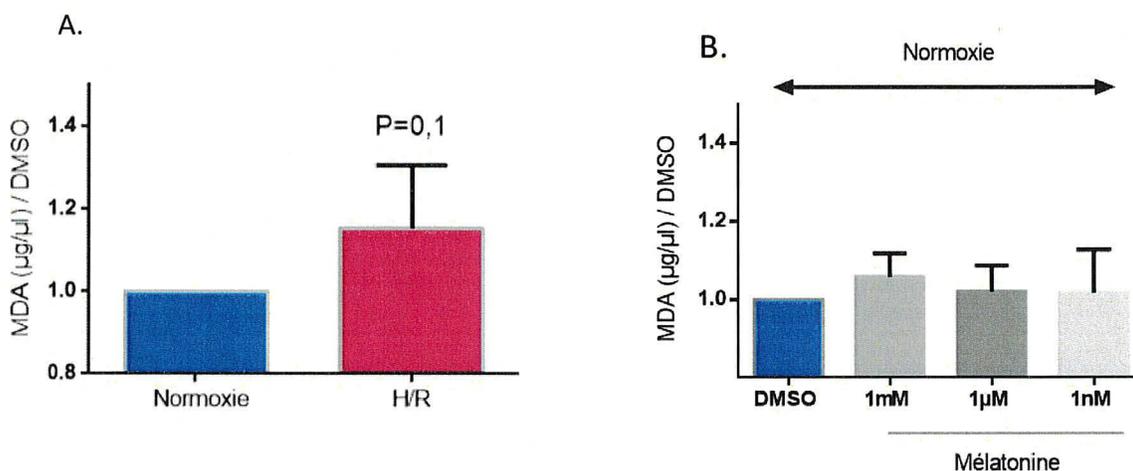
**Figure 17 : La mélatonine augmente les niveaux d'expression protéiques des enzymes antioxydantes dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo.** Les niveaux relatifs de l'expression protéique des enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) et glutathionne peroxydase (GPx), en condition de normoxie et d'hypoxie/réoxygénation H/R ((A), (B) et (C)) et à la suite d'un traitement à la mélatonine (E), (F) et (G)), ont été déterminés par immunobuvardage de type Western. Les niveaux de protéines totales sur la membrane de PVDF ont été utilisés pour normaliser l'expression protéique. Normoxie (8% O<sub>2</sub>) ; H/R (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8% O<sub>2</sub>). SOD1: Moyenne ± SD, N = 3; \* P ≤ 0,05. CAT: Moyenne ± SD, N = 5; \*P ≤ 0,05; \*\*P ≤ 0,01. GPx : Moyenne ± SD, N = 3; \* P ≤ 0,05.

### 4.3 Le traitement à la mélatonine cause des dommages cellulaires au niveau des cellules BeWo

Quand les niveaux des EROs dépassent les limites tolérées et qu'un stress oxydatif ait lieu, des dommages peuvent affecter les composantes cellulaires primordiales tels que les lipides, les protéines et même l'ADN (Burton & Jauniaux, 2011). La peroxydation

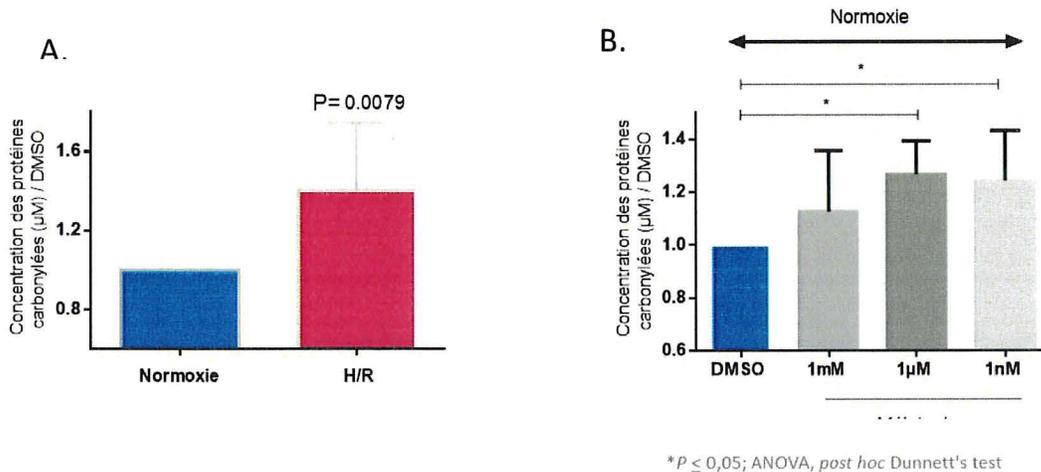
lipidique, un phénomène se produisant en présence d'oxygène, attaque les lipides contenant les acides gras insaturés. Ce phénomène affecte surtout les membranes plasmiques et les altère en modifiant leur perméabilité et leur fluidité.

La peroxydation des lipides a été mesurée par le test TBARS. La mélatonine n'a aucun effet significatif n'a été observé, mais on peut voir une tendance à l'augmentation de ce dommage oxydatif en H/R et également avec le traitement à la mélatonine à 1 mM et à 1nM (Fig. 18).



**Figure 18: L'effet de la mélatonine sur la peroxydation des lipides au niveau des cellules BeWo.** Les niveaux relatifs de malondialdéhyde (MDA), (A) en condition de normoxie et d'hypoxie/réoxygénation H/R et (B) après traitement à la mélatonine, ont été déterminés par le test de l'acide thiobarbiturique TBARS, comme décrit dans la section de méthodologie. (Normoxie (8% O<sub>2</sub>) ; H/R (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8%O<sub>2</sub>). Moyenne  $\pm$  SD, N = 3; Mann-Whitney test: non-sig ( $P = 0.1$ ); Traitement à la mélatonine : ANOVA, post hoc Dunnet's test: non-sig.

Les dommages oxydatifs peuvent aussi attaquer les protéines en modifiant la configuration ou la structure de celles-ci suite à la création d'un groupement carbonyle, ce qui conduit à une perte de leurs fonctions. La carbonylation des protéines a été mesurée par fluorimétrie. La figure 19A montre que le niveau des protéines carbonylées augmente significativement en condition d'H/R ( $P = 0,0079$ ). Cette augmentation est aussi présente lorsque les cellules ont été traitées aux différentes concentrations de mélatonine et significative avec les concentrations de 1  $\mu\text{M}$  et 1 nM ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 19B).

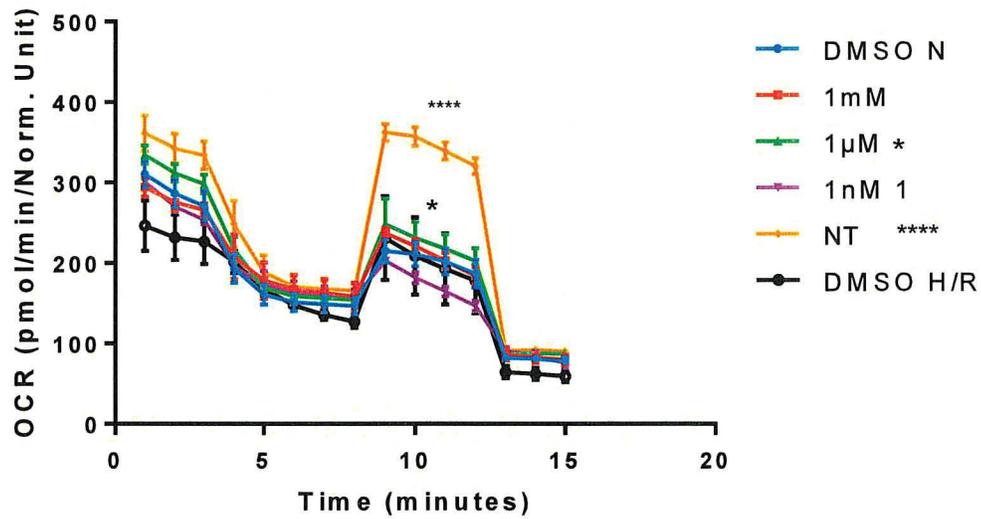


✓ Mann-Whitney t test

**Figure 19 : La mélatonine augmente la carbonylation des protéines dans les cellules BeWo.** Les concentrations relatives des protéines carbonylées, (A) en condition de normoxie et d'hypoxie-réoxygénation (H/R) et (B) après traitement à la mélatonine, ont été déterminés par fluorimétrie grâce au kit de Biovision (K563), comme décrit dans la section de méthodologie. (Normoxie 8% O<sub>2</sub>) ; H/R (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8% O<sub>2</sub>). Moyenne ± SD, N = 3; Mann-Whitney test: non-sig (P = 0,1); Traitement à la mélatonine : ANOVA, post hoc Dunnett's test: 1 µM et 1 nM (P ≤ 0,05).

#### 4.4 Le traitement à la mélatonine augmente la respiration mitochondriale au niveau des cellules BeWo

La respiration maximale mitochondriale (le niveau de consommation d'oxygène), analysée par la méthode Seahorse XF96, est augmentée par la mélatonine surtout à 1 µM. Nous observons que cet effet est aussi observé en condition d'H/R sans ajout de mélatonine. Cependant, lorsque les cellules n'ont subi aucun traitement, ni le véhicule DMSO, la respiration montre un niveau maximal et de base bien supérieures (Fig. 20). En analysant le graphique, toutes les valeurs de la respiration ont été comparées à celles du DMSO en normoxie. Le traitement à la mélatonine montre un effet significatif à une concentration de 1 µM (\*P < 0,05) seulement. Les autres concentrations n'ont pas d'effets significatifs sur la respiration mitochondriale dans les cellules BeWo. Les cellules non-traitées (NT) montrant une valeur significative (\*\*\*\*P < 0,0001) en comparaison au DMSO en normoxie.



**Figure 20 : La mélatonine augmente la respiration mitochondriale dans les cellules BeWo.** Les cellules BeWo n'ont pas été traitées (NT), traitées au DMSO, le véhicule de la mélatonine, ou traitées aux différentes concentrations de mélatonines, 1 mM, 1 μM et 1 nM, comme décrit dans la section de méthodologie. (Normoxie (N) (8%O<sub>2</sub>) ; Hypoxie/réoxygénation (H/R) (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8% O<sub>2</sub>). Moyenne ± SD, N=3; ANOVA, post hoc Friedman test: DMSO vs NT (\*\*\*\**P* < 0,0001); DMSO vs Mel 1 μM (\**P* < 0,05).

## 4. DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent dans les cellules BeWo que la mélatonine: (1) augmente les niveaux de stress oxydatif: elle augmente les EROs cellulaires, diminue les niveaux intracellulaires du GSH et augmente l'expression de l'enzyme pro-oxydante XO; (2) augmente l'expression des enzymes antioxydantes (CAT, GPx et SOD1); (3) n'a pas d'effets significatifs sur la peroxydation des lipides, mais augmente la carbonylation des protéines; et (4) augmente la respiration mitochondriale. En accord avec notre hypothèse, la présente étude démontre que la mélatonine induit un stress oxydatif, causant des dommages aux protéines au niveau des cellules de choriocarcinome placentaire humaines BeWo. Cette étude suggère une action pro-oxydante, inverse à celle décrite par notre équipe dans les vCTB sains (Lanoix *et al.*, 2013), suggérant un rôle anti-tumoral pour cette indolamine.

### 5.1 La mélatonine augmente le stress oxydatif dans les cellules BeWo

La génération d'EROs intracellulaires à la suite d'un traitement à la mélatonine demeure controversée (Albertini *et al.* (2006); Büyükcavcı *et al.* (2006); Laothong *et al.* (2015); Radogna *et al.* (2009a); Wölfler *et al.* (2001); Wenzel *et al.* (2005)). Le premier objectif de ce travail était de déterminer si la mélatonine augmente les niveaux de stress oxydatif dans les cellules BeWo. Les résultats obtenus confirment cette augmentation du stress oxydatif (Fig. 15 et 16) démontrant que la mélatonine mime les effets d'une exposition à l'H/R, un contrôle de stress oxydatif (Coimbra-Costa *et al.*, 2017). L'H/R est un puissant stimulant du stress oxydatif et de l'apoptose mitochondriale dans le cytotrophoblaste en général et dans le syncytiotrophoblaste en particulier, vu qu'elle altère l'équilibre entre les défenses anti- et pro-oxydants. Le placenta subit des variations importantes dans les niveaux d'oxygène durant la grossesse et la reproduction *in vitro* de l'environnement trophoblastique au niveau du placenta est un défi, étant donné que les variations dans les niveaux d'oxygénation peuvent même conduire à des changements phénotypiques. Par conséquent, l'H/R est un modèle de choix pour étudier les changements pouvant avoir lieu lors d'un stress oxydatif. Il est alors suggéré d'utiliser une concentration de 8% O<sub>2</sub> comme condition de base afin de mimer le niveau d'oxygénation présent au niveau du placenta durant le troisième trimestre de gestation (Tuuli *et al.*, 2011; (Sagrillo-Fagundes

*et al.*, 2016)). Comme une condition hypoxique, 0,5% of O<sub>2</sub> a été démontré comme une condition comparable aux épisodes physiologiques hypoxiques, créant un stress oxydatif.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Osseni *et al.*, démontrant une augmentation des EROs au niveau des cellules d'hépatome HepG2 par la même méthode de H2DCFDA, avec des concentrations de mélatonine de 1, 2,5 et 10 µM (Osseni *et al.*, 2000). Deux autres équipes ont observé que la mélatonine (10 mM) augmente les EROs dans des cellules de lymphome U937 (Albertini *et al.* (2006); Radogna *et al.* (2009a)). Radogna *et al.* ont démontré un effet 'pro-radical' de la mélatonine à 1 mM, après une incubation de 3 h, non seulement dans les cellules U937, mais dans les cellules Jurkat et E2R ainsi que des monocytes et des lymphocytes. Les chercheurs mentionnent que cet effet 'pro-radical' de la mélatonine n'est pas nécessairement pro-oxydant. Ils suggèrent que c'est une activité transitoire ayant lieu juste après 3 h d'incubation (Radogna *et al.*, 2009a). Dans des cellules de cholangiocarcinome (KKU-M055 et KKU-M214), la mélatonine a également augmenté les niveaux des EROs de manière dose-dépendante à 0,5, 1 et 2 mM (Laothong *et al.*, 2015). L'équipe de Wenzel *et al.*, a aussi démontré une augmentation des anions superoxydes dans des cellules de cancer colorectal (Wenzel *et al.*, 2005). Le GSH est utilisé par les défenses anti-oxydatives endogènes (ex. : GPx) afin de réduire le stress oxydatif (A Meister & Tate, 1976). Nous observons que les niveaux intracellulaires de GSH diminuent dans les cellules BeWo, confirmant une augmentation significative d'EROs par 1 nM de mélatonine, mimant les effets de l'H/R et du TBHP, nos deux contrôles positifs. Ceci a été également observé dans les cellules U937 (Albertini *et al.*, 2006), Jurkat (Wölfler *et al.*, 2001) et HepG2 (Osseni *et al.*, 2000) à la suite d'un traitement à 1 mM de mélatonine.

La XO est généralement examinée lors de l'étude du stress oxydatif dans le placenta étant donné qu'elle est le générateur majeur d'EROs au niveau de cet organe (Many *et al.*, 1996). Nos résultats démontrent que la mélatonine augmente l'expression protéique de cette enzyme dans les cellules BeWo, mimant les effets de l'H/R. Dans les cellules saines du placenta, Lanoix *et al.* (2013), ont observé également que son expression et son activité sont augmentées par l'H/R. Cependant, l'ajout de 1 mM de mélatonine a

renversé l'action de l'H/R protégeant les cellules saines, ce qui n'est pas le cas dans les cellules tumorales BeWo.

Étonnamment, les niveaux d'expression des enzymes antioxydantes (SOD1, GPx et CAT) augmentent dans les cellules BeWo (Fig.17), ce qui ne concorde pas avec notre hypothèse du départ. Nos résultats montrent d'un côté, une augmentation du stress oxydatif dans les cellules BeWo, mais d'un autre, une augmentation des niveaux protéiques des enzymes antioxydantes (SOD1, GPx et CAT). Cette augmentation des niveaux protéiques de ces enzymes rappelle les résultats retrouvés au niveau des primocultures des cellules placentaires (Lanoix *et al.*, 2013). En effet, dans les primocultures, notre contrôle de stress oxydatif, l'H/R, diminue les niveaux des enzymes antioxydantes, effet qui est renversé avec 1 mM de mélatonine. En revanche, dans les cellules BeWo, l'H/R augmente significativement leurs niveaux protéiques des enzymes antioxydantes. Ceci montre que les cellules tumorales BeWo, répondent différemment à une augmentation de stress oxydatif. En conditions normoxiques, le traitement de 1 mM de mélatonine n'a pas eu d'effet sur l'expression et l'activité de la SOD1, CAT et GPx dans les primocultures de trophoblastes, en revanche, la mélatonine augmente les niveaux protéiques de la SOD1, de la CAT et de la GPx dans les cellules BeWo en condition de normoxie (Fig.17). Ceci montre aussi la différence de réponse à la mélatonine dépendamment de l'état cellulaire. En condition d'H/R, la mélatonine renverse les effets de ce stress dans les primoculture et les ramène à la normale, tandis que dans les cellules BeWo, la mélatonine n'a aucun effet (Fig. S2).

Il est connu que lorsque les cellules cancéreuses sont exposées à un stress oxydatif, elles augmentent l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes afin de s'adapter aux nouvelles circonstances du milieu et de se protéger des dommages oxydatifs (Kumari *et al.*, 2018; Nathan *et al.*, 1981). Mais, lorsque la quantité de radicaux libres générés est très importante, même l'augmentation cellulaire des défenses oxydatives est insuffisante pour contrecarrer les dommages potentiels (Rodriguez *et al.*, 2004). Ceci pourrait expliquer l'augmentation des niveaux protéiques des enzymes antioxydantes observée. Il est à noter aussi que dans les cellules normales, Lanoix *et al.*, ont examiné non seulement les niveaux d'expression protéique des enzymes, mais aussi leurs activités

respectives (Lanoix *et al.*, 2013). Ceci n'a pas encore été fait au niveau des cellules BeWo, il serait donc intéressant d'examiner l'activité respective de chacune des enzymes afin de pouvoir conclure quant à l'effet de la mélatonine sur les enzymes antioxydantes au niveau des cellules BeWo. On pourrait aussi étudier l'effet de la mélatonine sur les ERAs dans les cellules BeWo ainsi que les enzymes qui les régulent, telles que les iNOS (NO synthase inducible).

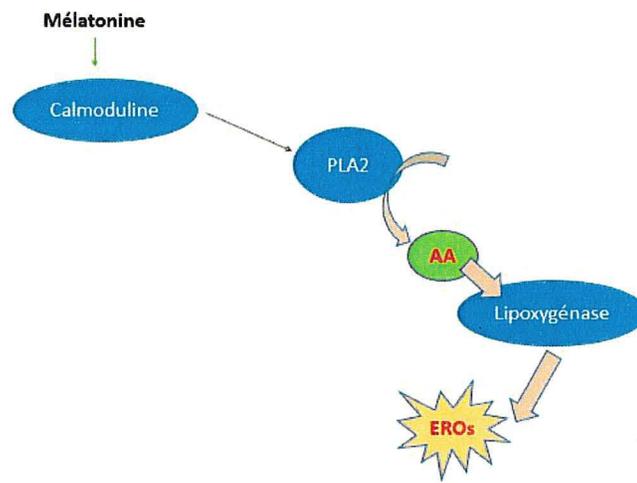
Dans cette étude, nous avons utilisé une concentration de 8% d'O<sub>2</sub> comme condition de base afin de mimer le niveau d'oxygénation présent au niveau du placenta durant le troisième trimestre de gestation (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2016; Tuuli *et al.*, 2011). Afin d'induire un stress oxydatif dans les cellules BeWo, nous avons utilisé une concentration d'O<sub>2</sub> de 0,5% (Heazell *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2000). Cette technique d'exposition des cellules à des concentrations d'oxygénation différentes, possède, en revanche, des limitations. En effet, les concentrations d'O<sub>2</sub> que nous avons fixé à 8% varie au cours de l'expérience. Lors du traitement des cellules au DMSO ou à la mélatonine, les plaques des cellules sont sorties des chambres d'oxygénation et la concentration d'O<sub>2</sub> remonte pour atteindre les niveaux environnants (environ 20% d'O<sub>2</sub>), ce qui soumet les cellules à un stress hyperoxique avant de remettre les plaques dans les chambres et les oxygéner. L'alternative à cette procédure, est de réaliser l'expérience dans des chambres incubatrices à concentration d'O<sub>2</sub> déterminée (Fig.21) afin de limiter les variations des taux d'oxygénation qui peuvent avoir lieu.



**Figure 21: Exemple de chambre incubatrice à concentration de gaz régulée.** Ce modèle de chambre incubatrice permet la manipulation des plaques cellulaires en dedans de la chambre ce qui limite les variations d'oxygénation. Images tirées de la page web de *Scintica Instrumentation* : <https://www.scintica.com/products/oxford-optronix/hypoxia-workstation/>.

## **5.2 Action anti-tumorale de la mélatonine dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo par une augmentation du stress oxydatif**

La présente étude suggère que la mélatonine exerce une action anti-tumorale par une augmentation du stress oxydatif dans les cellules BeWo. Cette action de la mélatonine dans certaines cellules tumorales a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs, vu qu'elle représente une contradiction avec son effet primaire antioxydant. Mais, par quel mécanisme la mélatonine exerce-t-elle cet effet pro-oxydant? Le rôle pro-oxydant de la mélatonine pourrait être un effet indirect de cette indolamine à la différence de son effet direct antioxydant. Cette action pro-oxydante pourrait résulter d'une stimulation d'une cascade de signalisation. En outre, Radogna *et al.*, ont investigué le mécanisme derrière l'effet pro-radical de la mélatonine dans les cellules U937 (Radogna *et al.*, 2009a). Leur analyse mécanistique a révélé que l'effet pro-oxydant de la mélatonine serait récepteurs-indépendants et médié par la calmoduline (Radogna *et al.*, 2009b). Ils montrent que la production d'EROs induite par la mélatonine résulte de l'activation de la lipoxigénase (LOX) et de la phospholipase A2 (PLA2). La PLA2 est une enzyme clivant les phospholipides des membranes cellulaires, ce qui libère l'acide arachidonique (AA) lié aux membranes, qui à son tour est utilisé par les LOX produisant des médiateurs inflammatoires (Gonzalez-Periz & Claria, 2007). Ainsi, l'étude de Radogna *et al.*, montre que la production d'EROs par la mélatonine est le résultat d'une stimulation d'une cascade de signalisation cellulaire via la calmoduline-PLA2-LOX. Il a été démontré que la mélatonine prévient l'activation des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AA, tels que LOX et PLA2. Dans les U937, les auteurs suggèrent que la mélatonine à 1 mM se lie à la calmoduline, ce qui libère la PLA2 qui agit sur les membranes cellulaires et libère de grandes doses d'AA. Ce dernier, substrat de la LOX, permet la production de radicaux libres par cette enzyme (Fig. 22) (Radogna *et al.*, 2009b). Il serait donc intéressant d'examiner ce mécanisme dans les cellules BeWo afin de mieux comprendre l'action pro-oxydante de la mélatonine.

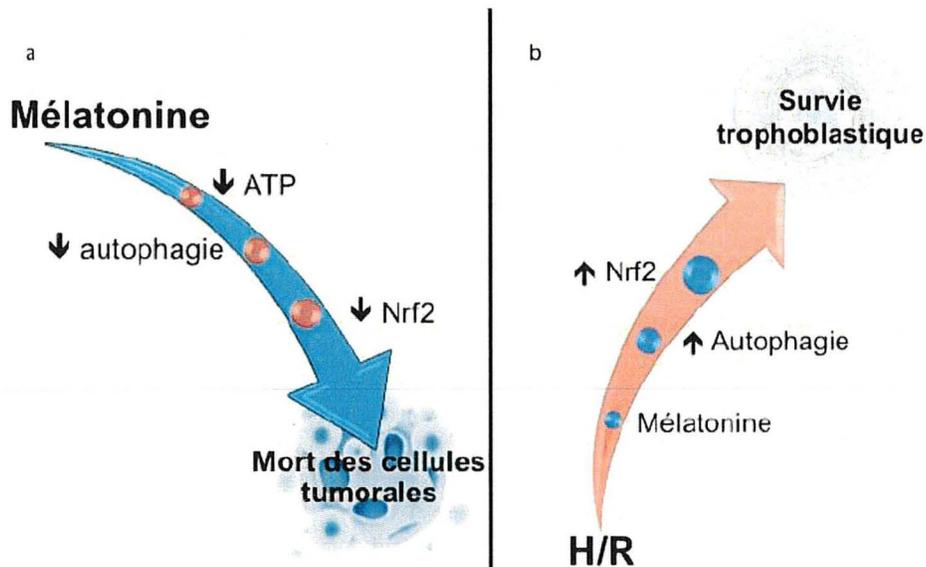


**Figure 22: Hypothèse de la cascade de signalisation de production d'EROs par la mélatonine.** La mélatonine se lierait à la calmoduline, ce qui libère la phospholipase A2 (PLA2) et induit la production d'acide arachidonique (AA). L'AA libéré promeut la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par la lipoxygénase. *Adapté de (Radogna et al., 2009b).*

La mélatonine induit des effets contradictoires dépendamment du contexte cellulaire. En effet, la mélatonine a des effets protecteurs dans les cellules saines placentaires mais plutôt des actions cytotoxiques dans les cellules cancéreuses BeWo (Sagrillo-Fagundes *et al.* (2019); Lanoix *et al.* (2012)). Cette indolamine est de plus en plus suggérée comme molécule anti-tumorale (Asghari *et al.*, 2018; Haghi-Aminjan *et al.*, 2018). Dans la même perspective, notre laboratoire a déjà démontré que la mélatonine perturbe le potentiel membranaire mitochondrial et active l'apoptose intrinsèque dans les cellules BeWo, tandis qu'elle diminue l'induction de l'apoptose dans les cellules primaires de trophoblastes placentaire exposées à l'H/R (Lanoix *et al.*, 2013). Dans une étude plus récente, notre équipe a démontré que la mélatonine est cytotoxique dans les BeWo et cytoprotectrice dans les CTBv primaires. En effet, la mélatonine réduit l'activation de l'autophagie en condition d'H/R (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2019). Étant un mécanisme impliqué dans le catabolisme des protéines et des organelles endommagées (Scherz-Shouval & Elazar, 2011), l'autophagie est un processus utilisé par les cellules tumorales pour survivre. Cette voie active aussi le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor*

(*erythroid-derived 2)-like 2*), un activateur de l'expression des enzymes antioxydantes (Kensler *et al.*, 2007). Dans les BeWo, on a trouvé que la mélatonine inhibe son activation, dans des conditions d'H/R. Ceci mène à la mort cellulaire et au clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase PARP-1, un marqueur apoptotique, dont les niveaux sont augmentés par la mélatonine dans les cellules BeWo, en conditions normoxiques. Cependant, dans les vCTB saines, la mélatonine active l'autophagie et le facteur Nrf2 (Fig. 23) (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2019).

Cette différence d'effets de la mélatonine dépendante du contexte cellulaire (cellules saines vs tumorales) est encore mal comprise. Il a été démontré que cette indolamine modifie le profil d'expression des microARN (miARN) et la méthylation de l'ADN dans les cellules du cancer du sein (Korkmaz *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). En revanche, la mélatonine réduit la formation de la 8-hydroxy-désoxyguanosine par ses actions antioxydantes pour limiter les échecs de réparation de l'ADN des neurones normales ((Tang *et al.*, 1998) et revu dans (Hardeland, 2014)). Il serait, entre autres, intéressant d'étudier les modulations épigénétiques causées par la mélatonine dans les cellules BeWo et de les comparer à celles causées dans les cellules placentaires saines.



**Figure 23: La mélatonine agit différemment dans les cellules placentaires normales et tumorales.** (a) Dans les cellules de choriocarcinome BeWo, la mélatonine augmente la phosphorylation de la 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), en raison de la réduction des taux d'ATP. La mélatonine inhibe l'activité autophagique et l'activation du facteur de transcription *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2), conduisant à la mort cellulaire. (b) Dans les cytotrophoblastes villosités issues de placentas de grossesses normales à terme, l'hypoxie/réoxygénation (H/R) perturbe l'homéostasie cellulaire. Le traitement à la mélatonine induit l'activation de deux mécanismes de pro-survie: l'autophagie et le Nrf2, et rétablit l'homéostasie et maintient la survie cellulaire. *Adapté de Sagrillo-Fagundes et al. (2019).*

### **5.3 L'augmentation du stress oxydatif par la mélatonine induit des dommages cellulaires dans les cellules BeWo**

L'augmentation des niveaux d'oxydants induit généralement des dommages cellulaires comme la carbonylation des protéines, la peroxydation des lipides et le bris d'ADN. En accord avec ceci, dans la présente étude la mélatonine induit une augmentation significative de la carbonylation des protéines dans les cellules BeWo. Il est connu que la carbonylation des protéines induite par un stress oxydatif a des conséquences structurales et fonctionnelles majeures : perte de fonction, clairance anormale des protéines, altération de la balance redox et interférence avec le cycle cellulaire. La carbonylation est aussi impliquée dans la pathogenèse de différentes maladies (Levine, 2002) et dans la progression de cancers (Castegna *et al.*, 2002; Thanan *et al.*, 2012). En effet, l'augmentation des niveaux de carbonylation des protéines a été décrite dans différents types de cancers dont le cancer du sein, le sarcome et le cholangiocarcinome (Mannello *et al.* (2009); Nathan *et al.* (2011); Thanan *et al.* (2012)). Dans la présente étude on a pu démontrer que la mélatonine augmente davantage les niveaux de carbonylation dans les cellules à des doses de 1  $\mu$ M et 1 nM, en comparaison avec le véhicule DMSO.

D'autre part, notre étude montre que la mélatonine n'affecte pas la peroxydation des lipides, aux concentrations analysées, dans les cellules BeWo. Ceci concorde avec une étude qui a analysé l'effet de la mélatonine sur différentes lignées cellulaires de leucémie. Elle a démontré que l'augmentation des niveaux des EROs par 1 mM de mélatonine n'est

pas toujours associée à une peroxydation des lipides. En effet, une lignée seulement (CMK : *human myeloid leukemia cell line*) parmi les six lignées testées, présentait une augmentation de la lipoperoxydation, pour les cinq autres lignées (K562, Daudi, HL-60, Jurkat et MOLT-4) aucun effet significatif n'a été observé (Büyükcavcı *et al.*, 2006). Dans notre étude, la peroxydation des lipides a été mesurée par l'analyse des niveaux du malondialdéhyde (MDA) à l'aide du test TBARS. Mais, plusieurs substances dans la cellule peuvent aussi réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Ilie & Margina, 2012), comme certains sucres ou acides aminés. Il serait donc intéressant d'examiner les niveaux d'un deuxième marqueur de ce dommage, soit le 4-HNE. Afin de compléter l'étude des dommages du stress oxydatif au niveau de notre modèle cellulaire BeWo, nous pourrions examiner les dommages au niveau de l'ADN, soit l'oxydation et la fragmentation de ce dernier ainsi que de l'ADN mitochondrial.

#### **5.4 L'induction du stress oxydatif par la mélatonine est associée à une augmentation de la respiration mitochondriale dans les cellules tumorales BeWo**

Dans des études précédentes de notre laboratoire, on a démontré que la mélatonine diminue le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules BeWo (Lanoix *et al.*, 2012). Plus récemment, notre équipe a aussi démontré l'augmentation de la mitophagie au niveau des cellules BeWo exposées à l'H/R par 1 mM de mélatonine. L'augmentation de la mitophagie est néfaste pour les cellules tumorales (Sentelle *et al.*, 2012). Dans ce mémoire, la respiration mitochondriale dans les cellules BeWo, analysée par le Seahorse XF96, est augmentée significativement par la mélatonine à 1  $\mu$ M. L'augmentation observée suggère aussi l'effet pro-oxydant de la mélatonine dans les cellules BeWo. Étant donné que la mitochondrie est le générateur primaire de radicaux libres dans la cellule, une augmentation de la respiration mitochondriale implique une augmentation des niveaux des EROs. Ceci suggère davantage l'effet pro-oxydant de la mélatonine dans les cellules BeWo.

La mitochondrie et la mélatonine sont en étroite relation. En effet, les niveaux de mélatonine sont très élevés au niveau mitochondrial. Au début, on a proposé que ces niveaux sont associés au grand pouvoir de diffusion de cette indolamine et à son

caractère amphiphile. Mais, plusieurs études ont ensuite montré que la mélatonine est produite par cet organelle (e.g. expriment les enzymes fonctionnelles de la synthèse de la mélatonine (HIOMT, AANAT) et ses récepteurs MT1 et MT2). Étant donné que la mitochondrie est le site majeur de productions des EROs et donc du stress oxydant, sa localisation dans la mitochondrie est associée à son action anti-oxydante (Tan *et al.*, 2013). En outre, dans des cellules neuronales, hépatiques et cardiaques soumises à l'H/R, la mélatonine a rétabli les fonctions mitochondriales (Li *et al.*, 2014; Petrosillo *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2011). L'effet de la mélatonine a aussi été décrit dans les placentas issus de grossesses compliquées par une obésité maternelle. La respiration mitochondriale au niveau des cytotrophoblastes de femmes enceintes obèses est diminuée en comparaison avec les celles des femmes non-obèses (Mele *et al.*, 2014). L'étude de Ireland *et al.*, en 2018 a démontré que la respiration mitochondriale (consommation maximale d'oxygène) au niveau des STB de mères obèses traités à la mélatonine est augmentée par rapport aux STB non-traités (Ireland *et al.*, 2018).

Notre équipe a précédemment démontré que la mélatonine diminue le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules BeWo (Lanoix *et al.*, 2012). Plus récemment, nous avons démontré que la mélatonine diminue le contenu mitochondrial dans les cellules BeWo en normoxie et sous l'H/R, suggérant que la mélatonine induit la mitophagie. Dans ce mémoire, nous démontrons que la respiration mitochondriale dans les cellules BeWo (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2019) est augmentée par la mélatonine. L'augmentation observée est en accord avec nos données précédentes montrant un effet pro-oxydant de la mélatonine dans les cellules BeWo. Étant donné que la mitochondrie est le générateur primaire des radicaux libres, une augmentation de la respiration mitochondriale implique une augmentation des niveaux des EROs. On pourrait confirmer ceci davantage dans des études futures de l'effet de la mélatonine sur les différents complexes mitochondriaux par des immunobuvardages de type Western. Cet effet de la mélatonine a aussi été observé dans les cellules de *Leishmania infantum*, la mélatonine a démontré une action pro-oxydante par une élévation des EROs, une augmentation de la perméabilité mitochondriale et une altération de l'homéostasie calcique au niveau des mitochondries de ce parasite (Elmahallawy *et al.* 2014).

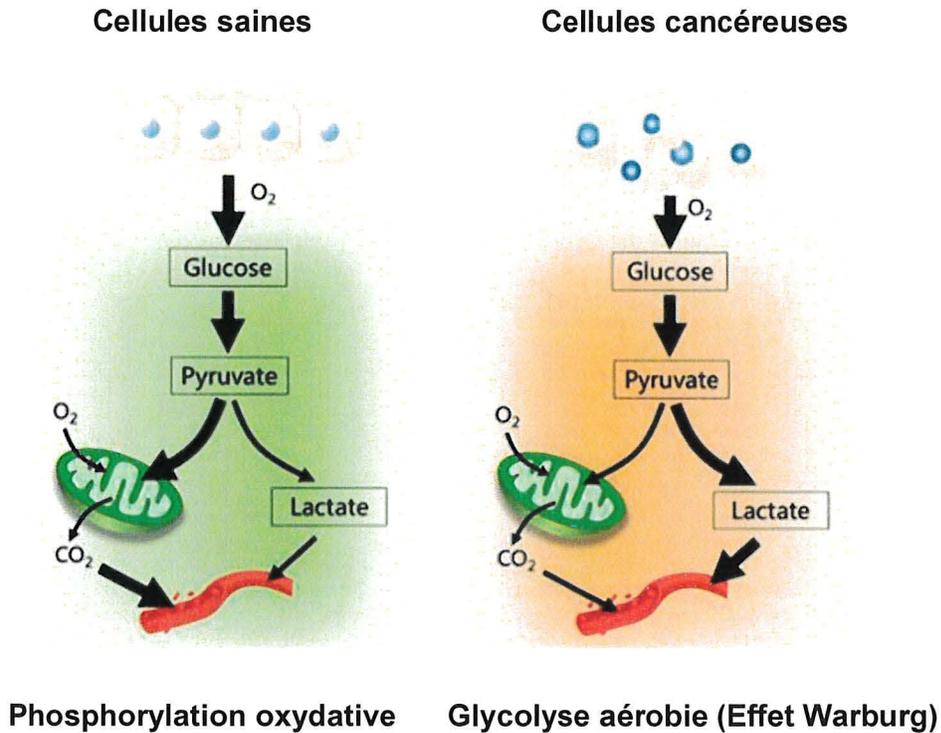
## 5.5 L'effet Warburg, cellules tumorales et mélatonine

Pour mieux comprendre la respiration mitochondriale au niveau des cellules BeWo, il est important de comprendre leur profil glycolytique. La respiration mitochondriale est la source majeure de production d'énergie au niveau des cellules aérobiques. Ce métabolisme énergétique mitochondrial, nécessaire pour la production d'EROs, est généralement perturbé au niveau de la plupart des cellules tumorales (Park *et al.*, 2009a). En effet, plusieurs cellules cancéreuses utilisent la glycolyse cytosolique, soit l'effet Warburg, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Sous ces conditions, le glucose est transformé en lactate qui est déversé dans le sang en grandes quantités (Fig. 24). L'effet Warburg permet aux cellules cancéreuses une synthèse accrue de macromolécules requises pour accélérer la prolifération, diminuer l'apoptose augmentant la biomasse tumorale ainsi que le pouvoir métastatique (Reiter *et al.*, 2019).

La mélatonine joue un rôle dans l'effet Warburg. Chez des rats porteurs de tumeurs, privés de la mélatonine pinéale, la glycolyse était augmentée ainsi que les niveaux de lactate. Cependant, lorsque la production pinéale nocturne de mélatonine était élevée, cette dernière, utilisée par la mitochondrie et les cellules cancéreuses, avait une production de lactate diminuée et la voie de la glycolyse était favorisée (Mendez *et al.*, 2012).

Il a été démontré que les niveaux accrus de mélatonine sanguine la nuit induisent dans le cas de cancer du sein un changement 'switch' au niveau du métabolisme du glucose; d'une glycolyse cytosolique à la phosphorylation oxydative ce qui augmente la production d'ATP (Blask *et al.*, 2014). Via cette voie, la mélatonine promeut la synthèse de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate. Il a été proposé que la mélatonine effectue ce mécanisme par une inhibition de la kinase pyruvate déshydrogénase mitochondriale (PDK), inhibant normalement le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC), l'enzyme qui contrôle la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (revu dans (Reiter *et al.*, 2019)). L'acétyl-CoA a des fonctions importantes dans la mitochondrie, entre autres dans le cycle de l'acide citrique qui améliore la phosphorylation oxydative et représente un important cofacteur de l'enzyme limitante dans la synthèse de la mélatonine mitochondriale, la AANAT. Comme perspective de ce travail, on pourrait étudier le profil glycolytique des cellules BeWo et

l'effet de la mélatonine sur cette cascade de signalisation afin de mieux comprendre les changements métaboliques induits par la mélatonine dans ces cellules.



**Figure 24: Métabolisme du glucose dans les cellules saines versus cancéreuses.** Les cellules cancéreuses abandonnent la phosphorylation oxydative mitochondriale en faveur de la glycolyse afin de produire leur énergie sous forme d'ATP. Les cellules cancéreuses métabolisent le pyruvate en lactate, déversé dans la circulation sanguine. Dans les cellules saines, les mitochondries utilisent le pyruvate et le transforment en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de l'acide citrique et augmente la production d'ATP. Ceci promeut aussi la synthèse de la mélatonine étant donné qu'il est un cofacteur de l'enzyme limitante de synthèse de mélatonine (AANAT). Adaptée de la revue (Reiter et al., 2019).

Selon Warburg, les cellules tumorales présentent un taux de glycolyse élevé, même lorsque le dioxygène est abondant (Warburg, 1956). Pour atteindre ce métabolisme altéré, les cellules activent différents oncogènes et inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs, entraînant une modification de l'expression des différents composants du métabolisme du glucose et du glutamate (Talib, 2018). Plusieurs facteurs transcriptionnels sont impliqués dans l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses.

Parmi ces derniers, HIF-1 (*Hypoxia-inductible factor 1*) qui augmente l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose. Il augmente l'expression des PDKs qui inactivent la pyruvate déshydrogénase, l'enzyme limitante de la glycolyse, en la phosphorylant. Ceci entraîne l'arrêt de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et augmente la production du lactate (Bensinger & Christofk, 2012). La mélatonine a un effet inhibiteur sur HIF-1 qui, à son tour, inhibe le mécanisme altéré dans la cellule cancéreuse, ceci a notamment été démontré au niveau du cancer de la prostate (Park *et al.*, 2009b). Les niveaux de HIF-1 suite à un traitement à la mélatonine ont été analysés par notre équipe aux niveaux des STB sains (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2018). En général, HIF-1 est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome dans les STB en condition de normoxie. Cependant, en H/R, ce facteur de transcription peut réguler à la hausse des gènes promoteurs de la réponse à l'hypoxie induisant l'angiogenèse, la vasodilatation et l'apoptose (Palazon *et al.*, 2014). Dans les STB, on a démontré que l'expression de HIF-1 est augmentée en H/R comparé à la normoxie et l'ajout de 1 mM de mélatonine restore les niveaux de HIF-1 jusqu'à atteindre les niveaux observés en conditions de normoxie (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2018). L'effet de la mélatonine sur les niveaux de HIF-1 dans les cellules BeWo n'a pas été étudié, Il serait donc intéressant d'examiner ses niveaux d'expression ainsi que son effet sur les enzymes de la glycolyse, telles que la PDK.

Un autre régulateur du métabolisme du cancer est l'oncogène c-myc. Sa surexpression dans les cellules cancéreuses cause une régulation positive de plusieurs gènes tels que ceux des enzymes glycolytiques (PDK1 et la lactate déshydrogénase) et de transporteurs de glucose (Dang *et al.*, 2008). Une inhibition de la lactate déshydrogénase et une diminution du lactate ont été observées dans différentes lignées cellulaires à la suite d'un traitement à la mélatonine (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2015). Il a déjà été démontré que l'oncogène Myc est exprimé dans les cellules cancéreuses BeWo (Sarkar *et al.*, 1986). L'analyse de l'expression de Myc ainsi que la PDK et la relation entre les deux dans les BeWo pourrait éclaircir davantage le mécanisme par lequel la mélatonine agit sur la respiration mitochondriale.

## 5.6 La mélatonine comme 'adjuvant' à la radiothérapie et la chimiothérapie?

Le choriocarcinome placentaire est traité principalement par chimiothérapie (Mailly *et al.*, 2008). Dans un monde de lutte contre le cancer, on fait face à un problème majeur, soit la résistance à la polychimiothérapie (ou *Multidrug Resistance* (MDR)), qui est responsable de la diminution de l'efficacité de la chimiothérapie face au cancer (Najafi *et al.*, 2019). De plus, bien que la chimiothérapie soit connue pour ces effets curatifs, elle est la cause de multiples effets secondaires indésirables sur les cellules saines ou sur les organes non-touchés par le cancer à traiter. Les chercheurs veulent donc trouver des alternatives ou des adjuvants pour avoir de meilleurs résultats et de contourner ou minimiser les effets indésirables pouvant avoir lieu.

Une des stratégies proposées est une combinaison de la chimiothérapie avec des suppléments appropriés qui protégeraient les cellules normales et auraient un effet antitumoral synergique, ce qui serait même un meilleur traitement que la chimiothérapie seule. Une combinaison peut même donner des résultats meilleurs car les doses administrées pourraient être moindres que les doses habituelles, et la mélatonine est l'un des suppléments suggérés comme adjuvant. En outre, cette indolamine a peu ou pas d'effets secondaires indésirables et peut être administrée à forte dose, vu que sa toxicité est très faible (revu dans (Najafi *et al.*, 2019)). Il a été montré que la mélatonine augmente les effets thérapeutiques de la chimiothérapie et rend les cellules tumorales plus vulnérables face à cette thérapie (Gao *et al.*, 2017) dans plusieurs cancers humains : les cellules de sarcome d'Ewing humain (Casado-Zapico *et al.*, 2010) ainsi que le cancer du poumon (Plaimée *et al.*, 2015), des ovaires (Kim *et al.*, 2012), du colon (Gao *et al.*, 2017), du col de l'utérus (Pariante *et al.*, 2016) et bien d'autres (revus dans (Najafi *et al.*, 2019)). D'après nos résultats et ceux de notre laboratoire déjà publiés, la mélatonine protège les cellules placentaires saines du stress oxydatif et ses dommages (Lanoix *et al.*, 2012) mais elle les augmente dans les cellules cancéreuses. Nous suggérons alors que cette indolamine réduira la toxicité oxydative causée par la chimiothérapie dans les cellules saines, et va plutôt augmenter le stress oxydant engendré par ce type de thérapie, dans les cellules cancéreuses. Tout ceci suggère que la mélatonine est une 'tueuse intelligente', une molécule exceptionnelle et prometteuse dans le monde de la recherche.

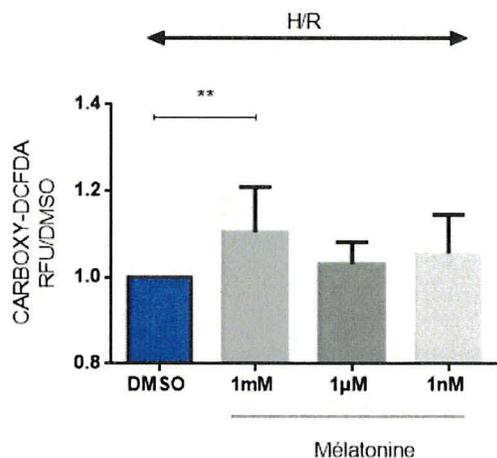
## **6.CONCLUSION:**

L'intérêt de la communauté scientifique pour les différents effets pouvoirs de la mélatonine, la molécule 'intelligente'. Les effets protecteurs de la mélatonine au niveau du placenta sont au cœur des recherches de notre laboratoire mais suscitent également l'intérêt d'une large communauté scientifique qui ne cesse d'examiner les mécanismes d'actions de cette indolamine grâce auxquels elle assure ses effets bénéfiques.

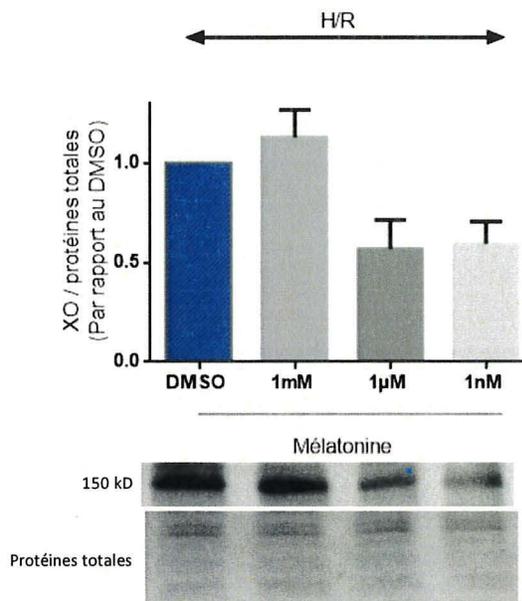
Dans ce travail, nous avons démontré que l'effet anti-tumorale de la mélatonine passe à travers l'augmentation du phénomène du stress oxydatif au niveau d'un modèle cellulaire de choriocarcinome placentaire. Les résultats présentés montrent que cette indolamine augmente les marqueurs du stress oxydatif ainsi que les dommages cellulaires qu'il provoque, telle que la carbonylation des protéines. Nous avons aussi démontré que la respiration mitochondriale est augmentée par la mélatonine, ce qui augmente la production des radicaux libres par ces différents complexes. Ces découvertes pourraient être confirmées par de futurs tests, discutés également dans ce travail ou d'autres modèles cellulaires du choriocarcinome ou même des modèles animaux.

## 7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES :

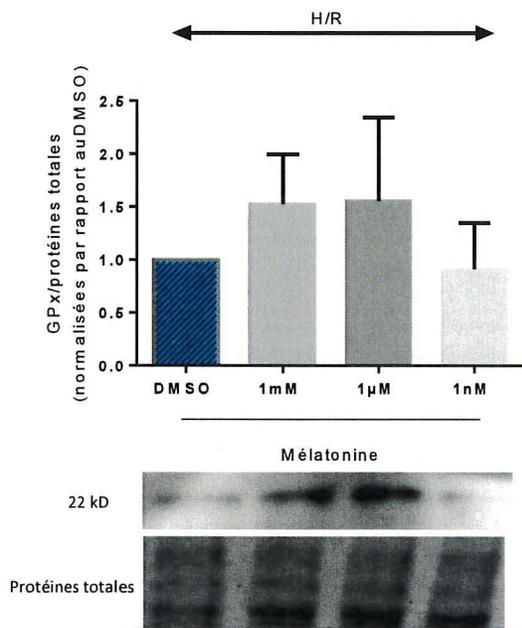
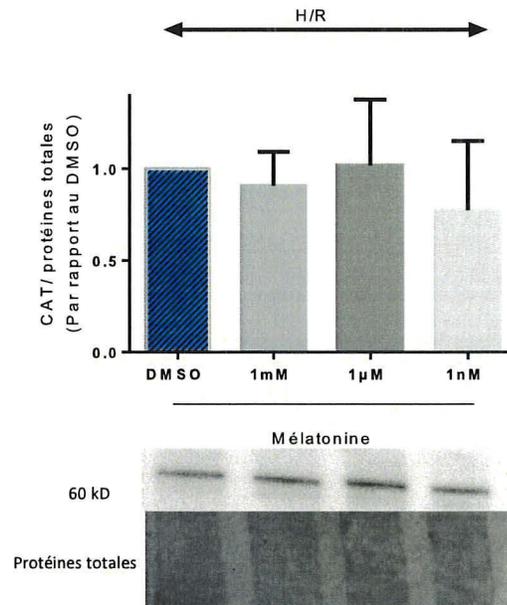
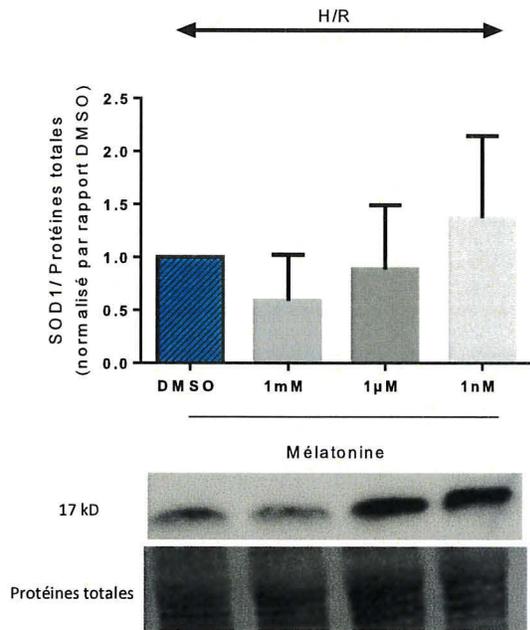
(A).



(B).



**Figure supplémentaire 1** : La mélatonine à 1 mM augmente le stress oxydatif dans les cellules BeWo. (A) Les niveaux relatifs des EROs dans les BeWo en condition d'H/R ont été déterminés par fluorimétrie grâce à la sonde 5-(6)-carboxy-20,70-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate (carboxy-H2DCFDA). (B) L'expression protéique de la xanthine oxydase (XO) a été déterminée par Immunobuvardage de type Western en hypoxie/réoxygénation (H/R) et avec un traitement à la mélatonine. Les protéines totales ont été utilisées pour normaliser l'expression protéique, qui a été ensuite normalisée par rapport au DMSO. Normoxie (8% O<sub>2</sub>) ; H/R (4 h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20 h de 8% O<sub>2</sub>). (A) : Moyenne ± SD, N = 7; \*\* $P \leq 0,01$ . (B): Moyenne ± SD, N = 3.



**Figure supplémentaire 2 :** La mélatonine, en hypoxie/réoxygénation H/R, exerce des effets différents sur les niveaux d'expression protéiques des enzymes antioxydantes dans les cellules de choriocarcinome placentaire BeWo. Les niveaux relatifs de l'expression protéique des enzymes antioxydantes superoxyde dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) et glutathionne peroxydase GPx, en condition d'H/R ((A), (B) et (C)) à la suite d'un traitement à la mélatonine ont été déterminés par immunobuvardage de type Western. Les niveaux de protéines totales sur la membrane de PVDF ont été utilisées pour normaliser l'expression protéique. Normoxie (8%O<sub>2</sub>) ; H/R (4h de 0.5% O<sub>2</sub> suivies de 20h de 8%O<sub>2</sub>). SOD1: Moyenne ± SD, N = 3. CAT: Moyenne ± SD, N = 5. GPx : Moyenne ± SD, N = 3.

## 8. RÉFÉRENCES:

- A Meister a & Tate SS (1976) Glutathione and Related  $\gamma$ -Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization. *Annual Review of Biochemistry* 45(1):559-604.
- Albertini MC, Radogna F, Accorsi A, Uguccioni F, Paternoster L, Cerella C, De Nicola M, D'ALESSIO M, Bergamaschi A & Magrini A (2006) Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1091(1):10-16.
- Alsat E, Wyplosz P, Malassiné 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.
- Andreyev AY, Kushnareva YE & Starkov A (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70(2):200-214.
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Asghari MH, Ghobadi E, Moloudizargari M, Fallah M & Abdollahi M (2018) Does the use of melatonin overcome drug resistance in cancer chemotherapy? *Life sciences* 196:143-155.
- Bagshawe K (1983) Gestational trophoblastic diseases. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 692:7-81.
- Balasubramanian B, Pogozelski WK & Tullius TD (1998) DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(17):9738-9743.
- Balasubramaniyan N, Subramanian S & Govindasamy S (1994) Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer letters* 87(2):187-192.
- Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AE, Palheta Jr RC, Jiang X, Smitz JE & Matos MHT (2017) Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of reproduction* 96(6):1244-1255.
- Barnham KJ, Masters CL & Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews Drug discovery* 3(3):205.
- Battelli MG, Polito L, Bortolotti M & Bolognesi A (2016) Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.
- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA & Rodríguez AB (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *Journal of pineal research* 46(4):392-400.
- Benirschke K & Driscoll SG (1967) The pathology of the human placenta. *Placenta*, Springer. p 97-571.
- Bensinger SJ & Christofk HR (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, p 352-361.
- Bigard A-X & Guezennec C-Y (2017) *Nutrition du sportif*. Elsevier Health Sciences,
- Bizzarri M, Proietti S, Cucina A & Reiter RJ (2013) Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert opinion on therapeutic targets* 17(12):1483-1496.
- Blask DE, Dauchy RT, Dauchy EM, Mao L, Hill SM, Greene MW, Belancio VP, Sauer LA & Davidson L (2014) Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PLoS One* 9(8):e102776.
- Blask DE, Wilson ST & Zalatan F (1997) Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res* 57(10):1909-1914.
- Bondy SC & Campbell A (2018) Mechanisms underlying tumor suppressive properties of melatonin. *International journal of molecular sciences* 19(8):2205.

- Bouteiller PL (2000) HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. (Portland Press Ltd.).
- Brännström Mu & Norman R (1993) Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reproduction* 8(10):1762-1775.
- Burton GJ & Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 25(3):287-299.
- Butterfield DA & Sultana R (2008) Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert review of proteomics* 5(2):157-160.
- Büyükcavcı M, Özdemir Ö, Buck S, Stout M, Ravindranath Y & Savaşan S (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 20(1):73-79.
- Cajochen C, Kräuchi K & Wirz-Justice A (2003) Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *Journal of neuroendocrinology* 15(4):432-437.
- Carlomagno G, Minini M, Tilotta M & Unfer V (2018) From implantation to birth: insight into molecular melatonin functions. *International journal of molecular sciences* 19(9):2802.
- Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I & Rodriguez C (2010) Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *Journal of pineal research* 48(1):72-80.
- Casanueva E & Viteri FE (2003) Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *The Journal of Nutrition* 133(5):1700S-1708S.
- Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR & Butterfield DA (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2,  $\alpha$ -enolase and heat shock cognate 71. *Journal of Neurochemistry* 82(6):1524-1532.
- Chirico EN & Pialoux V (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB life* 64(1):72-80.
- Clapp-Lilly KL, Smith MA, Perry G, Harris PL, Zhu X & Duffy LK (2001) Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *NeuroReport* 12(6):1277-1280.
- Coimbra-Costa D, Alva N, Duran M, Carbonell T & Rama R (2017) Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. *Redox biology* 12:216-225.
- Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L & Diederich M (2009) Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- $\kappa$ B activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171(1):472.
- Cristol J, Bosc J, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B & Canaud B (1997) Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association* 12(11):2312-2317.
- Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA & Bernlohr DA (2012) Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23(8):399-406.
- Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, De Vicente J & De Diego RG (2012) Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Research* 32(7):2747-2754.
- Dang CV, Kim J-w, Gao P & Yuste J (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Reviews Cancer* 8(1):51.
- Davis FC & Mannion J (1988) Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 255(3):R439-R448.

- Dosunmu-Ogunbi AM, Wood KC, Novelli EM & Straub AC (2019) Decoding the role of SOD2 in sickle cell disease. *Blood advances* 3(17):2679-2687.
- Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, Zou L, Chatham JC, Hill BG & Zhang J (2011) Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radical Biology and Medicine* 51(9):1621-1635.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82(1):47-95.
- Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, Carbone M, Colombo M, La Rocca G, Anzalone R, Genta FT, Zummo G & Di Stefano A (2009) Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci* 14:2230-2237.
- Elmahallawy EK, Jiménez-Aranda A, Martínez AS, Rodríguez-Granger J, Navarro-Alarcón M, Gutiérrez-Fernández J & Agil A (2014) Activity of melatonin against *Leishmania infantum* promastigotes by mitochondrial dependent pathway. *Chemico-biological interactions* 220:84-93.
- Esposito E & Cuzzocrea S (2010) Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Current neuropharmacology* 8(3):228-242.
- Fedorova M, Bollineni RC & Hoffmann R (2014) Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass spectrometry reviews* 33(2):79-97.
- Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA & Llesuy SF (2004) Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *American journal of ophthalmology* 137(1):62-69.
- Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y & Miyamoto E (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *Journal of neuroscience research* 70(6):799-807.
- Gao Y, Xiao X, Zhang C, Yu W, Guo W, Zhang Z, Li Z, Feng X, Hao J & Zhang K (2017) Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI 3K/AKT and NF- $\kappa$ B/iNOS signaling pathways. *Journal of pineal research* 62(2):e12380.
- García-Navarro A, González-Puga C, Escames G, López LC, López A, López-Cantarero M, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA & Acuña-Castroviejo D (2007) Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *Journal of pineal research* 43(2):195-205.
- Gonzalez-Periz A & Claria J (2007) New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Current topics in medicinal chemistry* 7(3):297-309.
- Govender J, Loos B, Marais E & Engelbrecht AM (2014) Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. *Journal of pineal research* 57(4):367-380.
- Gracy R, Talent J, Kong Y & Conrad C (1999) Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428(1-2):17-22.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B & King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research* 114(5-6):397-407.
- Haghi-Aminjan H, Asghari MH, Farhood B, Rahimifard M, Hashemi Goradel N & Abdollahi M (2018) The role of melatonin on chemotherapy-induced reproductive toxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70(3):291-306.
- Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* 31(4):261-272.
- Halliwell B (2007) *Biochemistry of oxidative stress*. (Portland Press Limited).
- Hardeland R (2014) Melatonin, noncoding RNAs, messenger RNA stability and epigenetics—evidence, hints, gaps and perspectives. *International journal of molecular sciences* 15(10):18221-18252.

- He C, Wang J, Zhang Z, Yang M, Li Y, Tian X, Ma T, Tao J, Zhu K & Song Y (2016) Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *International journal of molecular sciences* 17(6):939.
- Heazell A, Lacey H, Jones C, Huppertz B, Baker P & Crocker I (2008) Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta* 29(2):175-186.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S & Floyd RA (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine* 28(10):1456-1462.
- Huerto-Delgado L, Antón-Tay F & Benitez-King G (1994) Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *Journal of Pineal Research* 17(2):55-62.
- Hung T-H & Burton GJ (2006) Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 45(3):189-200.
- Ighodaro O & Akinloye O (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4):287-293.
- Ilie M & Margina D (2012) Trends in the evaluation of lipid peroxidation processes. *Lipid Peroxidation* :111-130.
- Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1):395-418.
- Ireland KE, Maloyan A & Myatt L (2018) Melatonin improves mitochondrial respiration in syncytiotrophoblasts from placentas of obese women. *Reproductive sciences* 25(1):120-130.
- Iwasaki S, Nakazawa K, Sakai J, Kometani K, Iwashita M, Yoshimura Y & Maruyama T (2005) Melatonin as a local regulator of human placental function. *Journal of pineal research* 39(3):261-265.
- Jacques SM, Qureshi F, Doss BJ & Munkarah A (1998) Intraplacental choriocarcinoma associated with viable pregnancy: pathologic features and implications for the mother and infant. *Pediatric and Developmental Pathology* 1(5):380-387.
- Jauniaux E, Greenwold N, Hempstock J & Burton GJ (2003) Comparison of ultrasonographic and Doppler mapping of the intervillous circulation in normal and abnormal early pregnancies. *Fertility and sterility* 79(1):100-106.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao Y-P, Skepper JN & Burton GJ (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *The American journal of pathology* 157(6):2111-2122.
- Kennaway DJ, Stamp GE & Goble FC (1992) Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75(2):367-369.
- Kensler TW, Wakabayashi N & Biswal S (2007) Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47(1):89-116.
- Kerenyi N, Sotonyi P & Somogyi E (1975) Localizing acetyl-serotonin transferase by electron microscopy. *Histochemistry* 46(1):77-80.
- Kim J, Kim J & Bae J-S (2016) ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Experimental & molecular medicine* 48(11):e269.
- Kim JH, Jeong SJ, Kim B, Yun SM, Choi DY & Kim SH (2012) Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *Journal of pineal research* 52(2):244-252.
- Kivelä A (1991) Serum melatonin during human pregnancy. *European Journal of Endocrinology* 124(3):233-237.
- Koehlin-Ramonatxo C (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20(4):165-177.

- Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T & Soma G-I (2009) ROS and innate immunity. *Anticancer research* 29(3):817-821.
- Kohen R & Nyska A (2002) Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology* 30(6):620-650.
- Kolanjiappan K, Manoharan S & Kayalvizhi M (2002) Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta* 326(1-2):143-149.
- Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan D-X & Reiter RJ (2009) Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 115(1):13-27.
- Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, Opatrilova R, Gazdikova K, Caprnda M, Rodrigo L, Danko J & Kruzliak P (2018) Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 122:133-143.
- Kumari S, Badana AK & Malla R (2018) Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomarker insights* 13:1177271918755391.
- Lampiao F & PLESSIS S (2013) New developments of the effect of melatonin on reproduction. *World J Obstet Gynecol* 10:15-22.
- Lanoix, Beghdadi H, Lafond J & Vaillancourt C (2008a) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res* 45(1):50-60.
- Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J & Vaillancourt C (2008b) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *Journal of pineal research* 45(1):50-60.
- Lanoix D, Lacasse A-A, Reiter RJ & Vaillancourt C (2012) Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Molecular and cellular endocrinology* 348(1):1-11.
- Lanoix D, Lacasse A-A, Reiter RJ & Vaillancourt C (2013) Melatonin: the watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology* 381(1-2):35-45.
- Laothong U, Hiraku Y, Oikawa S, Intuyod K, Murata M & Pinlaor S (2015) Melatonin induces apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by activating the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Oncology reports* 33(3):1443-1449.
- Lee J, Giordano S & Zhang J (2011) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal* 441(2):523-540.
- Lee SE, Kim SJ, Yoon HJ, Yu SY, Yang H, Jeong SI, Hwang SY, Park CS & Park YS (2013) Genome-wide profiling in melatonin-exposed human breast cancer cell lines identifies differentially methylated genes involved in the anticancer effect of melatonin. *Journal of pineal research* 54(1):80-88.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH & Mori W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 80(10):2587-2587.
- Levine R (1993) Ischemia: from acidosis to oxidation. *The FASEB journal* 7(13):1242-1246.
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 32(9):790-796.
- 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. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 278(5):C982-C988.
- Li Y, Yang Y, Feng Y, Yan J, Fan C, Jiang S & Qu Y (2014) A review of melatonin in hepatic ischemia/reperfusion injury and clinical liver disease. *Annals of medicine* 46(7):503-511.
- Mailly N, Delord J, Dubois A & Gandia P (2008) Choriocarcinome placentaire métastatique chez la mère et son nouveau né: à propos d'un cas: Metastatic placental choriocarcinoma to mother and newborn: a case report. *Journal de Radiologie* 89(4):517-520.
- Malassiné A, Tarrade A, Guibourdenche J, Rochette-Égly C & Évain-Brion D (2000) Le placenta.

- Manju V, Sailaja JK & Nalini N (2002) Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clinical Biochemistry* 35(8):621-625.
- Mannello F, Tonti GA & Medda V (2009) Protein oxidation in breast microenvironment: Nipple aspirate fluid collected from breast cancer women contains increased protein carbonyl concentration. *Analytical Cellular Pathology* 31(5):383-392.
- Many A, Westerhausen-Larson A, Kanbour-Shakir A & Roberts J (1996) Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta* 17(5-6):361-365.
- Mark PJ, Crew RC, Wharfe MD & Waddell BJ (2017) Rhythmic Three-Part Harmony: the complex interaction of maternal, placental and fetal circadian systems. *Journal of biological rhythms* 32(6):534-549.
- Mattaliano MD, Huard C, Cao W, Hill AA, Zhong W, Martinez RV, Harnish DC, Paulsen JE & Shih HH (2009) LOX-1-dependent transcriptional regulation in response to oxidized LDL treatment of human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296(6):C1329-C1337.
- McCarthy RT, Jungheim ES, Fay JC, Bates K, Herzog ED & England SK (2019) Riding the rhythm of melatonin through pregnancy to deliver on time. *Frontiers in endocrinology* 10:616.
- McMillen IC & Nowak R (1989) Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Journal of Endocrinology* 120(3):459-464.
- Medina-Navarro R, Duran-Reyes G & Hicks JJ (1999) Pro-oxidating properties of melatonin in the in vitro interaction with the singlet oxygen. *Endocrine research* 25(3-4):263-280.
- Mele J, Muralimanoharan S, Maloyan A & Myatt L (2014) Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 307(5):E419-E425.
- Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M & Torres-Farfan C (2012) Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One* 7(8):e42713.
- Mikkelsen RB & Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22(37):5734.
- Morena M, Cristol JP, Bosc JY, Tetta C, Forret G, Leger CL, Delcourt C, Papoz L, Descomps B & Canaud B (2002) Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17(3):422-427.
- Morón ÚM & Castilla-Cortázar I (2012) Protection Against Oxidative Stress and "IGF-I Deficiency Conditions". *Antioxidant Enzyme* :89.
- 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 & Metabolism* 65(6):1282-1290.
- Moussard C (2006) *Biochimie structurale et métabolique*. De Boeck Supérieur,
- Murad F (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Advances in pharmacology*, Elsevier, Vol 26. p 19-33.
- Naidu MSK, Suryakar A, Swami SC, Katkam R & Kumbar K (2007) Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(2):140-144.
- Najafi M, Salehi E, Farhood B, Nashtaei MS, Hashemi Goradel N, Khanlarkhani N, Namjoo Z & Mortezaee K (2019) Adjuvant chemotherapy with melatonin for targeting human cancers: A review. *Journal of cellular physiology* 234(3):2356-2372.

- 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. *Journal of pineal research* 30(1):29-33.
- Nathan CF, Arrick BA, Murray HW, DeSANTIS NM & Cohm Z (1981) Tumor cell anti-oxidant defenses. Inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytolysis. *Journal of Experimental Medicine* 153(4):766-782.
- Nathan CF & Hibbs Jr JB (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current opinion in immunology* 3(1):65-70.
- Nathan FM, Singh VA, Dhanoa A & Palanisamy UD (2011) Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma. *BMC cancer* 11(1):382.
- Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, Neve KA & Allen CN (2001) Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Molecular endocrinology* 15(8):1306-1317.
- Nosjean O, Ferro M, Cogé F, Beauverger P, Henlin J-M, Lefoulon F, Fauchere J-L, Delagrange P, Canet E & Boutin JA (2000) Identification of the Melatonin-binding Site MT 3 as the Quinone Reductase 2. *Journal of Biological Chemistry* 275(40):31311-31317.
- Ogasawara T, Adachi N & Nishijima M (1991) Melatonin levels in maternal plasma before and during delivery, and in fetal and neonatal plasma. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 43(3):335-341.
- Orrenius S, Gogvadze V & Zhivotovsky B (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:143-183.
- Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet J-M & Touitou Y (2000) Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life sciences* 68(4):387-399.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S & Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12(5):913-922.
- Palazon A, Goldrath AW, Nizet V & Johnson RS (2014) HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41(4):518-528.
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM & Petrosillo G (2015) Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Archives of toxicology* 89(6):923-939.
- Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB & Espino J (2016) Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *Journal of pineal research* 60(1):55-64.
- Park JS, Sharma LK, Li H, Xiang R, Holstein D, Wu J, Lechleiter J, Naylor SL, Deng JJ & Lu J (2009a) A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Human molecular genetics* 18(9):1578-1589.
- Park JW, Hwang MS, Suh SI & Baek WK (2009b) Melatonin down-regulates HIF-1 $\alpha$  expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *Journal of pineal research* 46(4):415-421.
- Pelicano H, Carney D & Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates* 7(2):97-110.
- Petrosillo G, Venosa ND, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Paradies G & Ruggiero FM (2006) Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin. *The FASEB Journal* 20(2):269-276.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K & Defraigne J-O (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16(4):233-239.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D & Bitto A (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.

- Plaimee P, Weerapreeyakul N, Barusrux S & Johns N (2015) Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell proliferation* 48(1):67-77.
- Podrez EA, Abu-Soud HM & Hazen SL (2000) Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 28(12):1717-1725.
- Radogna F, Paternoster L, De Nicola M, Cerella C, Ammendola S, Bedini A, Tarzia G, Aquilano K, Ciriolo M & Ghibelli L (2009a) Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 239(1):37-45.
- Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC, Accorsi A, Gualandi G & Ghibelli L (2009b) Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicology and applied pharmacology* 238(2):170-177.
- Ramachandran A, Levenon A-L, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC & Darley-Usmar V (2002) Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine* 33(11):1465-1474.
- Reddy VP, Zhu X, Perry G & Smith MA (2009) Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 16(4):763-774.
- Reiter RJ (1991) Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and cellular endocrinology* 79(1-3):C153-C158.
- Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan D-X, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang S-F & Xu K (2017) Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *International journal of molecular sciences* 18(4):843.
- Reiter RJ, Sharma R, Ma Q, Rosales-Corral S, Acuna-Castroviejo D & Escames G (2019) Inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase: a proposed mechanism by which melatonin causes cancer cells to overcome cytosolic glycolysis, reduce tumor biomass and reverse insensitivity to chemotherapy. *Melatonin Research* 2(3):105-119.
- Richter C, Park J-W & Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(17):6465-6467.
- 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. *Journal of Pineal Research* 46(4):357-364.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V & Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research* 36(1):1-9.
- Sagrillo-Fagundes L, Assunção Salustiano EM, Ruano R, Markus RP & Vaillancourt C (2018) Melatonin modulates autophagy and inflammation protecting human placental trophoblast from hypoxia/reoxygenation. *Journal of Pineal Research* 65(4):e12520.
- Sagrillo-Fagundes L, Bienvenue-Pariseault J & Vaillancourt C (2019) Melatonin: The smart molecule that differentially modulates autophagy in tumor and normal placental cells. *PloS one* 14(1):e0202458.
- Sagrillo-Fagundes L, Clabault H, Laurent L, Hudon-Thibeault A-A, Salustiano EMA, Fortier M, Bienvenue-Pariseault J, Yen PW, Sanderson JT & Vaillancourt C (2016) Human primary trophoblast cell culture model to study the protective effects of melatonin against hypoxia/reoxygenation-induced disruption. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (113):e54228.
- Sagrillo-Fagundes L, Soliman A & Vaillancourt C (2014) Maternal and placental melatonin: actions and implication for successful pregnancies. *Minerva Ginecol* 66(3):251-266.
- Sanchez-Sanchez AM, Antolin I, Puente-Moncada N, Suarez S, Gomez-Lobo M, Rodriguez C & Martin V (2015) Melatonin cytotoxicity is associated to warburg effect inhibition in ewing sarcoma cells. *PloS one* 10(8):e0135420.

- Sánchez-Sánchez AM, Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Suarez-Garnacho S, Antolín I & Rodriguez C (2011) Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free radical research* 45(11-12):1333-1341.
- Sarkar S, Kacinski BM, Kohorn EI, Merino MJ, Carter D & Blakemore KJ (1986) Demonstration of myc and ras oncogene expression by hybridization in situ in hydatidiform mole and in the BeWo choriocarcinoma cell line. *American journal of obstetrics and gynecology* 154(2):390-393.
- Scherz-Shouval R & Elazar Z (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in biochemical sciences* 36(1):30-38.
- Scifres CM & Nelson DM (2009) Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *The Journal of physiology* 587(14):3453-3458.
- Scott AE, Cosma GN, Frank AA, Wells RL & Gardner Jr HS (2001) Disruption of mitochondrial respiration by melatonin in MCF-7 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 171(3):149-156.
- Senoglu N, Yuzbasioglu M, Aral M, Ezberci M, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Ezberci F, Oksuz H & Ciragil P (2008) Protective effects of N-acetylcysteine and  $\beta$ -glucan pretreatment on oxidative stress in cecal ligation and puncture model of sepsis. *Journal of Investigative Surgery* 21(5):237-243.
- Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ & Szulc ZM (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature chemical biology* 8(10):831.
- Serón-Ferré M, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela FJ, Reynolds HE, Llanos AJ, Rojas A, Valenzuela GJ & Torres-Farfan C (2012) Circadian rhythms in the fetus. *Molecular and cellular endocrinology* 349(1):68-75.
- Shafabakhsh R, Reiter RJ, Mirzaei H, Teymoordash SN & Asemi Z (2019) Melatonin: A new inhibitor agent for cervical cancer treatment. *Journal of Cellular Physiology* 234(12):21670-21682.
- Shao J-S, Cai J & Towler DA (2006) Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26(7):1423-1430.
- Sharkey JT, Cable C & Olcese J (2010) Melatonin Sensitizes Human Myometrial Cells to Oxytocin in a Protein Kinase Ca/Extracellular-Signal Regulated Kinase-Dependent Manner. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(6):2902-2908.
- Sharkey JT, Puttaramu R, Word RA & Olcese J (2009) Melatonin Synergizes with Oxytocin to Enhance Contractility of Human Myometrial Smooth Muscle Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94(2):421-427.
- Shepherd VL (1986) The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. *Seminars in respiratory infections*. p 99-106.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82(2):291-295.
- Soliman A, Lacasse AA, Lanoix D, Sagrillo-Fagundes L, Boulard V & Vaillancourt C (2015) Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. *Journal of pineal research* 59(1):38-46.
- Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM & Cardinali DP (2011) Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.
- Suofu Y, Li W, Jean-Alphonse FG, Jia J, Khatrar NK, Li J, Baranov SV, Leronni D, Mihalik AC & He Y (2017) Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(38):E7997-E8006.
- Talib WH (2018) Melatonin and cancer hallmarks. *Molecules* 23(3):518.
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan D-X, Sugino N & Reiter RJ (2008) Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology* 25(3):291-303.

- Tan D-X, Manchester LC, Qin L & Reiter RJ (2016) Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *International journal of molecular sciences* 17(12):2124.
- Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D & Reiter RJ (2013) Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of pineal research* 54(2):127-138.
- Tang L, Reiter RJ, Li Z-R, Ortiz GG, Yu BP & Garcia JJ (1998) Melatonin reduces the increase in 8-hydroxydeoxyguanosine levels in the brain and liver of kainic acid-treated rats. *Molecular and cellular biochemistry* 178(1-2):299-303.
- Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, Pairojkul C, Wongkham C, Sripa B & Khuntikeo N (2012) Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis for cholangiocarcinoma. *Free Radical Biology and Medicine* 52(8):1465-1472.
- Torres-Farfan C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela GJ & Seron-Ferre M (2011) A Circadian Clock Entrained by Melatonin Is Ticking in the Rat Fetal Adrenal. *Endocrinology* 152(5):1891-1900.
- Tripathy D & Grammas P (2009) Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *Journal of neuroinflammation* 6(1):10.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552(2):335-344.
- Tuuli M, Longtine M & Nelson DM (2011) oxygen and trophoblast biology—a source of controversy. *Placenta* 32:S109-S118.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ & Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* 266(1-2):37-56.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M & Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160(1):1-40.
- Vanderlelie J, Venardos K, Clifton V, Gude N, Clarke F & Perkins A (2005) Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 26(1):53-58.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309-314.
- Webster R, Roberts V & Myatt L (2008) Protein nitration in placenta—functional significance. *Placenta* 29(12):985-994.
- Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, Deoreo PB, Araki A, Glomb MA & Monnier VM (2000) Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney international* 57(6):2571-2585.
- Wenzel U, Nickel A & Daniel H (2005) Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *International journal of cancer* 116(2):236-242.
- Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH & Walker JJ (1991) Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American journal of obstetrics and gynecology* 165(6):1701-1704.
- Wolf NG & Lage JM (1995) Genetic analysis of gestational trophoblastic disease: a review. *Seminars in oncology*. p 113-120.
- Wölfler A, Caluba H-C, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K & Liebmann PM (2001) Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS letters* 502(3):127-131.
- Wu F, Tian F-J & Lin Y (2015) Oxidative stress in placenta: health and diseases. *BioMed research international* 2015.

- Wurtman RJ, Larin F, AXELROD J, SHEIN HM & ROSASCO K (1968) Formation of melatonin and 5-hydroxyindole acetic acid from 14C-tryptophan by rat pineal glands in organ culture. *Nature* 217(5132):953-954.
- Yao H & Rahman I (2011) Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicology and applied pharmacology* 254(2):72-85.
- Zhang HM & Zhang Y (2014) Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of pineal research* 57(2):131-146.
- Zusterzeel P, Rütten H, Roelofs H, Peters W & Steegers E (2001) Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta* 22(2-3):213-219.